

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

TESE

INFLUÊNCIA DA HIDROGENASE NA FIXAÇÃO E NA DISTRIBUIÇÃO
DO NITROGÊNIO EM SOJA (*Glycine max* L.) INOCULADA COM
ESTIRPES EFICIENTES DE *Bradyrhizobium*

VERÔNICA ARIETA FERREIRA SANTOS

1994

INFLUÊNCIA DA HIDROGENASE NA FIXAÇÃO E NA DISTRIBUIÇÃO DO
NITROGÊNIO EM SOJA (*Glycine max.* L.) INOCULADA COM ESTIRPES
EFICIENTES DE *Bradyrhizobium*

VERÔNICA ARIETA FERREIRA SANTOS

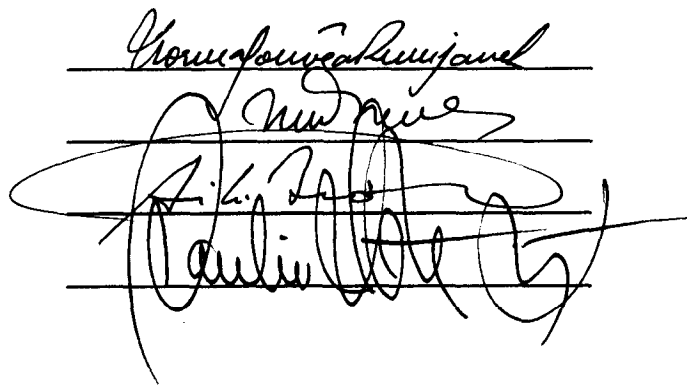
APROVADO EM 09/03/1994

Dra. NORMA G. RUMJANEK

Dra. MARIA CRISTINA P. NEVES

Dr. AVÍLIO A. FRANCO

Dr. MANLIO S. FERNANDES



The image shows four handwritten signatures, each on a horizontal line. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized. The first signature is 'Norma G. Rumjanek', the second is 'Maria Cristina P. Neves', the third is 'Avilio A. Franco', and the fourth is 'Manlio S. Fernandes'.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

INFLUÊNCIA DA HIDROGENASE NA FIXAÇÃO E NA DISTRIBUIÇÃO DO
NITROGÊNIO EM SOJA (*Glycine max* L.) INOCULADA COM ESTIRPES
EFICIENTES DE *Bradyrhizobium*

VERÔNICA ARIETA FERREIRA SANTOS

SOB A ORIENTAÇÃO DA Dra. NORMA GOUVÊA RUMJANEK

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do
grau de mestre em Agronomia
em Ciência do Solo.

Itaguaí, 9 de março de 1994

Haverá na face de todos um profundo assombro
E na face de alguns risos sutis cheios de reserva
Muitos se reunirão em lugares desertos
E falarão em voz baixa em novos possíveis milagres
como se o milagre tivesse realmente se realizado
Muitos sentirão alegria
Porque deles é o primeiro milagre.
E darão o óbolo do fariseu com ares humildes
Muitos não compreenderão.
Porque suas inteligências vão somente até os processos.
E já existem nos processos tantas dificuldades...
Alguns verão e julgarão com a alma
Outros Verão e julgarão com a alma que eles não têm
Ouvirão apenas dizer...

Será belo e será ridículo

Haverá quem mude como os ventos

E haverá quem permaneça na pureza dos rochedos
No meio de todos eu ouvirei calado e atento, comovido e
risonho
Escutando verdades e mentiras

Mas não dizendo nada

Só a alegria de alguns compreenderem bastará
Porque tudo aconteceu para que eles compreendessem
Que as águas mais turvas contém às vezes as pérolas mais
belas

(Acontecimento, Vinícius de Moraes)

Esta tese de mestrado é fruto de um ambiente de trabalho extremamente fértil e produtivo, onde o profissionalismo e a amizade convivem harmonicamente. Desenvolvida numa instituição de pesquisa que, a despeito de todas as adversidades, foi construída com idealismo e dedicação, e numa universidade que vive o momento histórico da redescoberta de seu enorme potencial.

Mais do que pelos conhecimentos adquiridos, sinto-me enriquecida pela convivência com tantos amigos. Pessoas que nunca me deixaram faltar o apoio e o carinho fundamentais nas horas difíceis.

Gostaria, portanto, de manifestar meu sentimento de profunda gratidão às minhas orientadoras Dra. Norma Rumjanek e Dra. Cristina Neves; à querida Rojane e a todos os amigos que participaram comigo desta jornada.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO GERAL.....	ix
GENERAL ABSTRACT.....	xii
2. INTRODUÇÃO GERAL	1
3. CAPÍTULO 1	
AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE N ₂ E DA PARTIÇÃO DO NITROGÊNIO EM SOJA (<i>Glycine max</i> L.) INOCULADA COM ESTIRPES EFICIENTES DE <i>Bradyrhizobium</i>	6
3.1 Resumo	7
3.2 Introdução	10

3.3 Material e Métodos	15
3.4 Resultados	20
3.5 Discussão .,.....	37
3.6 Conclusões	41

4. CAPÍTULO II

EFEITO DA LUMINOSIDADE NA FBN, NA EFICIÊNCIA E NA SENESCÊNCIA DOS NÓDULOS FORMADOS PELAS ESTIRPES CB 1809 DE <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E 29W DE <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	42
---	----

4.1 Resumo	43
4.2 Introdução	45
4.3 Material e Métodos	50
4.4 Resultados	55
4.5 Discussão	73
4.6 Conclusões	80

5. CAPÍTULO III

EFEITO DO SOMBREAMENTO NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA, ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DO NITROGÊNIO EM SOJA (<i>Glycine max</i> L.) INOCULADA COM MUTANTES HUP ⁺ E HUP ⁻ DE <i>B. japonicum</i>	81
---	----

5.1 Resumo	82
5.2 Introdução	84
5.3 Material e Métodos	90
5.4 Resultados	95
5.5 Discussão	106
5.6 Conclusões	113
6. CONCLUSÕES GERAIS	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
8. ANEXO	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- CAPÍTULO I	
- Figura 1 - Matéria seca acumulada (a) na parte aérea e (b) nas raízes de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	21
- Figura 2 - Acúmulo de nitrogênio na parte aérea de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	24
- Figura 3 - Partição da matéria seca acumulada na parte aérea de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	27

- Figura 4 - Peso de nódulos secos de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	29
- Figura 5 - (a) Atividade total da nitrogenase (ARA) e (b) eficiência relativa (ER) de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	30
- Figura 6 - (a) Concentração de N-ureído e de (b) N-total na seiva xilemática de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	32
- Figura 7 - Proporção de N-ureído na seiva xilemática de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	33
- CAPÍTULO II	
- Figura 1 - Efeito da luminosidade na (a) Área foliar e área foliar específica de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	56
- Figura 2 - Distribuição percentual das classes de nódulos por tamanho: (a) luminosidade total e (b) sombreado (70% de	

sombreamento). Nódulos de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	65
--	----

- Figura 3 - Distribuição percentual das classes de ródulos por coloração: (a) luminosidade total e (b) sombreado (70% de sombreamento). Nódulos de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de <i>B. japonicum</i> e 29W de <i>B. elkanii</i>	66
--	----

- CAPÍTULO III

- Figura 1 - Efeito da luminosidade na (a) eficiência relativa (ER) e (b) na porcentagem de N-ureído na seiva xilemática de soja cv. Doko inoculada com mutantes Hup ⁺ e Hup ⁻ de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	103
--	-----

- Figura 2 - Correlação entre a eficiência relativa e a porcentagem de N-ureído na seiva xilemática de soja cv. Doko cultivada sob luminosidade total ou sombreada e inoculada com a mutante Hup ⁻ de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	105
---	-----

1 - RESUMO GERAL

A produção de hidrogênio durante a redução enzimática do N_2 para a amônia é um dos fatores que mais influenciam a eficiência da fixação biológica do nitrogênio. Em soja, a eficiência relativa da fixação de nitrogênio tem sido relacionada a abundância relativa de ureídos no exsudato xilemático e a partição do nitrogênio para as sementes. Tendo em vista a importância econômica e ecológica da utilização da FBN em soja, tem-se buscado estirpes que proporcionem um aumento na produção de grãos da cultura. Além disso, esforços tem sido feitos visando conhecer os mecanismos e fatores que afetam o sistema simbiótico. A influência da hidrogenase na fixação de N_2 , no transporte e na partição do nitrogênio foi avaliada em plantas noduladas de soja. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito da inoculação da soja com as estirpes CB 1809 (Hup⁺) de *Bradyrhizobium japonicum* e 29W

(Hup⁻) de *B. elkanii* na FBN e na partição do nitrogênio na parte aérea. A FBN foi estimada pelo método de diluição isotópica de ¹⁵N. Cerca de 95% do nitrogênio total da parte aérea foi proveniente da fixação de N₂. A estirpe Hup⁺ fixou mais N-total do que a estirpe Hup⁻. A atividade dos nódulos formados pela estirpe Hup⁻ foi drasticamente reduzida durante o período de formação de vagens, enquanto, a estirpe Hup⁺ manteve elevados níveis de fixação de N₂ durante todo o período reprodutivo da soja. A maior atividade dos nódulos formados pela estirpe Hup⁺ refletiu em um aumento na proporção de N-ureídos no exsudato xilemático das plantas durante o período reprodutivo. As plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apresentaram um maior índice de colheita de biomassa e nitrogênio e uma maior produção de grãos em comparação com a estirpe 29W. Na fase seguinte, plantas de soja inoculadas com as estirpes CB 1809 (Hup⁺) ou 29W (Hup⁻) foram cultivadas sob luminosidade total ou sombreadas (70% de sombreamento), e amostradas do período de florescimento até a fase de produção de sementes. A inoculação com a estirpe Hup⁺ aumentou o total de N acumulado pelas plantas e a produção de sementes da soja cultivada sob luminosidade plena em comparação a estirpe Hup⁻. Após o florescimento, uma maior proporção de N-ureídos foi transportada na seiva xilemática das plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺. O sombreamento das plantas, aumentou a proporção relativa de ureídos no exsudato

xilemático e os índices de colheita de biomassa e N da soja. O efeito do sombreamento no transporte de N-ureído na seiva foi mais acentuado nas plantas inoculadas com a estirpe Hup⁻ (29W) e refletiu em um aumento na produção de grãos dessas plantas em comparação ao tratamento não sombreado. Na última etapa do trabalho, foram conduzidos dois experimentos utilizando mutantes isogênicos Hup⁺ e Hup⁻ de *B. japonicum* inoculadas em soja. As plantas foram cultivadas sob luminosidade total ou sombreadas (70% de sombreamento). A presença da hidrogenase induziu a síntese de ureídos nos nódulos e aumentou sua proporção no exsudato xilemático das plantas. Os nódulos formados com a mutante Hup⁻ apresentaram uma baixa eficiência relativa da fixação de N₂ quando cultivada sob luminosidade total, no sombreamento, ocorreu um aumento na ER da nitrogenase. Nessas plantas, observou-se uma correlação positiva entre a ER e a proporção relativa de N-ureídos na seiva xilemática. Os resultados obtidos sugerem a utilização da porcentagem de N-ureído no exsudato xilemático, durante o período reprodutivo das plantas, como parâmetro para a avaliação da eficiência do sistema simbiótico e da atividade dos nódulos de soja.

1.1 - GENERAL ABSTRACT

The hydrogen production by nitrogenase has been identified as one of the factors that limits the efficiency of N_2 fixation. Soybean plants show positive correlation of the relative efficiencies (RE) with the percentage of ureide-N in the xylem sap and harvest indices. The presence of an active system allows greater efficiency in biological nitrogen fixation (BNF) and can increase grain yield in soybean plants. Increase in grain yield can only be attained with a comprehensive understanding of the plant physiology and identification of the major factors limiting the rates and the duration of the process related to BNF. In this work, the effect of hydrogenase on N_2 fixation, N transport and distribution in soybean plants was studied. In the first

experiment, soybean plants were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strain: CB 1809 (BR 33) or with *Bradyrhizobium elkanii* strain: 29W (BR 29). We compared the effect of the Hup⁺ and Hup⁻ phenotype on N₂ fixation and N distribution in soybean shoots. The contribution of BNF was estimated using ¹⁵N isotope dilution technique. About 95% of the plant N was derived from BNF. The Hup⁺ strain fixed more N₂ than the Hup⁻ strain. The nitrogenase activity (ARA) of the plants inoculated with the Hup⁻ strain was reduced after flowering in comparison to the Hup⁺ strain that maintained high rates of ARA during the seed filling stage. The higher activity nodules formed by the Hup⁺ strain was reflected in the greater proportion of ureide-N in xylem sap. Plants inoculated with Hup⁺ strain showed higher grain yield and N harvest indices than plants inoculated with the Hup⁻ strain. In the second experiment, soybean plants were inoculated again with CB 1809 or 29W. The plants were grown up to yield under shading (30% full day light) or at full sunlight. Under full sunlight, seed yield of plants inoculated with the Hup⁺ strain were higher than plants inoculated with Hup⁻ strain. For both strains, the shading increased the proportion of ureide-N transported to the shoot and the soybean harvest indices. The effect of shading on the soybean physiology was, however, more remarkable in plants inoculated with the Hup⁻ strain than the ones inoculated

with Hup⁺ strain. In the third experiment, soybean plants were inoculated with either *Bradyrhizobium japonicum* mutant Hup⁻ (PJ17) or its isogenic revertant Hup⁺ (PJ17-1). The plants were grown up to flowering stage under shading (30% full daylight) or at full sunlight. The revertant Hup⁺ induced the ureide synthesis and increased its proportion in the soybean xylem sap when compared to the Hup⁻ mutant. A significant increase in the RE of nodules formed by Hup⁻ mutant was observed when plants were partially shaded. This increase in RE reflected in a greater proportion of fixed N transported as ureide. The significant differences in xylem sap composition (percentage ureide-N) observed under full daylight between the plant inoculated with Hup⁺ and Hup⁻ mutants were not observed in shaded plants. A positive correlation between RE and percentage in xylem sap was observed in plants inoculated with Hup⁻ mutant. The results indicate that under conditions of reduced carbon availability the Hup⁻ strains can increase their efficiency. These results can help to explain the conflicting effects observed with the presence of Hup in *Bradyrhizobium* strains. The relative proportion of the ureide-N in the sap during the reproductive stage, could be used as a reliable parameter in soybean breeding programs indicating the efficiency of the symbiotic system and nodule activity.

2 - INTRODUÇÃO GERAL

A soja é a cultura anual de maior expressão econômica no Brasil. No ano agrícola de 1990/1991 foi cultivada em 11,5 milhões de hectares e alcançou a produção de 19,9 milhões de toneladas, com produtividade média de 1732 kg/ha (IBGE 1991). O Brasil é, atualmente, o 2º maior produtor e o 2º maior exportador mundial de soja. Essa *performance* tornou-se viável, em grande parte, devido aos programas de melhoramento vegetal tendo a simbiose como fonte de nitrogênio e de um trabalho de seleção de rizóbios adaptados as condições dos solos brasileiros. A fixação biológica de nitrogênio garante aos agricultores brasileiros uma elevada competitividade no mercado mundial. Por ser cultivada sem o uso de adubos nitrogenados, a cultura da soja economiza cerca de US\$ 1,8 bilhões, reduzindo os custos de produção (Döbereiner & Urquiaga 1992).

As estirpes de rizóbio, amplamente utilizadas como inoculante para a soja no país, semia 587 e semia 5019 (29W), produzem uma grande massa nodular e apresentam uma elevada capacidade de fixação de N_2 . No entanto, se mostram ineficientes em termos de transferência do nitrogênio para os grãos (Duque et al. 1982; Neves et al. 1985).

Os estudos desenvolvidos no CNPAB/EMBRAPA visando a seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação da soja, demonstraram que a inoculação da soja com a estirpe CB 1809 poderia aumentar a produção de grãos e o índice de colheita da cultura em comparação a estirpe 29W. O melhor desempenho da estirpe CB 1809 foi atribuído a maior atividade específica da nitrogenase e a uma elevada eficiência relativa da fixação de nitrogênio (Neves et al. 1985). A importância econômica e ecológica da utilização de associações simbióticas que proporcionem um aumento na produção de grãos nessa cultura, tem direcionado os estudos para a compreensão dos mecanismos e fatores que afetam esse sistema simbiótico.

Durante a redução enzimática do N_2 à amônia, parte dos elétrons disponíveis são direcionados para a redução de protons para o H_2 , sem benefício aparente para a simbiose. A evolução de hidrogênio nos nódulos radiculares da soja, é um dos fatores que mais influenciam a eficiência da fixação biológica do nitrogênio (Schubert & Evans 1976). A presença do sistema hidrogenase ativo (Hup^+), pode oxidar o H_2

produzido pela nitrogenase, recuperando parte da energia consumida durante o processo de fixação de N_2 . O aumento na eficiência relativa da fixação de nitrogênio, devido a presença da hidrogenase tem sido associado a um maior acúmulo de nitrogênio nas sementes e uma maior produção de grãos nas plantas (Neves et al. 1985).

A presença da hidrogenase nos nódulos parece alterar a assimilação do nitrogênio fixado em nódulos de soja devido ao aumento na fixação de N_2 além de afetar a forma pela qual o nitrogênio fixado é transportado dos nódulos para a parte aérea via seiva xilemática (Minamisawa et al. 1981). Em uma série de estudos sobre o efeito da inoculação de soja com grupos de estirpes Hup^+ e Hup^- de *B. japonicum* foi observada que a taxa de transporte de nitrogênio fixado de raízes de plantas noduladas por estirpes Hup^+ foi maior do que aquelas noduladas por estirpes Hup^- (Minamisawa et al. 1983). Usando grupos de estirpes Hup^+ e Hup^- de *Rhizobium phaseoli* como inoculante para várias cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*), Hungria & Neves (1987) observaram uma correlação positiva entre a porcentagem de N-ureído na seiva xilemática e a eficiência relativa da nitrogenase. Hungria et al. (1989) observaram que além de promover uma maior fixação de N_2 , a inoculação de soja com a revertante Hup^+ (PJ17-1) de *B. japonicum* aumentou a síntese e o transporte de N-ureído. na seiva xilemática em comparação a mutante Hup^- (PJ17). Uma

correlação positiva entre a proporção relativa de N-ureído no exsudato xilemático e o índice de colheita de nitrogênio foi observada na cultura da soja (Neves et al. 1985). O transporte do nitrogênio fixado biologicamente sob a forma de ureídos na seiva xilemática parece alterar a partição do N na parte aérea, favorecendo a produção de sementes.

No entanto, a forma pela qual esse fatores estão relacionados não está bem compreendida, e resultados controversos, observados por alguns autores, podem estar relacionados a fatores ambientais, os quais podem afetar a partição de elétrons dentro da nitrogenase e a atividade da hifrogenase nos nódulos (Bethlenfalvay & Phillips 1979; Nelson 1983; Rumjanek et al. 1991), assim como, a forma de transporte do N-fixado dos nódulos para a parte aérea (Neves et al. 1985; Hungria & Neves 1987; Rumjanek et al. 1991).

Nesse contexto, este trabalho visou estudar FBN, a distribuição do nitrogênio fixado e sua remobilização dos órgão vegetativos para os reprodutivos na soja inoculada com as estirpes: CB 1809 (Hup⁺) de *B. japonicum* e 29W (Hup⁻) de *B. elkanii*, durante o ciclo da cultura. Avaliar o efeito do sombreamento e da inoculação da soja com as estirpes CB 1809 e 29W no crescimento da planta, na FBN, no transporte de nitrogênio para a parte aérea e na produção de grãos das plantas. E, avaliar o papel do sistema hidrogenase na fixação do N₂, no metabolismo do nitrogênio nos nódulos e na

composição da seiva xilemática, e sua possível relação com o sombreamento parcial das plantas durante o período de florescimento.

3 - CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE N₂ E DA PARTIÇÃO DO NITROGÊNIO EM
SOJA (*Glycine max* L.) INOCULADA COM ESTIRPES EFICIENTES DE
Bradyrhizobium.

3.1 - RESUMO

Os estudos recentes da inoculação de soja com estirpes eficientes de rizóbio visando o aumento na produção de grãos, tem evidenciado a necessidade de se considerar as diferenças entre as simbioses quanto à eficiência relativa da fixação de N_2 e a partição do N, visto que, ambos os fatores podem afetar a produção de grãos e o índice de colheita da cultura. Soja cv. Doko foi inoculada com as estirpes CB 1809 (Hup^+) de *B. japonicum* ou 29W (Hup^-) de *B. elkanii*. A quantificação da FBN foi feita pelo método de diluição isotópica de ^{15}N . Cerca de 95% do N-total acumulado pela plantas, foi proveniente da FBN. Ao final do ciclo, constatou-se que as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 fixaram mais N e apresentaram um maior teor de N nos grãos do que as plantas inoculadas com a estirpe 29W. A partição do N na parte aérea não foi afetada pelo tratamento de inoculação, no entanto, a

associação com a CB 1809 apresentou uma melhor remobilização do nitrogênio das folhas para as vagens, resultando em um maior índice de colheita de biomassa e N em comparação a 29W. A maior parte do N, acumulado pelas plantas, foi fixado após o período de florescimento, em ambas as estirpes. Um marcado aumento na massa nodular das plantas inoculadas com a estirpe 29W foi observado após o período de florescimento, sendo que, na fase de enchimento de grãos, as plantas deste tratamento apresentaram uma massa nodular até 3 vezes superior a das plantas inoculadas com a CB 1809. No entanto, embora as plantas inoculadas com a estirpe 29W tenham apresentado elevados níveis de atividade da nitrogenase (ARA) durante o período vegetativo, houve uma redução significativa da atividade dos nódulos durante a fase de formação de vagens. Essa redução na ARA foi acompanhada de uma diminuição significativa na ER dos nódulos formados por essa estirpe. As plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 não variaram significativamente a massa nodular durante o ciclo da planta. Enquanto, mantiveram níveis elevados de ARA até o período de formação de vagens. Paralelamente, os nódulos formados com a estirpe CB 1809 foram capazes de reciclar praticamente todo o H_2 produzido pela nitrogenase ao longo do ciclo da planta. Os níveis elevados de atividade da nitrogenase e de ER observados nas plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 durante o período reprodutivo, refletiram numa maior proporção de N-ureído transportado via seiva xilemática e numa maior quantidade de N-total fixado por essa estirpe. A

manutenção de elevada FBN durante o período reprodutivo, resultou em uma elevada produção de grãos na soja. Essa característica é dependente da estirpe de rizóbio e parece estar associada a presença do sistema hidrogenase ativo (Hup^+) em *Bradyrhizobium*.

3.2 - INTRODUÇÃO

A obtenção da produção máxima de grãos em leguminosas que se beneficiam da fixação biológica de nitrogênio, depende do fornecimento adequado de nitrogênio para a parte aérea durante os períodos vegetativo e reprodutivo, assim como, da eficiência na remobilização do nitrogênio fixado para as vagens (Neves & Hungria 1987). Nessas espécies, a manutenção da fixação de N_2 e do transporte do nitrogênio fixado durante o desenvolvimento das vagens, pode aumentar a produção de sementes e o total de nitrogênio nos grãos (Imsande 1989; Vilkman & Vessey 1992). O desenvolvimento dos frutos, envolve a assimilação de compostos nitrogenados, supridos via xilema, assim como, a assimilação pelo floema de compostos liberados no 'turn-

over' de proteínas e/ou na mobilização de reservas de nitrogênio nas folhas (Butteny et al. 1992).

Nas plantas de soja, os ureídos, alantoína e ácido alantóico, são os principais produtos da fixação biológica de nitrogênio. Esses compostos são responsáveis pelo transporte da maior parte do nitrogênio fixado para a parte aérea das plantas (Atkins 1991). Resultados recentes indicam que a síntese de ureídos nos nódulos radiculares, apresenta uma interdependência metabólica com a atividade da nitrogenase, possivelmente mediada pelo metabolismo respiratório (Atkins et al. 1992). Desse modo, a abundância relativa de N-ureído no exsudato xilemático pode ser um indicador da dependência simbiótica das plantas, e servir como método quantitativo nos estudos de fisiologia da FBN e em programas de seleção de estirpes mais efetivas para a fixação de N_2 (Herridge et al. 1984; Van Berkum et al. 1985; Herridge & Peoples 1990).

Os ureídos representam a maior fonte de nitrogênio para a parte aérea da soja durante o período vegetativo (Shelp & Silva 1990). Esse compostos acumulam nos órgãos da parte aérea durante o crescimento das plantas (Fujihara et al. 1977; Matsumoto et al. 1977; Herridge et al. 1978). Na fase vegetativa, os ureídos representam de 60 a 75% do N-solúvel nas hastes. Streeter (1979) observou que, após o início do desenvolvimento das sementes, o conteúdo de N-ureído na haste diminui rapidamente, provavelmente, devido à

remobilização dos ureídeos para as vagens ou a degradação e reassimilação do nitrogênio antes do transporte para os frutos. O acúmulo de ureídeos nas vagens excede as hastes e folhas, representando de 50 a 70% do N-solúvel (Ohyama et al. 1981; Gomes & Sodek 1984). Esses compostos são, em geral, metabolizados nas vagens ou transportados para as sementes, onde são assimilados em aminoácidos e proteínas (Atkins et al. 1982; Gomes & Sodek 1984).

Embora os ureídeos sejam os principais solutos nitrogenados, amidas e aminoácidos também estão normalmente presentes na corrente transpiracional da soja dependente da fixação de N_2 . As quantidades absolutas e as proporções relativas desses compostos podem variar com o estágio de desenvolvimento da planta hospedeira e com fatores ambientais (Schubert 1986). Neves et al. (1985) forneceram evidências do efeito da estirpe de rizóbio na composição da seiva xilemática da soja, e sugeriram que esse efeito estaria associado ao sistema HUP. De forma similar, Hungria & Neves (1987) observaram uma correlação positiva entre a proporção de N-ureído na seiva do xilema e a eficiência relativa da fixação de N_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) inoculado com grupos de estirpe Hup⁺ e Hup⁻ de *Rhizobium phaseoli*. A relação entre a presença da hidrogenase e a proporção de N-ureído na seiva do xilema foi novamente observada por Hungria et al. (1989). A inoculação da soja com a mutante Hup⁺ aumentou,

durante o período de enchimento de grãos, a fixação de N_2 e induziu um aumento proporcional na síntese de ureídeos em comparação com a mutante Hup^- de *B. japonicum*. Esses resultados sugerem que as variações na razão de N-ureído/N-total no exsudato xilemático da soja e do feijão, podem refletir tanto as variações na proporção do N proveniente da fixação do N_2 , como na eficiência relativa da nitrogenase.

A maior proporção de nitrogênio transportada como ureídeos na seiva de plantas inoculadas com estirpes Hup^+ , tem sido associada a uma partição mais favorável do nitrogênio na parte aérea e a uma maior produção de grãos (Neves et al 1985; Neves & Hungria 1987; Hungria et al 1989). O efeito do fenótipo Hup^+ sobre a partição do nitrogênio na parte aérea parece estar relacionado a um transporte mais eficiente do nitrogênio para as vagens.

Os compostos nitrogenados provenientes do sistema radicular, não são distribuídos uniformemente entre os órgãos da parte aérea (Neves & Hungria 1987). Em soja, o nitrogênio marcado fornecido as plantas como asparagina, foi fortemente retido na haste e nos pecíolos, ocorrendo pouca retranslocação dessa amida para as vagens (Yoneyama 1984a). No entanto, quando o nitrogênio marcado foi fornecido como alantoína, esse composto foi transferido e metabolizado nas folhas jovens e nas vagens (Yoneyama 1984b). Recentemente, Mosquim & Sodek (1992) observaram que os ureídeos foram

metabolizados com mais intensidade do que as amidas na casca da vagem da soja. Esses autores sugeriram que os ureídeos são mobilizados preferencialmente para a nutrição das vagens nessa leguminosa. O nitrogênio fornecido às plantas sob a forma de nitrato ou amônia, favorece o crescimento vegetativo, no entanto, a transferência do nitrogênio para os grãos é ineficiente e, conseqüentemente, um menor índice de colheita de nitrogênio é observado na cultura quando comparado as plantas dependentes da FBN (Imsande 1988; Hume et al. 1989; Rossum et al. 1993).

Desse modo, os fatores que afetam a composição da seiva xilemática das plantas, podem também afetar a disponibilidade relativa das várias formas de nitrogênio para os diferentes tecidos e, conseqüentemente, a produção de grãos da cultura. Esse experimento teve como objetivo, quantificar a FBN em vários estágios de desenvolvimento da soja inoculada com as estirpes CB 1809 (Hup⁺) e 29W (Hup⁻) de *Bradyrhizobium*, assim como, avaliar a relação entre o transporte de N-ureído na seiva xilemática e a partição do nitrogênio e produção de grãos da cultura.

3.3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na EMBRAPA-CNPAB, Itaguaí, RJ, no período de outubro de 1991 à fevereiro de 1992.

Utilizou-se soja (*Glycine max* L.) cultivar Doko, inoculada com as estirpes CB 1809 (Hup⁺) de *B. japonicum* ou 29W (Hup⁻) de *B. elkanii*. As bactérias foram crescidas em meio definido de Vincent (1970) à 29°C por 7 dias, com agitação. As sementes foram esterilizadas com HgCl₂ 0,2% (Vincent 1970) e, posteriormente, inoculadas colocando-se 1ml de inoculante (cerca de 10⁸ células) por plântula (7 DAE).

Foram utilizados vasos plásticos com capacidade de 10 l, preenchidos com 13 kg do horizonte superficial do solo PVA Série Itaguaí com as seguintes propriedades: pH (1:1, H₂O), 4,8; P disponível, 1,6 ppm; cátions trocáveis: K, 108 ppm; Ca, 1,8 meq/100 ml; Mg, 1,2 meq/100 ml; Al, 0,2 meq/100 ml. O solo foi previamente corrigido com equivalente a 800 kg/ha de calcáreo calcítico. Trinta dias antes do plantio foram adicionados ao solo 5 ppm de ¹⁵N sob a forma de (¹⁵NH₄)₂SO₄ composto de 21,4% de átomos de ¹⁵N em excesso com 0,5% de palha de *Brachiaria* moída (20 mesh). Durante esse período, o solo foi mantido próximo a capacidade de campo,

sendo posteriormente, adicionados aos vasos o equivalente a 80 kg de P_2O_5 /ha.

A aplicação da técnica de diluição isotópica requer o uso de uma planta controle não-fixadora de N_2 , sendo utilizado para essa finalidade *Sorghum bicolor* cv. BR 005R.

Por ocasião do plantio, foram colocadas 4 sementes de soja pré-germinadas/vaso cobrindo-se em seguida com uma fina camada de solo. Simultaneamente, nos vasos reservados ao controle (não-fixador de N_2) foram colocadas 4 sementes de *Sorghum bicolor*. Aos 7 DAE foi feito o desbaste deixando-se 2 plantas/vaso para ambas as espécies.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados: 3 tratamentos (inoculação com a estirpe CB 1809 ou com a estirpe 29W e testemunha não-fixadora N_2) x 5 coletas x 5 repetições. As coletas foram realizadas aos 57 DAE (período vegetativo); aos 79 DAE, (florescimento pleno); aos 107 DAE (período de formação de vagens); aos 128 DAE (metade do enchimento de grãos) e aos 157 DAE (final do ciclo e produção de grãos).

Análises

- Determinação da matéria seca acumulada

As plantas de soja foram separadas em haste, pecíolo, folhas, vagens, grãos e casca da vagem, e colocadas para secar em estufa (60-70°C) até atingir peso constante. Em seguida foram pesadas e moidas à 0,84 mm (20 mesh).

- Determinações do teor de nitrogênio total e 15N na parte aérea

As análises de N-total foram feitas em amostras de 200 mg de material de planta pelo método de Bremner e Mulvaney (1982). Após a análise, as amostras foram transferidas para pequenos frascos (10 ml) de vidro e evaporados a 65°C até secar. As amostras foram, então, preparadas conforme Pruden et al. (1985) e os frascos foram conectados a um espectômetro de massa VG 900 (VG Isogas, Middlewich, Cheshire, England). A correção decorrente de possível contaminação com o ar foi feita por cálculos sobre as leituras dos picos 32 (O₂) e 40 (ar). A estimativa da proporção do nitrogênio da planta proveniente da FBN (% FN) foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ FN} = \frac{(1 - \% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso na soja})}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso no sorgo}}$$

e o total de N fixado em cada simbiose foi calculado pela equação:

$$N_{\text{fixado}} = \frac{\% \text{ FN} \times \text{N-total}}{100}$$

- Determinação da eficiência relativa (ER) dos nódulos

A evolução de H_2 foi determinada em raízes noduladas destacadas. As raízes noduladas foram colocadas em frascos (250 ml), mantidos fechados hermeticamente, com rolhas do tipo 'suba seal' por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram retiradas alíquotas (0,5 ml) da fase gasosa que foram analisadas em um analizador de H_2 de alta sensibilidade construído conforme Layzell et al. (1984).

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno em raízes destacadas (Mague & Burris 1972). Após a determinação do H_2 evoluido, injetou-se 30 ml de C_2H_2 , nos frascos contendo as raízes, incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram retiradas alíquotas, sendo a concentração do etileno produzido determinada em um cromatógrafo Perkin Elmer F 11, com

detector por ionização de chama, contendo Poropak N (80-100 mesh) e operada a 40°C utilizando N₂ como gás de arraste a um fluxo de 40 ml.min⁻¹.

A eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase foi calculada pelo parâmetro de Schubert & Evans (1976).

$$ER = 1 - ([H_2]/[C_2H_4])$$

- Coleta e análise do exsudato xilemático

As plantas foram cortadas na altura do nó cotiledonar para coleta do exsudato xilemático. A superfície do corte foi lavada com água destilada e seca com papel absovente, sendo conectada a uma bomba de vácuo. A seiva xilemática foi coletada em tubos do tipo 'vacuntainers'(5 ml) durante 10 minutos e imediatamente congelada, sendo mantida à -20°C até o momento das análises.

Os compostos nitrogenados foram determinados em alíquotas de 10 µl de seiva. A concentração de N-ureído na seiva xilemática foi determinada pelo método colorimétrico de Vogels & van der Drift (1970) baseado na hidrólise da alantoína e do ácido alantóico à glioxalato. A concentração de N-total foi determinada pelo método de fluxo contínuo FIA (Alves et al. 1993) adaptado para análise de seiva (anexo).

3.4 - RESULTADOS

- Acumulação de matéria seca e nitrogênio nas plantas

O efeito da estirpe de rizóbio na acumulação de biomassa na parte aérea da soja pode ser observado na fig. 1a. Durante os períodos decrescimento vegetativo e florescimento, não houve diferença significativa entre as estirpes no acúmulo de matéria seca na parte aérea. No entanto, a partir do período de formação de vagens, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apresentaram um peso de matéria seca significativamente maior do que as plantas inoculadas com a estirpe 29W.

Do mesmo modo, a inoculação com a estirpe CB 1809 promoveu um maior acúmulo de matéria seca nas raízes durante o período de formação de vagens (107 DAE) quando comparada com a estirpe 29W (fig. 1b).

De modo geral, as folhas, os pecíolos e as hastes apresentaram elevados teores de nitrogênio durante o período vegetativo, ocorrendo nas fases seguintes um declínio gradativo nas concentrações de N nesses órgãos com um incremento na concentração de N nas vagens (tab. 1). Não houve diferença entre os tratamentos na porcentagem de N nas folhas de soja, no entanto, observou-se diferenças na

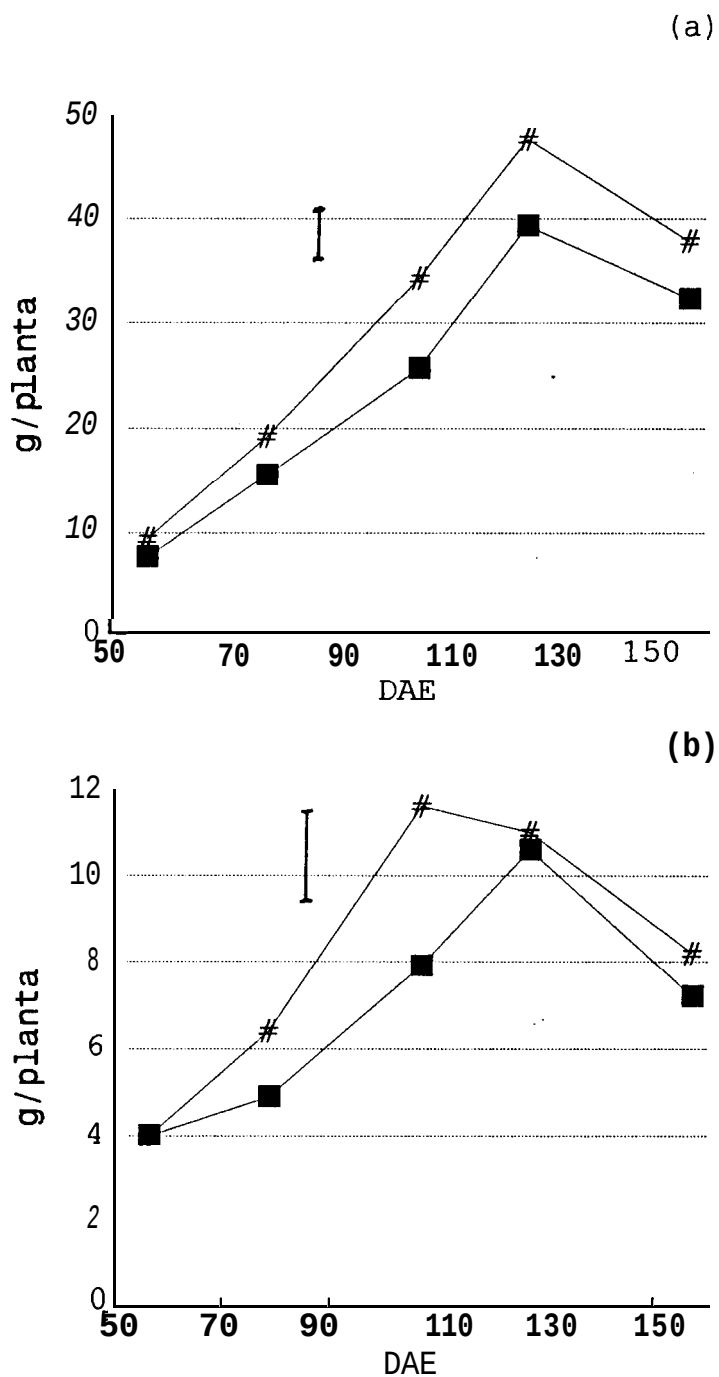


Figura 1- Matéria seca acumulada na parte aérea (a) e nas raízes (b) de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* (#) ou 29W (■) de *B. elkanii*. Média de 5 repetições. As barras verticais indicam DMS.

TABELA 1 - Porcentagem de N na parte aérea de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* ou 29W *B. elkanii*. Os resultados são médias de 5 repetições. Valores na mesma coluna seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes à $P=0,05$ (Teste de Duncan); n.d., valor não determinado.

Estirpes	% N folhas	% N haste	% N pecíolo	% N vagens
57 DAE (vegetativa)				
CB 1809	3,44 a	1,22 a	0,91 a	–
29W	3,13 ab	1,13 ab	0,88 a	–
79 DAE (florescimento)				
CB 1809	3,06 b	0,86 bcd	0,97 a	–
29W	3,14 ab	1,03 abc	0,90 a	–
107 DAE (formação de vagens)				
CB 1809	2,26 c	1,04 ab	0,71 b	n.d.
29W	2,15 cd	0,73 d	0,63 b	n.d.
128 DAE (enchimento de grãos)				
CB 1809	1,85 d	1,06 ab	0,73 b	2,64 a
29W	1,88 d	0,91 bcd	0,62 b	2,37 a
157 DAE (produção)				
CB 1809	1,08 e	0,75 d	n.d.	3,60 I
29W	1,26 e	0,77 cd	n.d.	3,40 I
cv %	11,70	19,97	10,70	n.d.
$1\% \text{ de N nas vagens} = \frac{(\%N \text{ grão} \times \text{massa grão}) + (\%N \text{ casca} \times \text{massa casca})}{\text{massa grão} + \text{massa casca}}$				

variação da concentração desse elemento ao longo do ciclo da planta. O teor de N nas folhas das plantas inoculadas com a CB 1809 declinou cerca de 70%, de 3,44g para 1,08g por 100g de matéria seca, enquanto as plantas inoculadas com a 29W, o declínio foi de 60%, de 3,13g para 1,26g por 100g de matéria seca entre os 57 e os 157 DAE. A concentração de N na haste foi de cerca de 1% durante todo o ciclo das plantas, sendo que, a inoculação com a estirpe CB 1809 promoveu uma maior concentração desse elemento durante o período de formação de vagens em comparação a estirpe 29W.

O acúmulo de N na parte aérea das plantas foi crescente durante todo o ciclo das plantas independente do tratamento de inoculação (fig. 2). A maior parte do N na parte aérea foi acumulado após o florescimento, sendo que, a taxa máxima de acumulação foi observada na primeira metade do enchimento de grãos. Durante o período vegetativo, as associações não diferiram quanto ao total de N acumulado na parte aérea. No período de formação das vagens, ocorreu uma redução na taxa de acumulação de N nas plantas inoculadas com a estirpe 29W. A partir desse estágio, a inoculação com a estirpe CB 1809 promoveu um aumento no total de N acumulado na parte aérea das plantas.

De modo similar, o efeito da estirpe de rizóbio no N acumulado, somente foi observado por ocasião da colheita final. As plantas inoculadas com a estirpe CB 1809

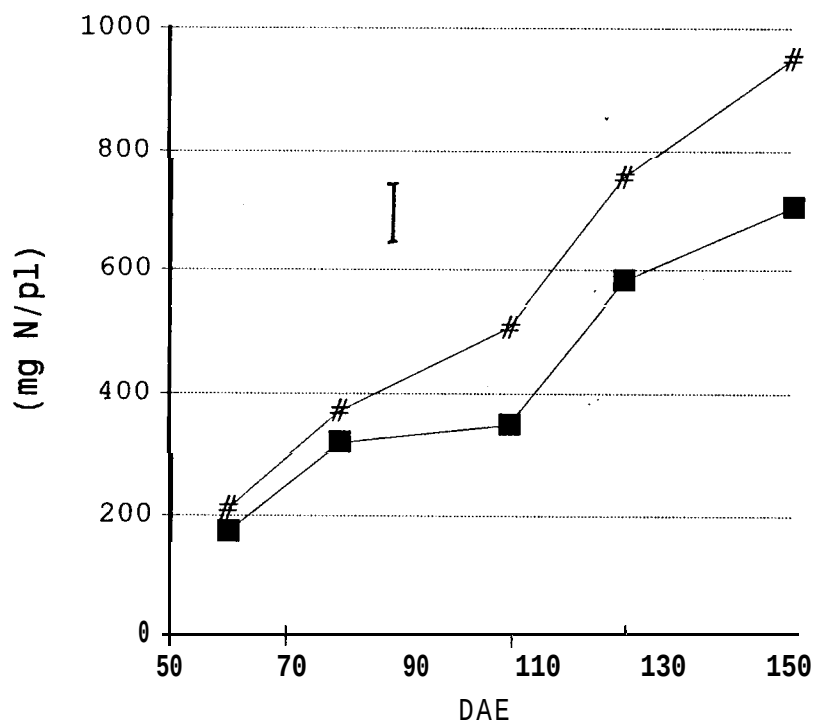


Figura 2 - Acúmulo de N na matéria seca de parte aérea da soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* (*) ou 29W (■) de *B. elkanii*. Média de 5 repetições. A barra vertical indica o DMS.

apresentaram uma maior proporção de N alocado para as vagens em comparação à estirpe 29W.

O N total proveniente da FBN estimado pelo método de diluição isotópica de ^{15}N em três estágios de desenvolvimento das plantas pode ser observado na tab. 2. Cerca de 96% e 94% do total do N acumulado na parte aérea das plantas inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W, respectivamente, foi proveniente da FBN. As associações não diferiram significativamente quanto ao total de N proveniente do solo e de reservas da semente (cerca de 40 mg de N/planta). No entanto, a simbiose com a CB 1809, obteve significativamente mais N da FBN quando comparada a 29W. Paralelamente, a inoculação com a estirpe CB1809 promoveu um aumento na quantidade de N-fixado nos grãos da soja.

Durante o período vegetativo, não houve diferença significativa entre as estirpes no total de N fixado, já a partir do enchimento de vagens, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apresentaram um total de N fixado significativamente maior do que as plantas inoculadas com a estirpe 29W (fig.3a). As estirpes não diferiram quanto a partição do N fixado ao longo do desenvolvimento das plantas (fig 3b). Por ocasião da coleta final, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 alocaram uma proporção maior de N-fixado para as vagens em comparação àquelas inoculadas com a

TABELA 2 - Porcentagem de N proveniente da FBN (%NF) e concentração de N (mg de N.planta⁻¹) proveniente da FBN em plantas de soja cv. Doko inoculada com estirpes CB 1809 de *B. japonicum* ou 29W de *B. elkanii*. Valores na mesma coluna seguidos de mesma letra não diferem à P=0,05 (Teste de Duncan).

79 DAE (florescimento)

Estirpes	%NF folhas	N folhas	%NF pecíolos	N pecíolos	%NF haste	N haste	N total
CB 1809	92,9 a	262,3	90,6	31,2 a	90,5 a	49,9	343,4
29W	91,2 b	222,2	90,8	20,2 b	88,9 b	47,0	289,4
cv%	0,81	9,9	3,71	4,9	0,41	24,4	11,0

128 DAE (enchimento de grãos)

Estirpe	%NF folha	N folhas	%NF pecíolo	N pecíolo	% NF haste	N haste	%NF vagem	N vagens	N total
CB 1809	95,6a	285,3	93,7	44,7	92,9	162,3	95,9	221,9	714,4 a
29W	94,2 b	255,7	92,6	32,1	92,4	113,1	92,9	144,2	545,1b
cv%	0,70	13,9	1,18	29,3	0,94	27,4	1,23	28,7	20,9

157 DAE (produção)

Estirpe	%NF folha	N folha	%NF haste	N haste	%NF grão	N grão	%NF casca vagem	N casca vagem	N total
CB 1809	96,5 a	5,9 b	94,0 a	101,9	96,9a	758,6 a	94,9	51,2	917,6 a
29 W	93,9 b	37,5 a	91,2 b	89,4	95,0 b	485,5 b	93,4	50,2	662,6 b
cv%	1,13	21,9	1,12	9,4	0,4	23,5	1,0	7,9	17,9

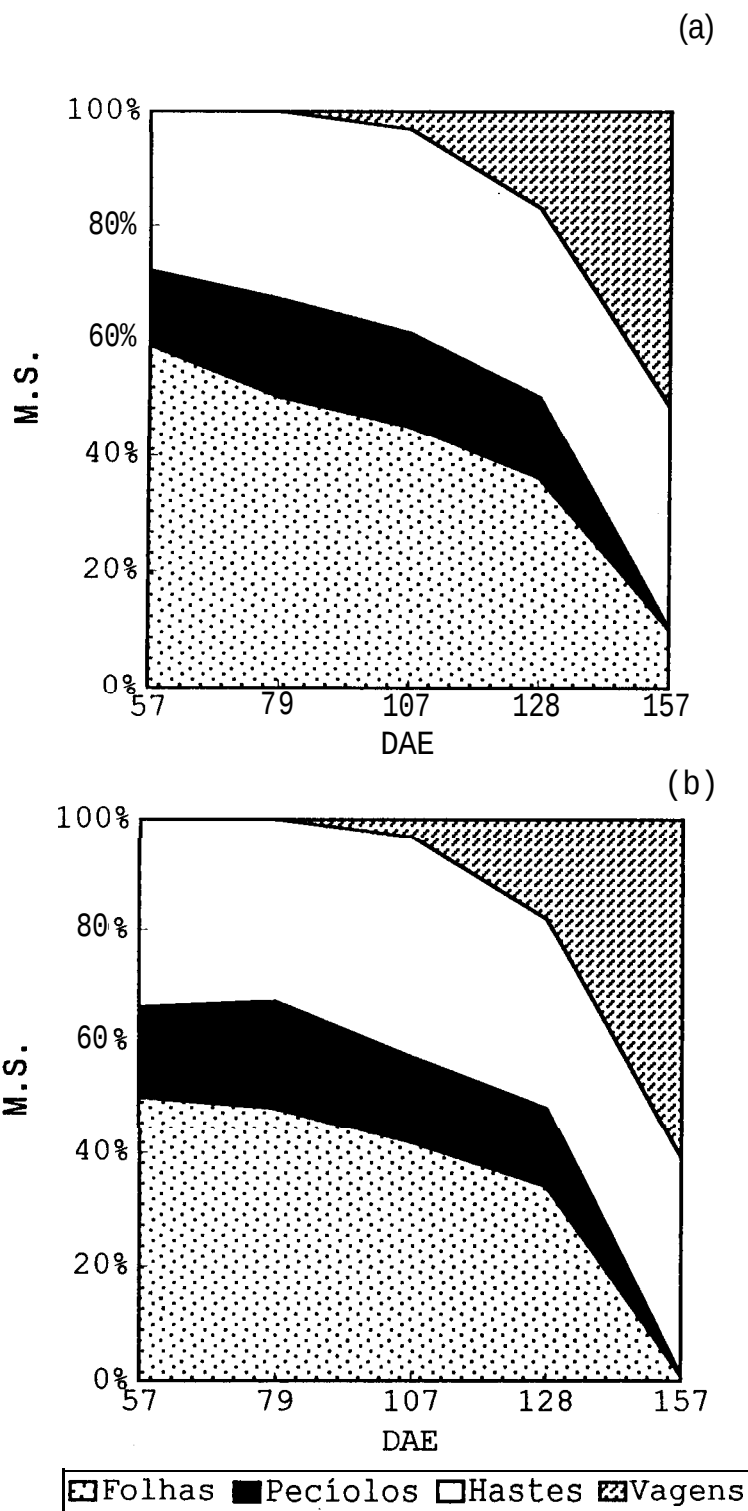


Figura 3 - Distribuição percentual da matéria seca acumulada na parte aérea de soja cv. Doko inoculada com as estirpes 29W de *B. elkanii* (a) ou CB 1809 de *B. japonicum* (b). Média de 5 repetições

29w. Esse efeito foi, provavelmente, devido a uma melhor remobilização do N fixado das folhas para as vagens.

- *Nodulação e atividade da nitrogenase*

As plantas inoculadas com a estirpe 29W apresentaram um marcado aumento na massa nodular após o florescimento, sendo que, na fase de enchimento de grãos as plantas deste tratamento apresentaram uma massa nodular cerca de três vezes superior a das plantas inoculadas com a CB 1809 (fig. 4). No entanto, embora as plantas inoculadas com a 29W tenham apresentado elevados níveis de ARA até o período do florescimento, houve uma drástica redução da atividade dos nódulos durante a fase de formação de vagens, ocorrendo uma retomada parcial na ARA no período de enchimento de grãos (fig. 5a). Consequentemente, a atividade da nitrogenase específica (C_2H_4/g nódulos secos) dessas plantas foi significativamente reduzida após o florescimento das plantas. A redução na ARA total dos nódulos formados pela 29W observada após o florescimento das plantas foi acompanhada por um declínio na ER dos nódulos formados nessa simbiose (fig. 5b).

Por outro lado, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 não, variaram significativamente o peso de nódulos durante o ciclo da planta (fig. 4). A ARA das

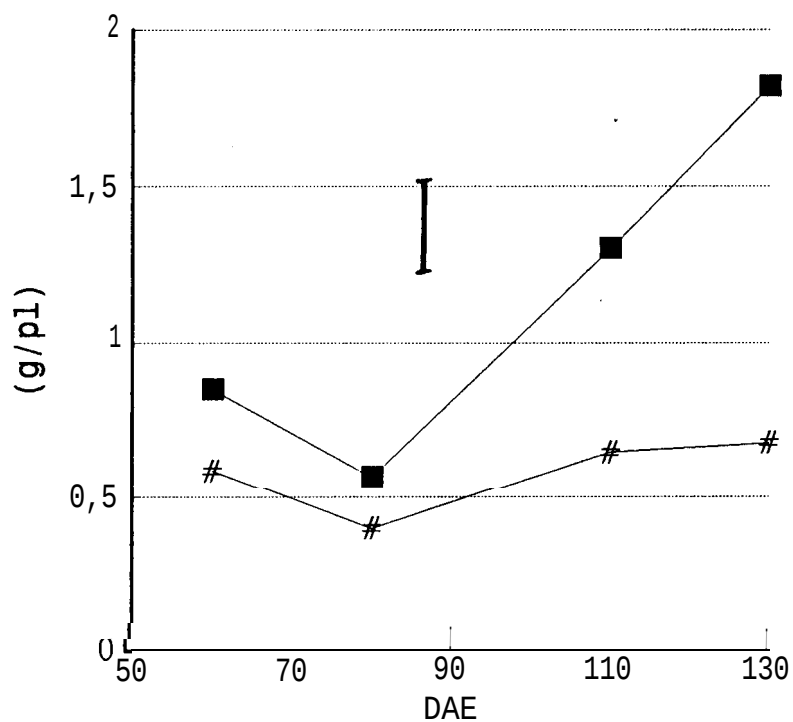


Figura 4 - Peso de nódulos secos de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* (X) ou 29W (■) de *B. elkanii*. Média de 5 repetições. As barras verticais indicam o DMS.

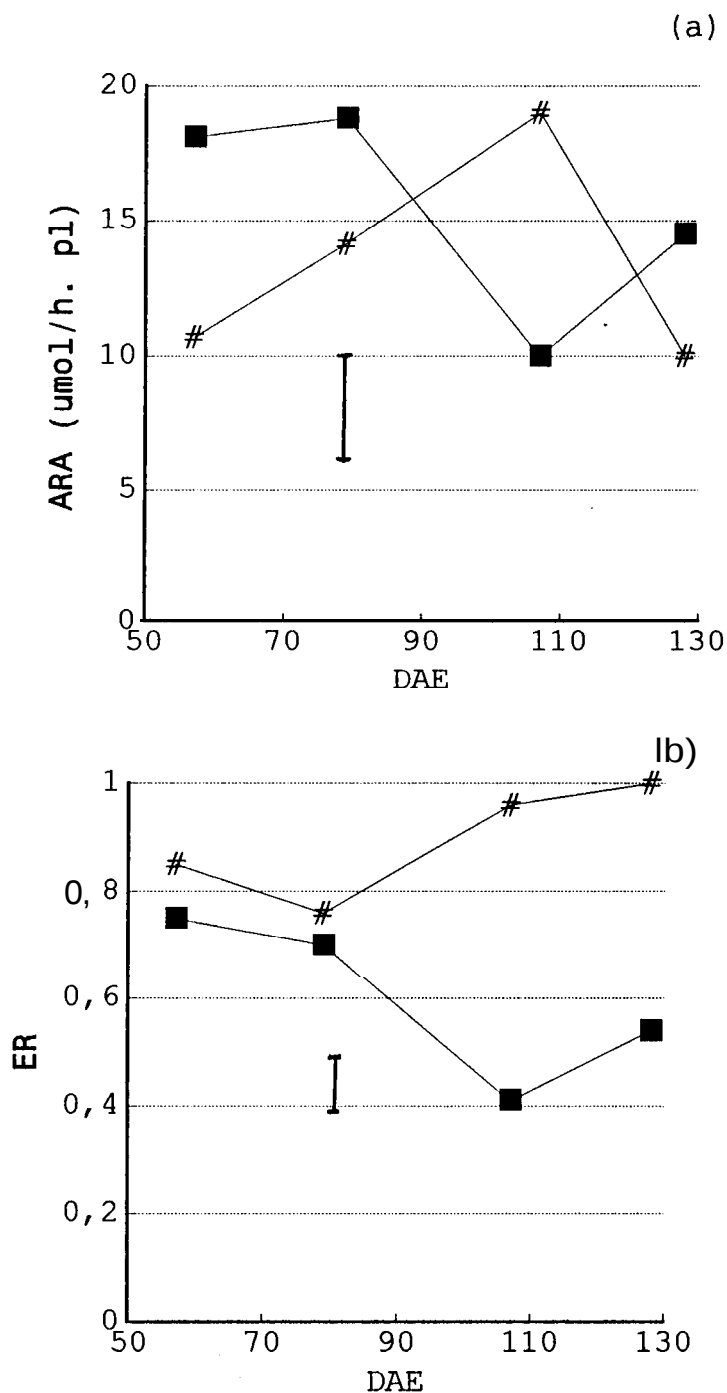


Figura 5 - ARA total (a) e ER (b) da soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* (X) ou 29W (■) de *B. elkanii*. Média de 5 repetições. As barras verticais indicam o DMS.

plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 foi máxima durante o período de formação de vagens (fig. 5a), sendo que, a atividade específica da nitrogenase dessas plantas foi máxima nos períodos de florescimento e formação de vagens. Paralelamente, os nódulos dessa simbiose apresentaram elevada ER, sendo que, no período de enchimento de grãos reciclaram todo o H_2 produzido pela nitrogenase (fig. 5b).

- Composição da seiva *xilemática* das plantas

Durante o período vegetativo, não houve efeito significativo da inoculação nas concentrações de N-ureído e N-total no exsudato xilemático (fig. 6a e 6b). A partir do florescimento, ocorreu um aumento gradativo nas concentrações de N-ureído e N-total na seiva das plantas inoculadas com a CB 1809. As concentrações foram máximas durante o período de formação de vagens. Já as plantas inoculadas com a estirpe 29W mantiveram constantes as concentrações de N-ureído e N-total transportados na seiva do xilema, ao longo do ciclo de crescimento.

A proporção de N-ureído transportados na seiva foi afetada pela estirpe de rizóbio inoculada (fig. 7). Após o florescimento, ocorreu um aumento gradativo na porcentagem de N-ureído na seiva das plantas inoculadas com a CB 1809. As plantas inoculadas com a 29W apresentaram baixa proporção

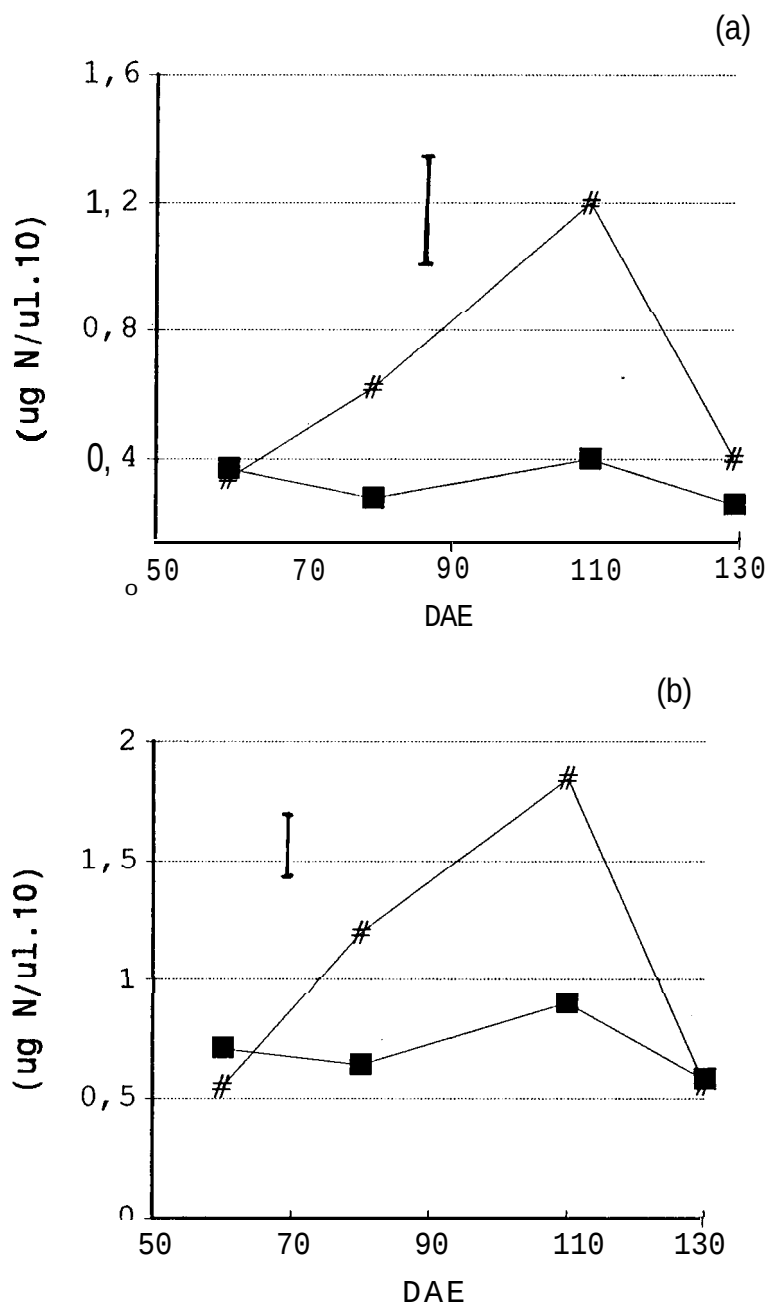


Figura 6- Concentração de N-ureído (a) e de N-total (b) na seiva xilemática da soja cv. Doko inoculada com as estirpes: CB 1809 de *B. japonicum* ($\times$) ou 29 W de *B. elkanii* (■). Média de 5 repetições. As barras verticais indicam o DMS.

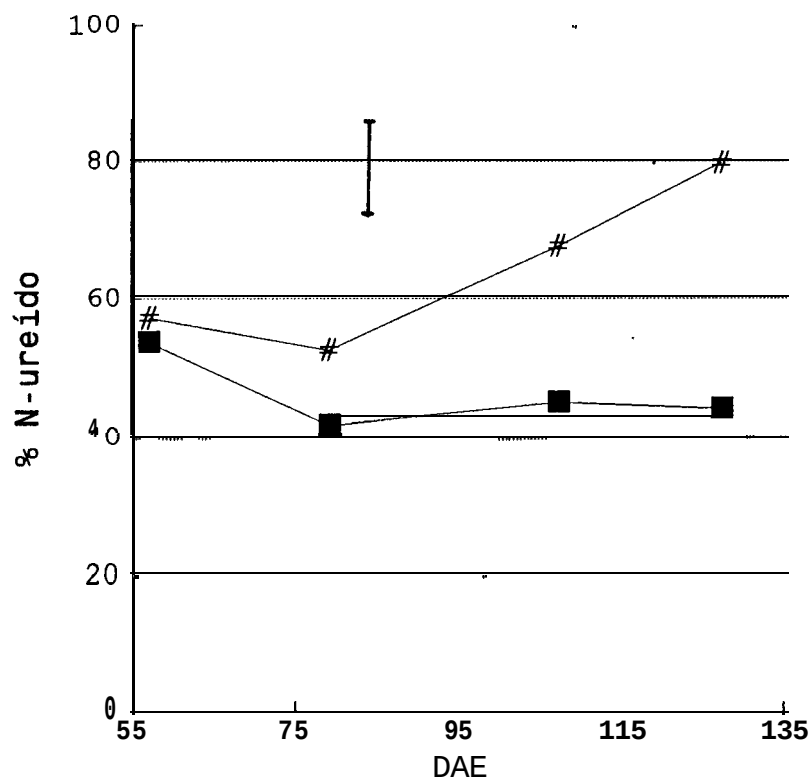


Figura 7 - Porcentagem de N-ureído na seiva xilemática de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* (#) ou 29W (■) de *B. elkanii*. Média de 5 repetições. A barra vertical indica o DMS.

de N-ureídos no exsudato xilemático, não sendo, afetada pela fase de desenvolvimento da soja. Durante a fase de formação e enchimento de vagens, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 transportaram significativamente mais nitrogênio sob a forma de ureídos na seiva xilemática.

- Acúmulo de nitrogênio nos grãos

A produção de grãos secos das plantas inoculadas com a CB 1809 foi cerca de 60% maior do que a das plantas inoculadas com a 29W (tab. 3). De modo similar, o N acumulado nas sementes das plantas inoculadas com a CB 1809 foi cerca 50% maior do que nas inoculadas com a 29W. A porcentagem de N proveniente da FBN (%NF) nos grãos das plantas inoculadas com a CB 1809 foi de 96,9%, enquanto, nas plantas inoculadas com a 29W o NF foi de 95%. A inoculação com a CB 1809 promoveu um aumento na quantidade de N acumulado nos grãos proveniente da FBN.

TABELA 3 - Produção de grãos (g/planta), porcentagem de N nos grãos, N acumulado nos grãos (mg N/planta), proporções de nitrogênio fixado (%NF) e o N acumulado proveniente da FBN nos grãos (mg N/planta) de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* ou 29W de *B. elkanii*. Médias de 5 repetições. Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem à $P=0,05$ (Teste de Duncan).

Estirpes	M. S. grão	% N grão	N grão	% NF	N _{FBN} grão
CB 1809	13,2 a	5,9	782,3 a	96,9 a	758,6 a
29W	8,3 b	6,2	511,2 b	95,0 b	485,5 b

A inoculação com a estirpe CB 1809 promoveu uma melhor remobilização da matéria seca acumulada no órgãos vegetativos para a produção de sementes de soja, resultando em melhor índice de colheita de biomassa para as plantas desse tratamento (tab. 4).

Houve uma melhor remobilização de N nas plantas inoculadas com a estirpe CB 1809. A inoculação com a CB 1809 promoveu um maior índice de colheita de N (total e fixado) em comparação com a 29W.

O maior acúmulo de biomassa e N observado nas plantas inoculadas com a CB 1809 após o florescimento

associada a uma melhor remobilização de biomassa e de N dos órgãos vegetativos para os reprodutivos refletiram em uma maior produção de grãos nas plantas desse tratamento.

TABELA 4 - Índice de colheita de biomassa; índice de colheita de N ($N_{\text{Solo}} + N_{\text{FBN}}$) e índice de colheita do N proveniente da FBN em soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 de *B. japonicum* e 29W de *B. elkanii*. Média de 5 repetições. Valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes não diferem à $P=0,05$ (Teste de Duncan).

Estirpes	Índice de colheita de biomassa	Índice de colheita de N ($N_{\text{Solo}} + N_{\text{FBN}}$)	Índice de colheita de N (N_{FBN})
CB 1809	0,35 a	0,82 a	0,84 a
29w	0,28 b	0,72 b	0,80 b

3.5 DISCUSSÃO

As plantas obtiveram cerca de 95% do N a partir da fixação de N_2 , independente da estirpe de rizóbio utilizada como inoculante. Boddey et al. (1984) estimaram que, em condições tropicais, a soja pode obter de 80 a 85% do N através da FBN. A elevada proporção de N fixado em ambas as simbioses, em relação ao total proveniente do solo observado em nosso estudo, pode ser em parte atribuído ao baixo conteúdo de N no solo associado a imobilização deste feita com a adição de palha de *Brachiaria*, antes da implantação do experimento.

A maior parte do N acumulado pelas plantas foi obtido através da fixação de N_2 após o período do florescimento. A elevada demanda de N pelas vagens parece estimular a FBN em soja (Hungria & Neves 1987). No entanto, a manutenção da FBN durante o período reprodutivo de soja e feijão depende da estirpe de rizóbio (Hungria & Neves 1987; Hungria & Franco 1988; Boddey & Hungria 1990). Durante o período reprodutivo, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 (*B. japonicum*) fixaram uma maior quantidade de N do que às inoculadas com a estirpe 29W (*B. elkanii*), refletindo a atividade dos nódulos nessas simbioses. As plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺ mantiveram elevados níveis de

atividade da nitrogenase até o período de enchimento de grãos (fig. 5), enquanto a atividade da nitrogenase e a eficiência dos nódulos formados pela estirpe Hup⁻ foi drasticamente reduzida após o período de florescimento das plantas. A redução da eficiência nodular das plantas inoculadas com a estirpe Hup⁻ foi acompanhada por um aumento acentuado na massa nodular (fig. 4). O estresse de N durante o período reprodutivo da soja, pode aumentar a translocação de carboidratos para as raízes, aumentando a massa nodular, reduzindo, no entanto, reduzir a disponibilidade de carboidratos para a formação e enchimento da vagens (Henry et al. 1992).

A proporção de N-ureído transportado na seiva xilemática de soja e feijão representa uma medida útil da proporção de N proveniente da FBN (Neves et al. 1985; Hungria & Franco 1988; Buttery et al. 1992). Herridge et al. (1988) indicaram o valor potencial dos ureídos na seiva como parâmetro nos programas de seleção de estirpes para aumento da fixação de N₂ em soja. O transporte do N fixado biologicamente como ureídos também têm sido relacionado a presença do sistema hidrogenase ativo (Neves et al. 1985; Hungria et al. 1989). As plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺ apresentaram, após o florescimento, um aumento gradual na porcentagem de N-ureído transportado na seiva xilemática, atingindo o máximo durante o período de enchimento de grãos,

enquanto nas plantas inoculadas com a estirpe Hup⁻, a relação N-ureído/N-total manteve-se baixa (fig. 8). O transporte do N fixado sob a forma de ureídos pode-se ser particularmente importante para a economia de carbono dos nódulos e para a manutenção de elevados níveis de FBN durante o período reprodutivo.

Paralelamente, os compostos nitrogenados não são uniformemente distribuídos entre os órgãos da parte aérea (Neves & Hungria 1987). A alantoina parece ser mobilizada preferencialmente para a nutrição das vagens, enquanto as amidas (asparagina e glutamina) permanecem retidas na haste (Mosquim & Sodek 1992). Dessa forma, a composição da seiva xilemática pode, indiretamente, afetar a partição do N para os grãos e a produção de sementes. Neves et al. (1985) observaram uma correlação positiva entre a proporção de N-ureído e o índice de colheita e a produção de sementes na soja nodulada. Da mesma forma, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apresentaram um maior índice de colheita e uma produção de grãos cerca de 60% maior do que as plantas inoculadas com a 29W, confirmando os resultados de Neves et al. (1985). O N proveniente da FBN parece concorrer mais efetivamente para a produção de sementes do que o N proveniente dos fertilizantes (Imsande 1986). Portanto, a melhor partição do N e maior produção de sementes das plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺ em comparação com a

estirpe Hup⁻ pode ser atribuído a manutenção de elevados níveis de fixação de N₂ durante o período reprodutivo nessa simbiose, associado a um aumento no transporte de N sob a forma ureídos para a parte aérea.

3.6 - CONCLUSÕES

- As plantas de soja obtiveram cerca de 95% do N através da FBN independente da estirpe de rizóbio inoculada, sendo a maior parte fixada após o florescimento da soja.
- A atividade dos nódulos formados pela estirpe Hup⁻ declinou após o período de florescimento das plantas, enquanto a atividade dos nódulos formados pela estirpe Hup⁺ foi máxima durante o período de formação de vagens.
- Durante o período reprodutivo, as plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺ transportaram uma maior proporção de N-ureído quando comparadas àquelas inoculadas com a estirpe Hup⁻.
- As plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺ fixaram mais N do que as plantas inoculadas com a estirpe Hup⁻.
- As plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺ apresentaram índice de colheita e produção de grãos mais elevados do que às inoculadas com a estirpe Hup⁻.

4 - CAPÍTULO II

EFEITO DA LUMINOSIDADE NA FBN, NA EFICIÊNCIA E NA
SENESCÊNCIA DOS NÓDULOS FORMADOS PELAS ESTIRPES CB 1809 DE
Bradyrhizobium japonicum E 29W DE *Bradyrhizobium elkanii*.

4.1 - RESUMO

Plantas de soja (*Glycine max* L. cv. Doko) inoculadas com as estirpes CB 1809 (Hup⁺) ou 29W (Hup⁻) de *Bradyrhizobium* foram cultivadas sob luminosidade plena ou sombreadas (70% de sombreamento), até o período de produção de sementes. As simbioses foram avaliadas quanto a nodulação, a fixação de N₂ o transporte e a partição do nitrogênio na parte aérea e a produção de grãos. A classificação dos nódulos por tamanho e coloração se correlacionou com a atividade da nitrogenase (ARA) das plantas. Nas plantas cultivadas sob luminosidade plena, a atividade da nitrogenase dos nódulos formados pela estirpe 29W declinou após o período de florescimento, enquanto, os nódulos formados pela estirpe CB 1809 apresentaram taxas crescentes de ARA até o período de enchimento de grãos. Essa diferença na atividade dos nódulos,

associada a uma maior proporção de N-ureído na seiva xilemática das plantas durante o período de formação e enchimento de vagens, refletiu em um maior acúmulo de matéria seca e nitrogênio na parte aérea e maior produção de grãos para as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809. Quando sombreadas, ambas as simbioses apresentaram taxas de ARA crescentes até o período de enchimento de grãos. Nesse tratamento, houve um aumento em relação ao controle, na porcentagem de N-ureído transportado na seiva xilemática da soja. O efeito da redução da luminosidade na ARA e no transporte do nitrogênio foi mais acentuado nas plantas inoculadas com a estirpe 29W em comparação com a CB 1809. Consequentemente, quando sombreadas, as estirpes não diferiram entre si quanto ao peso da matéria seca e N acumulados na parte aérea, nem quanto a produção de grãos. O sombreamento reduziu o acúmulo de matéria seca e nitrogênio na parte aérea e raízes das plantas, no entanto, promoveu uma melhor partição da matéria seca e do nitrogênio na parte aérea favorecendo a produção de sementes. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de se considerar os efeitos da luminosidade, em programas de seleção de estirpes para a manutenção de elevados níveis de fixação de nitrogênio, durante o período reprodutivo, na cultura da soja.

4.2 - INTRODUÇÃO

A formação e o funcionamento da associação simbiótica entre leguminosas e o rizóbio, envolve uma série de complexas mudanças estruturais e bioquímicas na planta hospedeira e no rizóbio, que resultam em uma simbiose na qual o bacteróide utiliza substratos de carbono fornecidos pelo hospedeiro, transferindo a amônia produzida para o citossol da célula vegetal infectada. O processo de fixação biológica de nitrogênio, nos nódulos radiculares, é dependente do suprimento contínuo de fotossintatos da parte aérea (Walsh et al. 1987). Os fotoassimilados são utilizados para a geração de poder redutor e ATPs para o sistema nitrogenase, para o crescimento e manutenção dos nódulos, e para o fornecimento de esqueletos de carbono, ATPs e poder redutor para a assimilação da amônia (Rawsthorne et al. 1980). O consumo de carboidratos por raízes noduladas é elevado, podendo representar de 30-50% do total de fotossintatos produzidos

pela planta hospedeira, nos períodos de ativo crescimento e assimilação de nitrogênio (Pate & Minchin 1980). Portanto, as variações nesse requerimento podem refletir diretamente na disponibilidade de carboidratos para a formação e o enchimento das vagens.

Durante a redução do N_2 à amônia, parte da energia e do poder redutor disponíveis para a nitrogenase, são utilizados para a redução de prótons à hidrogênio e sua posterior evolução dos nódulos. A evolução do hidrogênio consome um mínimo de 25% do fluxo total de elétrons destinados à nitrogenase (Eisbrener & Evans 1983), sem benefício aparente para o sistema simbiótico (Yates 1988). Esse processo representa uma ineficiência do sistema simbiótico. A eficiência relativa (ER) da nitrogenase, em termos de alocação de elétrons, é estimada pela proporção de elétrons perdidos pela evolução do H_2 sobre o total de elétrons disponíveis para a nitrogenase (Schubert & Evans 1976). Diversos fatores podem interferir na eficiência relativa da nitrogenase, tais como, o genótipo da planta hospedeira e do rizóbio (Keysey et al. 1981; Nelson & Child 1981); temperatura (Rainbird et al. 1983); pO_2 no ambiente do nódulo (Godfroy & Drevon 1991) e irradiância (Bethlenfalvay & Phillips 1979; Nelson 1983). Dentre esses fatores, a presença do sistema hidrogenase ativo (Hup^+) no bacteróide parece ser o mais importante.

O sistema hidrogenase oxida o H_2 produzido durante a redução do N_2 podendo recuperar parte da energia perdida no processo, aumentando a eficiência do sistema simbiótico (Schubert & Ryle 1980). A oxidação do, H_2 está associada a uma menor taxa de evolução do CO_2 devido a redução na oxidação de substratos de carbono nos nódulos radiculares (Layzell et al. 1979). Consequentemente, a atividade do sistema hidrogenase pode representar um mecanismo de conservação de carboidratos, que podem ser utilizados para o crescimento e a produção de grãos das leguminosas.

De modo similar, a síntese de compostos orgânicos nitrogenados utilizados para transporte dos nódulos consome esqueletos de carbono e energia fornecidas pelo hospedeiro. Os compostos exportados pelos nódulos envolvem substâncias de baixo peso molecular, ricas em nitrogênio, tais como ureídos, amidas, aminoácidos e pequenos peptídeos, que possibilitam o transporte do nitrogênio com um gasto mínimo de carbono (Neves 1981). Em plantas de soja, a maior parte do nitrogênio proveniente da fixação biológica de nitrogênio é transportada para a parte aérea como ureídos, alantoína e ácido alantóico (Atkins 1991). O transporte do nitrogênio fixado biologicamente sob a forma de ureídos pode representar uma vantagem energética para o sistema simbiótico, devido a relação C/N unitária desses compostos, associada a uma menor

energia de síntese (Atkins et al. 1978; Thomas & Schrader 1981).

Diversos trabalhos têm demonstrado a relação entre o metabolismo de hidrogênio e o metabolismo de ureídos nos nódulos radiculares de soja (Neves et al. 1985; Hungria et al. 1989) e feijão (Hungria & Neves 1987). A eficiência relativa (ER) foi positivamente correlacionada com a proporção de N-ureído no exsudato xilemático (Hungria & Neves 1987). Os resultados obtidos indicam que, as variações na eficiência relativa da nitrogenase são acompanhadas por variações na razão de N-ureído/N-total no exsudato xilemático dessas leguminosas. Nesse contexto, a presença da hidrogenase nos nódulos radiculares favoreceriam a economia de carbono, não somente pela oxidação do H_2 produzido pela nitrogenase, como também, pelo transporte de nitrogênio fixado como ureídos para a parte aérea. Portanto, a atividade da hidrogenase pode ser particularmente importante em condições de menor disponibilidade de fotossintatos para os nódulos, como em plantas cultivadas sob sombreamento ou durante o período de enchimento de vagens das leguminosas. A compreensão dos mecanismos e fatores que afetam o sistema simbiótico é importante para a seleção de simbioses que apresentem elevada capacidade de fixação de N_2 com um menor custo energético.

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito do sombreamento e da inoculação com as estirpes CB 1809 (Hup⁺) e 29W (Hup⁻) de *Bradyrhizobium* na eficiência da fixação de N₂ e no transporte de N-ureído na seiva xilemática ao longo do ciclo reprodutivo da soja, bem como, avaliar a relação desses fatores com a partição de nitrogênio e a produção de sementes das plantas.

4.3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no CNPAB-EMBRAPA, Itaguaí, RJ, nos períodos de dezembro de 1991 à abril de 1992.

Utilizou-se soja (*Glycine max* L.) cultivar Doko, inoculada com a estirpe CB 1809 (Hup⁺) de *B. japonicum* ou 29W de *B. elkanii*. As bactérias foram crescidas em meio definido de Vincent (1970) à 29°C por 7 dias, com agitação. As sementes foram esterilizadas com HgCl₂ 0,2% (Vincent 1970). A inoculação foi feita aos 7 dias após a emergência (DAE), colocando-se 1ml de inoculante (cerca de 10⁸ células) por plântula.

O cultivo das plantas foi feito em vasos plásticos com capacidade de 10 l, preenchidos com o horizonte superficial do solo PVA série Itaguaí, com as seguintes propriedades: pH (1:1, H₂O), 4,9; P disponível, 5,1 ppm; cátion trocáveis: K, 76 ppm; Ca, 1,8 meq/100 ml; Mg, 1,0 meq/100 ml; Al, 0,3 meq/100 ml. O solo foi previamente corrigido (30 dias antes do plantio) com o equivalente a 1000 kg/ha de calcáreo calcítico e incorporado com o equivalente a 0,5% de palha de *Brachiaria*. O solo foi mantido com umidade próxima à capacidade de campo até o

plantio quando foram adicionados aos vasos o equivalente a 80 kg de P_2O_5 /ha.

Por ocasião do plantio foram colocadas 4 sementes pré-germinadas/vaso cobrindo-se em seguida com uma fina camada de solo. Aos 7 DAE, foi feito o desbaste deixando-se 2 plantas/vaso.

Os vasos foram expostos ao ar livre e dispostas no sentido leste-oeste. O sombreamento dos vasos foi obtido através da cobertura das mesas com uma tela Sombrite. A intensidade luminosa foi determinada por um radiômetro Licor modelo SB 190, constatando-se que, a média do tratamento sombreado correspondia a 32,7% da luminosidade fotossinteticamente ativa, a qual sera referida como 30% da luminosidade total. Para que se obtivesse uniformidade da temperatura radicular entre os tratamentos de luminosidade, os vasos foram mantidos durante todo o ciclo de crescimento das plantas, imersos em tanque com água corrente, sendo constatado que a temperatura dos vasos (5 cm de prof.) não ultrapassou 30°C com diferença de aproximadamente 2°C entre os dois níveis de luminosidade.

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas, onde as parcelas representaram os níveis de luminosidade e as subparcelas as estirpes, com 4 repetições. As coletas foram realizadas aos 62 DAE (fase de florescimento); aos 74 DAE (fase de formação de vagens); aos

94 DAE (fase enchimento de grãos); e aos 117 DAE (colheita final e produção de grãos).

Análises

- Determinações de área foliar e matéria seca acumulada

A parte aérea das plantas foi separada em folhas e hastes (até o período de formação das vagens); e nos períodos seguintes, separou-se também as vagens e os grãos. Nas três primeiras coletas, as folhas foram mantidas sob temperatura baixa (4°C) até o momento da leitura fotométrica da área foliar (AF). A determinação da área foliar (AF) foi feita através do medidor de área foliar Li-Cor, modelo LI-3100. Em seguida, todo o material foi colocado para secar em estufa (60-70°C), até atingir peso constante. Posteriormente, foram pesados e moídos à 0,84 mm (20 mesh).

- Determinação do teor de nitrogênio total

As análises de N-total foram feitas em amostras de 200 mg de material de planta pelo método semimicro Kjeldhal

segundo Liao (1981) seguida de destilação e titulação segundo Bremner & Edwards (1965).

- Determinação da eficiência relativa (ER) dos nódulos

A evolução de H_2 foi determinada em raízes noduladas destacadas. As raízes noduladas foram colocadas em frascos de 250 ml. fechados hermeticamente, com rolhas do tipo "suba seal" e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram retiradas alíquotas (0,5 ml) da fase gasosa que foram analisadas em um analisador de H_2 de alta sensibilidade construído conforme descrito por Layzell et al. (1984).

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno (ARA) em raízes destacadas (Mague & Burris 1972). Após a determinação do H_2 evoluído, injetou-se 30 ml de C_2H_2 nos frascos contendo as raízes, incubando-se por 10 minuto à temperatura ambiente. Foram retiradas alíquotas (0,5 ml) para a análise. A concentração do etileno produzido foi determinada em um cromatógrafo de gases Perkin Elmer F 11, com detector por ionização de chama, contendo Poropak N (80-100 mesh) e operada a 40°C utilizando N_2 como gás de arraste à um fluxo de 40 ml.min⁻¹.

A eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase foi calculada pelo parâmetro de Schubert & Evans (1976).

$$ER = 1 - ([H_2]/[C_2H_4])$$

Após essas análises, os nódulos foram destacados das raízes e ambos foram colocados para a secagem em estufa (60-70°C) e posteriormente, pesados.

- Coleta e análise do exudato xilemático

As plantas foram cortadas na altura do nó cotiledonar, para coleta do exsudato xilemático. A superfície do corte foi lavada com água destilada, seca com papel absorvente e conectada a uma bomba de vácuo. A seiva xilemática foi coletada em tubos do tipo 'vacuntainer' (5 ml) durante 10 minutos e imediatamente congelada, sendo mantida à -20°C até o momento das análises.

Os compostos nitrogenados foram determinados em alíquotas de 10 ml de seiva. A concentração de N-ureído na seiva xilemática foi determinada pelo método colorimétrico de Vogels & van der Drift (1970). Para determinar a concentração de N-total na seiva utilizou-se o método microkjeldahl seguido de análise colorimétrica (Boddey et al. 1987).

4.4 - RESULTADOS

- *Área foliar e Área foliar específica*

A área foliar das plantas não foi significativamente afetada pelos níveis de luminosidade nem pelo tratamento de inoculação, embora tenha ocorrido uma tendência de redução da área foliar com a redução da luminosidade (figura 1). A máxima expansão foliar ocorreu no período de formação de vagens, aos 74 DAE em ambos os níveis de luminosidade. A área foliar específica (área foliar/peso de folhas) foi maior nas plantas sombreadas devido a menor massa de folhas consequente da redução da luminosidade.

- *Crescimento e acúmulo de nitrogênio nas plantas*

De modo geral, o sombreamento das plantas reduziu o peso de matéria seca total acumulada na parte aérea. Neste parâmetro, houve interação entre os níveis de luminosidade e as estirpes de *Bradyrhizobium* (tabela 1). O efeito da redução da luminosidade foi mais acentuado nas plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 quando comparado às plantas inoculadas com a 29W.

No tratamento controle, a matéria seca total acumulada na parte aérea não diferiu significativamente entre as simbioses,

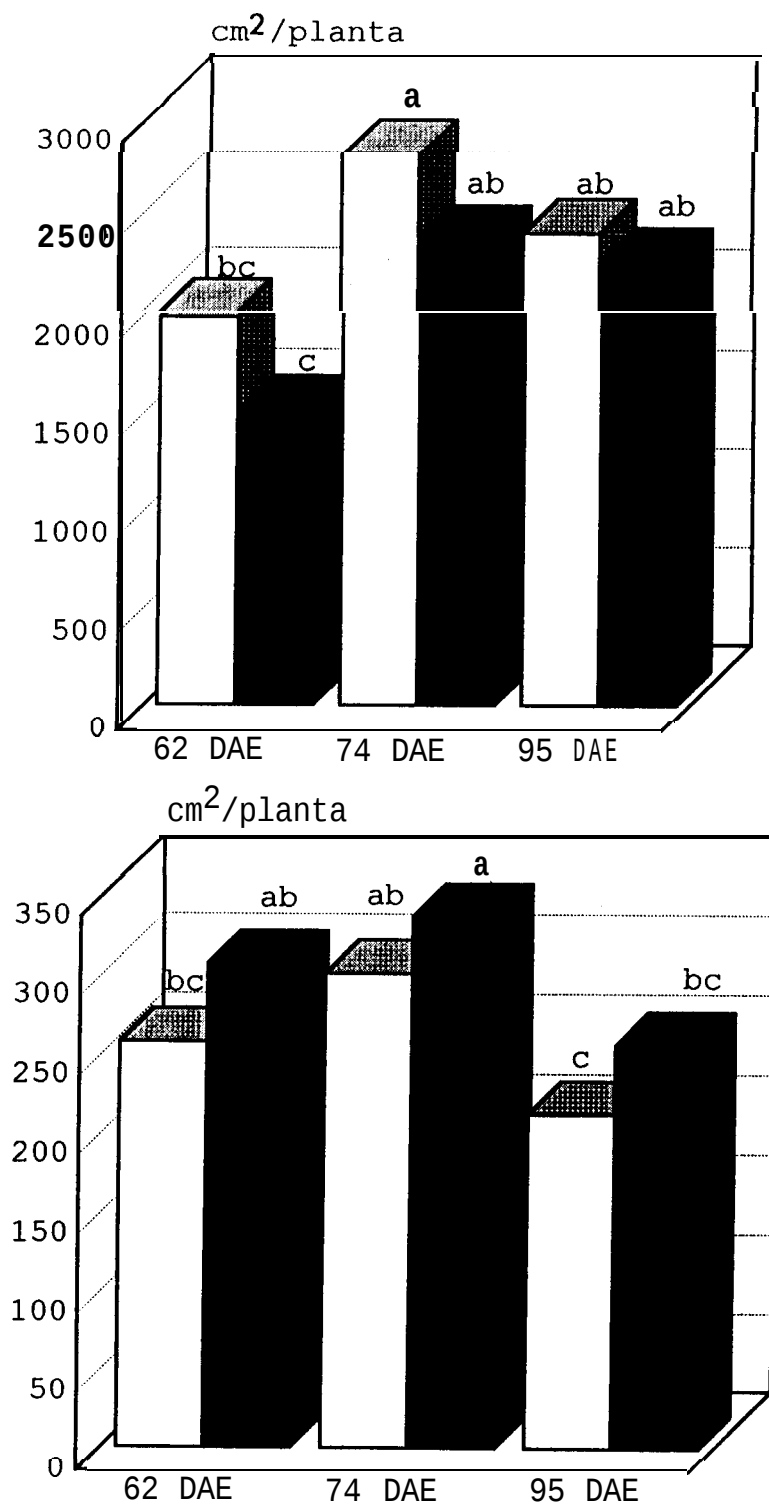


Figura 1 - Efeito da luminosidade na área foliar (A) e na área foliar específica (B) de soja cv. Doko inoculada com estirpes *Bradyrhizobium*. Barras verticais com mesma letra não diferem à $P=0,05$.

Tabela 1 - Efeito da luminosidade e das estirpes de *Bradyrhizobium* no acúmulo de matéria seca nas folhas, na haste, nas vagens e na raiz (g/planta) de soja cv. Doko. Os resultados são média de 4 repetições. Médias na mesma coluna relativas a mesma coleta e seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes à $P=0,05$.

Estirpes	Peso folhas	Peso haste	Peso vagens	Peso parte aérea	Peso raízes
62 DAE (florescimento)					
Luminosidade total					
CB 1809	7,05	10,38 a	-	17,43 ab	7,10 a
29 W	8,40	10,81 a	-	19,21 a	5,66 a
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
CB 1809	5,32	4,99 b	-	10,31 ab	3,52 b
29 W	4,49	4,29 b	-	8,78 b	3,02 b
cv%	28,73	28,32	-	27,83	11,48
74 DAE (formação de vagens)					
Luminosidade total					
CB 1809	10,73	16,05 a	-	26,78	6,87 a
29 W	9,51	14,34 ab	-	23,85	6,97 a
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
CB 1809	7,00	7,85 b	-	14,85	3,44 b
29 W	7,49	8,64 ab	-	16,13	3,97 b
cv%	37,26	28,99	-	32,13	22,17
95 DAE (enchimento de grãos)					
Luminosidade total					
CB 1809	12,75 a	21,14 a	5,87	39,76 a	10,50 a
29 W	9,98 b	15,88 b	4,29	29,99 b	9,80 a
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
CB 1809	8,19 b	8,69 c	5,21	22,09 c	5,00 b
29 W	8,42 b	9,37 c	6,20	24,98 c	5,16 b
cv%	8,38	13,49	16,62	10,37	18,12

até o período de formação de vagens (aos 74 DAE). Após essa fase, as plantas inoculadas com a CB 1809 acumularam significativamente mais matéria seca do que as inoculadas com a 29w. Com o sombreamento, não houve efeito significativo do tratamento de inoculação.

Quanto ao sistema radicular, o sombreamento das plantas reduziu o peso das raízes secas em todas as fases do desenvolvimento das plantas em ambas as simbioses (tabela 1).

O sombreamento alterou a partição dos assimilados entre os órgãos da parte aérea da soja (figura 2). Pode-se observar que, de modo geral, nesse tratamento houve uma redução no total de matéria seca acumulada nas hastes e um aumento proporcional na acumulação de matéria seca nas folhas e, posteriormente, nas vagens. O tratamento de inoculação não afetou significativamente a partição da biomassa na parte aérea da soja.

No período de florescimento, a concentração de nitrogênio nos tecidos da planta não variou significativamente entre os tratamentos (tabela 2). Na fase de formação de vagens, o sombreamento promoveu um aumento, em relação ao controle, da concentração de N nas folhas das plantas inoculadas com a estirpe CB 1809. Durante o período de enchimento de grão, observou-se uma maior concentração de N nas hastes das plantas sombreadas. Não houve efeito significativo do tratamento de luminosidade nem da inoculação no teor de nitrogênio nas raízes.

Tabela 2 - Efeito da luminosidade e da estirpe de *Bradyrhizobium* na porcentagem de nitrogênio nas folhas, na haste, nas vagens e na raiz da soja cv. Doko. Os resultados são médias de 4 repetições. Médias na mesma coluna relativas a mesma coleta e seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes à $P=0,05$.

Estirpes	% N nas folhas	% N na haste	% N nas raízes	% N nas vagens
62 DAE (florescimento)				
Luminosidade total				
CB 1809	2,76	0,855	1,050	-
29 W	2,93	0,914	0,961	-
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	3,14	1,013	1,187	-
29 W	3,16	0,981	1,072	-
cv%	8,93	8,80	11,48	-
74 DAE (formação de vagens)				
Luminosidade total				
CB 1809	2,58 b	0,92	1,10	-
29 W	2,53 b	0,90	1,17	-
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	3,06 a	0,94	1,23	-
29 W	2,82 ab	0,89	1,15	-
cv%	7,45	5,35	17,42	-
95 DAE (enchimento de grãos)				
Luminosidade total				
CB 1809	2,00	1,00 b	1,00	2,63
29 W	2,13	0,93 b	1,01	2,75
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	2,35	1,34 a	1,14	2,89
29 W	2,21	1,13 ab	1,14	3,10
cv%	8,55	9,89	18,12	7,49

De modo geral, o acúmulo de nitrogênio total na parte aérea (tabela 3) acompanhou a acumulação de biomassa. Com a redução da luminosidade, houve uma tendência de diminuição nos teores de nitrogênio acumulados na parte aérea das plantas em ambas as associações, até o período de formação de vagens. Após essa fase, o sombreamento das plantas inoculadas com a CB 1809 resultou em uma redução significativa no N-total acumulado na parte aérea. O total de nitrogênio acumulado pelas plantas inoculadas com a 29W foi similar em ambos os tratamentos de luz. A estirpe CB 1809, no tratamento controle, apresentou um maior acúmulo de N na parte aérea quando comparada a estirpe 29W, no entanto, no sombreamento não houve diferença significativa entre as estirpes nesse parâmetro.

O teor de N acumulado nas raízes foi menor em plantas submetidas ao sombreamento do que nas plantas do controle durante o ciclo da planta em ambas as simbioses (tabela 3)

- Nodulação e atividade da nitrogenase das plantas

O sombreamento das plantas reduziu a massa nodular de ambas as associações, até o período de formação de vagens (tabela 4) - Após essa fase, a massa nodular das plantas sob sombreamento, foi aumentada, sendo que, esse efeito foi mais acentuado na associação com a 29W.

Tabela 3 - Efeito da luminosidade e da estirpe de *Bradyrhizobium* no acúmulo de N (mg N/planta) nas folhas, na haste, nas vagens, na parte aérea total e na raiz de soja cv. Doko. Os resultados são médias de 4 repetições. Médias na mesma coluna relativas a mesma coleta e seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes à $P=0,05$.

Estirpes	N folhas	N haste	N vagens	N parte aérea	N raízes
62 DAE (florescimento)					
Luminosidade total					
CB 1809	198,97 a	88,09 ab	-	287,05	74,07 a
29 W	274,61 a	102,93 a	-	377,54	55,39 ab
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
CB 1809	169,2 ab	52,8 ab	-	222,0	40,0 bc
29 W	141,7 b	42,7 b	-	184,4	32,3 c
cv%	25,5	35,5	-	27,5	22,4
74 DAE (formação de vagens)					
Luminosidade total					
CB 1809	283,9	154,8 ab	-	438,7	75,3 a
29 W	243,4	199,6 a	-	443,0	81,8 a
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
CB 1809	217,3	78,0 b	-	295,3	42,2 b
29 W	225,93	79,7 b	-	305,7	45,5 b
cv%	38,7	38,0	-	27,5	25,9
95 DAE (enchimento de grãos)					
Luminosidade total					
CB 1809	252,8 a	205,5 a	155,5 ab	613,6 a	103,0 a
29 W	209,1 ab	51,0 ab	122,3 b	482,3 b	98,5 a
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
CB 1809	189,8 b	115,2 b	149,9 ab	455,0 b	52,7 b
29 W	204,0 ab	102,2 b	194,4 a	500,0 b	59,4 b
cv%	11,0	19,2	19,9	6,9	16,8

Tabela 4- Efeito da luminosidade e da estirpe de *Bradyrhizobium* na nodulação (g de nódulos/planta), na ARA total ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h. planta}$), na ARA específica ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h. g nódulos}$) e na eficiência relativa (ER) da soja cv. Doko. Os resultados são médias de 4 repetições. Médias na mesma coluna relativas a mesma coleta e seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes à $P=0,05$.

Estirpes	Peso nódulos	ARA total	ARA específica	ER
62 DAE (florescimento)				
Luminosidade total				
CB 1809	0,305 b	6,73	21,84 ab	0,93 a
29 W	0,930 a	11,57	11,84 b	0,33 b
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	0,275 b	8,75	28,70 a	0,94 a
29 W	0,390 b	7,33	18,03 ab	0,42 b
cv%	39,41	43,19	29,81	21,99
74 DAE (formação de vagens)				
Luminosidade total				
CB 1809	0,348 b	10,15	29,53 a	n.d.
29 W	0,766 a	6,27	8,22 b	n.d.
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	0,267 b	10,27	37,31 a	n.d.
29 W	0,609 ab	13,13	21,85 ab	n.d.
cv%	33,26	52,22	35,11	
95 DAE (enchimento de grãos)				
Luminosidade total				
CB 1809	0,433 b	12,88 ab	30,24 a	0,98 a
29 W	0,618 b	5,99 b	9,98 b	0,84 b
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	0,551 b	12,21 ab	23,47 a	0,97 a
29 W	1,073 a	21,99 a	20,41 ab	0,78 b
cv%	24,76	39,20	27,47	3,78

No tratamento controle, as plantas inoculadas com a 29W apresentaram uma massa nodular superior a das plantas inoculadas com a estirpe CB 1809. No sombreamento, as associações não diferiram significativamente nesse parâmetro, durante o período o florescimento das plantas. Nas fases seguintes, o peso de nódulos das plantas inoculadas com a 29W foi gradualmente aumentado. Aos 95 DAE, as plantas inoculadas com a 29W apresentavam o dobro da massa nodular das inoculadas com a CB 1809.

A distribuição percentual das classes de nódulos por tamanho ao longo do ciclo da planta, não foi significativamente afetada pelos tratamentos de inoculação ou de luminosidade. Independente dos tratamentos a maior parte dos nódulos das apresentaram de 1-3 mm de diâmetro (figura 4). Analisando a distribuição percentual das classes de nódulos por coloração (figura 5) feita nos nódulos acima de 3 mm (cerca de 24%), pode-se observar que as plantas sombreadas apresentaram durante o florescimento cerca de 70% dos nódulos ativos (róseos), enquanto, no tratamento controle nessa fase, menos de 20% dos nódulos analisados, em ambas as simbioses, estavam em plena atividade. Após essa fase, somente cerca de 20% dos nódulos dessa classe mantiveram-se róseos sob sombreamento. As plantas expostas a luminosidade plena apresentaram cerca de 80% dos nódulos dessa classe em senescimento (marrons) ou senescidos desde a primeira coleta aos 62 DAE.

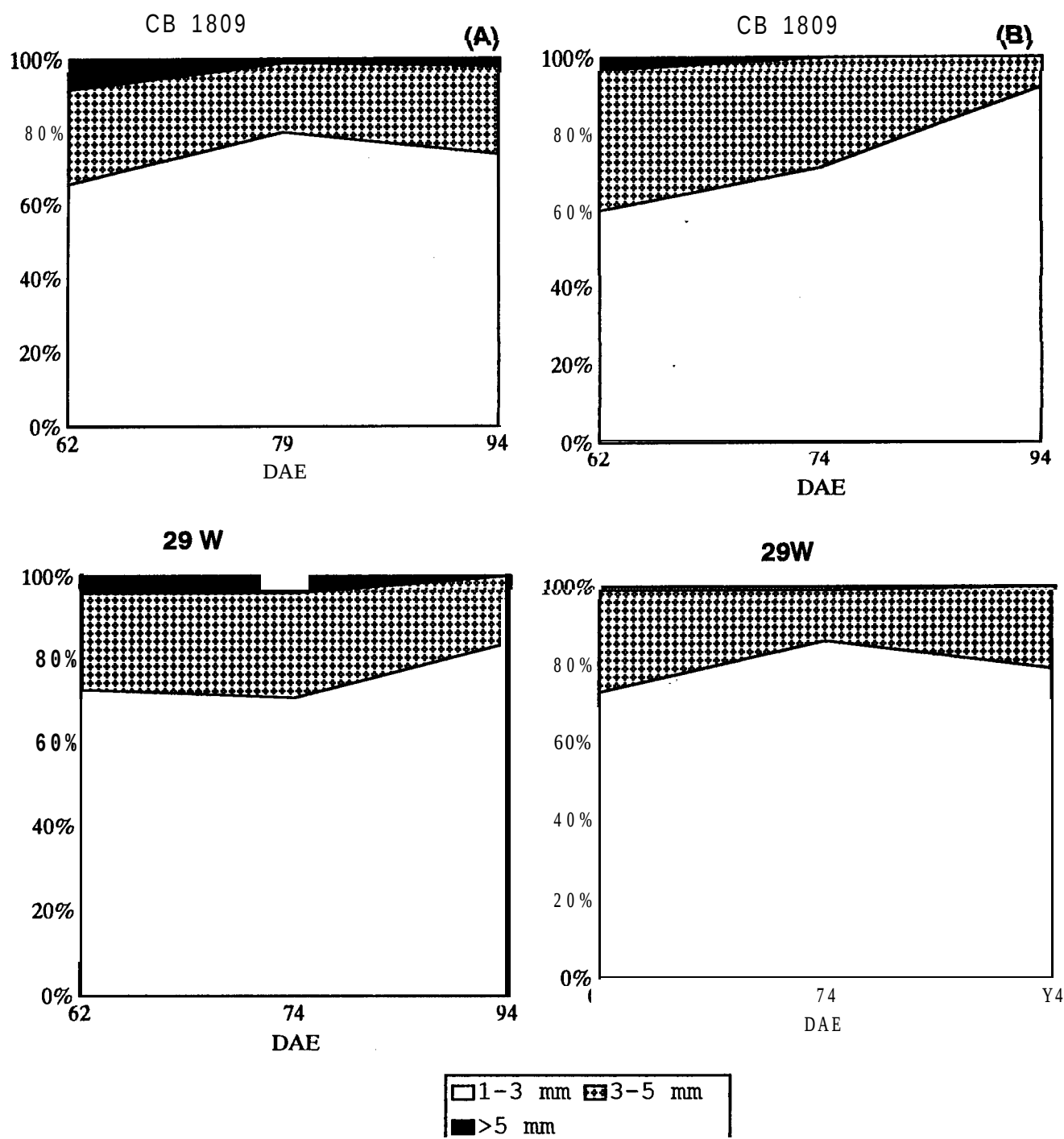


Figura 4 - Distribuição percentual das classes de nódulos por tamanho: (A) luminosidade total ou (B) sombreado (70% de sombreadamento). Nódulos de soja cv. Doko inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium*.

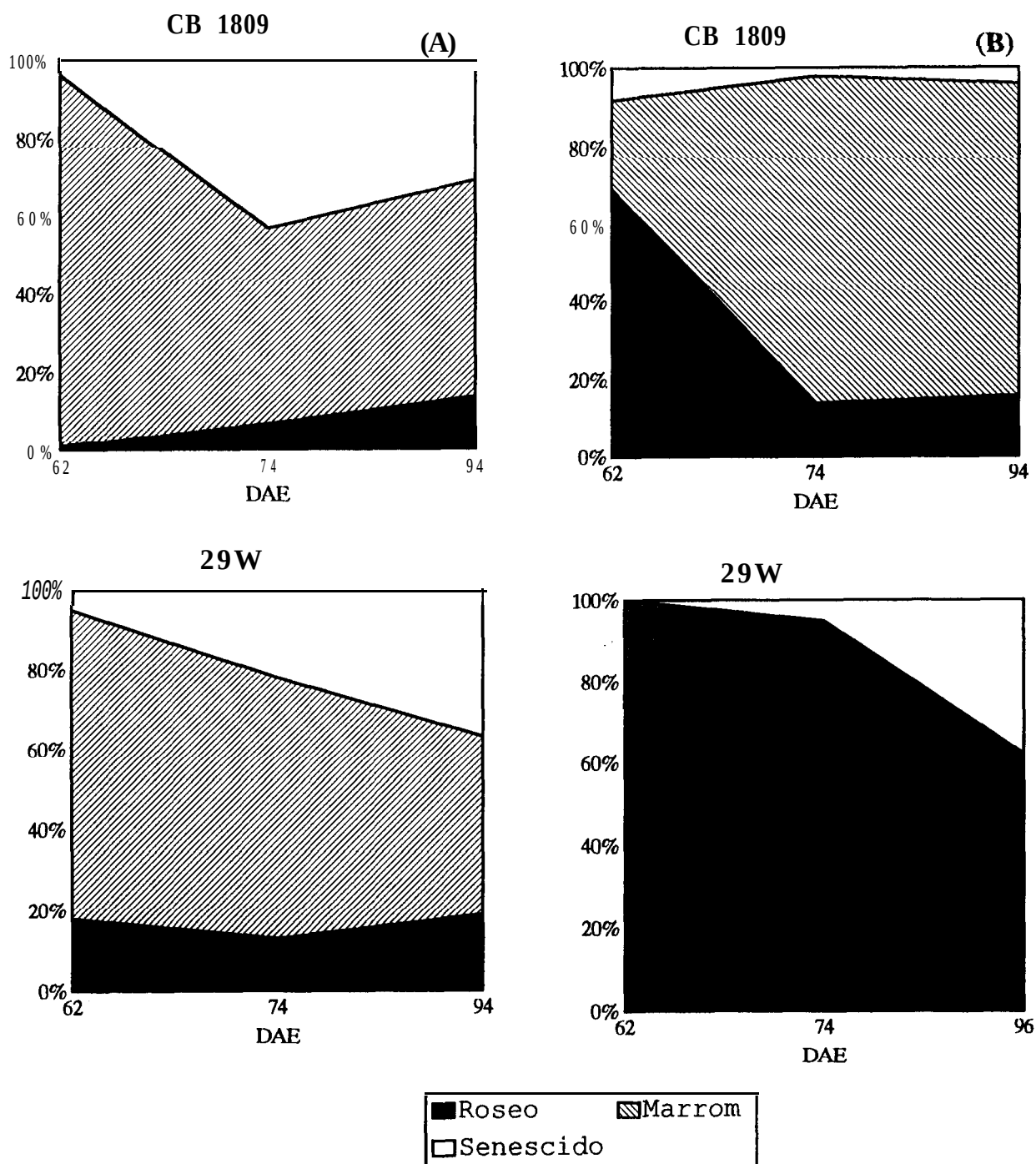


Figura 5 - Distribuição percentual das classes de nódulos por coloração: (A) luminosidade total ou (B) sombreado (70% de sombreado). Nódulos de soja cv. Doko inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Quanto à atividade da nitrogenase, houve efeito da interação entre os níveis de luminosidade e a estirpe de *Bradyrhizobium* (tabela 4) observado nas plantas colhidas aos 95 DAE. O sombreamento induziu em relação ao tratamento controle, um aumento na atividade da nitrogenase total ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{planta}$) e específica ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{grama de nódulos}$ das plantas inoculadas com a estirpe 29W. O efeito da luminosidade na atividade da nitrogenase não foi observado nas plantas inoculadas com a estirpe CB 1809, não sendo observadas diferenças entre as estirpes na atividade específica da nitrogenase, nas plantas sombreadas. No tratamento controle, a inoculação das plantas com a estirpe CB 1809 refletiu em uma tendência de aumento da atividade da nitrogenase ao longo do ciclo das plantas. No entanto, a tendência observada nas plantas inoculadas com a estirpe 29W, nesse tratamento foi de declínio na atividade dos nódulos. De modo similar, a partir do florescimento, a atividade específica da nitrogenase das plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 foi maior quando comparada a estirpe 29W.

Independente dos níveis de luminosidade, os nódulos formados pela estirpe CB 1809 reciclaram praticamente todo o H_2 produzido pela nitrogenase durante todo o ciclo da cultura. Os nódulos formados com a estirpe 29W apresentaram eficiência relativa muito baixa, durante a fase de florescimento. Aos 95 DAE esses nódulos apresentaram níveis de eficiência mais elevados do que os teoricamente esperado para uma estirpe Hup⁻

(ER= 0,84 no controle; de 0,78 no sombreamento). Esses resultados indicam a possível ocorrência de alguma falha metodológica (tabela 4).

- *Composição da seiva xilemática e porcentagem de N-ureído*

O efeito dos níveis de luminosidade e da inoculação com as estirpes CB 1809 e 29W na composição da seiva xilemática das plantas, pode ser observado na tabela 5.

A máxima concentração de N-total e N-ureído na seiva xilemática ocorreu durante a fase de formação de grãos. Não foi observado efeito significativo dos tratamentos na concentração de N-ureído e N-total na seiva xilemática, até os 74 DAE. Durante a fase de enchimento de grãos, as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apresentaram uma maior concentração de N-total e N-ureídos na seiva xilemática quando comparada a estirpe 29W, nos dois níveis de luminosidade.

Independentemente do tratamento de inoculação, o sombreamento das plantas induziu a um aumento na proporção de nitrogênio transportado como ureídos na seiva xilemática da soja. No entanto, o efeito da luminosidade no transporte de N-ureído na seiva foi mais acentuado nas plantas inoculadas com a 29W.

As diferenças entre as estirpes no transporte do nitrogênio somente foram observadas em plantas crescidas sob luminosidade total. Nesse tratamento, a inoculação das plantas

Tabela 5 - Efeito dos níveis de luminosidade e estirpes de *Bradyrhizobium* na concentração de N-ureído, no N-total (ug N/ul seiva.10) e na porcentagem de N-ureído na seiva xilemática da soja cv. Doko. Os resultados são médias de 4 repetições. Médias na mesma coluna relativas a mesma coleta e seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes à $P=0,05$.

Estirpes	Concentração de N-ureído	Concentração de N-total	% de N-ureído
62 DAE (florescimento)			
Luminosidade total			
CB 1809	0,27	0,47	55,4
29 W	0,28	0,55	47,9
Sombreamento (30% da luminosidade total)			
CB 109	0,29	0,65	43,6
29 W	0,38	0,64	59,2
cv%	48,3	30,3	22,3
74 DAE (formação de vagens)			
Luminosidade total			
CB 1809	0,81	1,13	70,3 ab
29 W	0,46	0,92	51,4 b
Sombreamento (30% da luminosidade total)			
CB 1809	1,46	1,98	77,1 a
29 W	1,32	1,77	76,6 a
cv%	60,8	65,7	17,3
95 DAE (enchimento de grãos)			
Luminosidade total			
CB 1809	0,82 a	1,09 a	54,7 b
29 W	0,21 b	0,49 b	39,9 c
Sombreamento (30% da luminosidade total)			
CB 1809	0,76 a	1,13 a	68,8 a
29 W	0,28 b	0,41 b	62,6 ab
cv%	25,4	27,4	10,3

com a estirpe CB 1809 resultou em um aumento na proporção de nitrogênio transportado como ureídos na seiva, em comparação a 29W, durante as fases de formação e enchimento de vagens.

A porcentagem máxima de N-ureído foi transportada na seiva xilemática durante o período de formação de vagens, em ambas as simbioses.

- Produção e teor de N nos grãos

O sombreamento aumentou a produção de grãos em ambas as associações, sendo que, esse efeito foi mais acentuado nas plantas inoculadas com a estirpe 29W (cerca de 80% de aumento) do que com a CB 1809 (cerca de 23% de aumento). A maior produção de grãos dessas plantas em comparação ao controle, foi decorrente, em grande parte, de uma melhor partição de matéria seca e de N favorecendo os grãos. O sombreamento promoveu um aumento no índice de colheita de biomassa nas duas associações (tabela 6).

No controle, a inoculação das plantas com a estirpe CB 1809 promoveu um aumento de 66% na produção de grãos em comparação a estirpe 29W, desaparecendo esse efeito nas plantas sombreadas. Não houve diferença entre as estirpes de rizóbio no índice de colheita de biomassa das plantas em ambos os níveis de luminosidade.

De modo similar, o sombreamento das plantas aumentou o N-total acumulado nos grãos. Ocorreu uma melhor remobilização do

Tabela 6 - Efeito da luminosidade e das estirpes de *Bradyrhizobium* na produção de grãos (g/planta), no nitrogênio acumulado nos grãos, no índice de colheita de biomassa (IC= massa de grãos/massa de parte aérea) e no índice de colheita de nitrogênio (IC de N= N grãos/N parte aérea) de soja cv. Doko aos 117 DAE. Valores (em cada coluna) seguidos de letras iguais não diferem à P=0,05.

Estirpes	Massa de grãos	I.C. de biomassa	N nos grãos	I.C. de N
Luminosidade total				
CB 1809	8,65 a	0,31 b	490,0 b	0,78 b
29 W	5,22 b	0,32 b	293,3 c	0,79 b
Sombreamento (30% da luminosidade total)				
CB 1809	10,66 a	0,47 a	620,8 a	0,88 a
29 W	9,41 a	0,44 a	543,3 ab	0,90 a
cv%	13,8	8,3	12,9	3,5

nitrogênio na parte aérea, aumentando significativamente o índice de colheita de nitrogênio ($\text{N-total grãos}/\text{N-total da parte aérea}$) quando comparado ao das plantas que cresceram sob luminosidade total.

No tratamento controle, o teor de N-total acumulado nos grãos foi significativamente maior nas plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 em comparação àquelas inoculadas com a estirpe 29W. No sombreamento, o teor de N nos grãos das plantas inoculadas com a 29W aumentou cerca de 85% em relação ao tratamento controle, não diferindo das plantas inoculadas com a CB 1809, nesse parâmetro. Não houve efeito da inoculação no índice de colheita de nitrogênio.

4.5 - DISCUSSÃO

O sombreamento das plantas refletiu em um menor acúmulo de matéria seca e N na parte aérea e raiz da soja (tabela 1). Em leguminosas de grão, a acumulação de N está diretamente relacionada a acumulação de biomassa, sendo observada uma correlação positiva entre a biomassa e a fixação de N_2 (Denison et al. 1985; Muchow et al. 1993). O sombreamento, no entanto, alterou a partição dos assimilados entre os órgãos da soja. As plantas sombreadas apresentaram uma maior proporção de biomassa e N alocados para os grãos, resultando em maiores índices de colheita de biomassa e N. Esse efeito, garantiu um aumento na produção de grãos das plantas sombreadas em comparação ao tratamento controle (tabela 6). Neves et al. (1982) observaram que o sombreamento foliar total durante o período reprodutivo, promoveu uma maior remobilização do N das folhas para as vagens de caupi.

A quantidade, a massa e a coloração dos nódulos tem sido utilizados como medidas rápidas e baratas da fixação de N_2 (Buttery et al. 1992). Neste trabalho, a maior nodulação apresentada pelas plantas inoculadas com a estirpe Hup⁻ em comparação com a estirpe Hup⁺ não correspondeu a uma maior atividade da nitrogenase total ou a uma maior acumulação de N nas plantas. Como observado anteriormente (Döbereiner et al. 1970; Duque et al. 1982; Neves et al. 1985), os nódulos

formados pela estirpe Hup⁺ apresentaram uma elevada atividade específica. Do mesmo modo, em trevo branco, Cresswell et al. (1992) não obtiveram correlação entre a massa e o número de nódulos e o acúmulo de matéria seca. Esse autores sugeriram que algumas associações simbióticas menos efetivas formam nódulos os quais apresentam um pequeno volume de tecido infectado, demandando um aumento na quantidade de tecido fixador de N₂. Resultados similares foram também obtidos em amendoim por Rossum et al. (1993).

A classificação dos nódulos por tamanho e coloração visou obter uma melhor correlação entre a nodulação das plantas e a fixação de N₂. No entanto, a distribuição percentual das classes de nódulos por tamanho, ao longo do ciclo das plantas, não foi significativamente afetada pela estirpe ou pelo sombreamento, sendo que, a maior parte dos nódulos das plantas de soja (cerca de 80%) apresentaram menos do que 3 mm em todos os períodos amostrados (figura 5).

A classificação dos nódulos por coloração foi feita somente nas classes de nódulos acima de 3 mm, uma vez que, uma amostragem prévia mostrou que os nódulos de tamanho inferior estariam em formação, em sua maioria ativos e portanto, as diferenças na atividade da nitrogenase observada entre os tratamentos seriam devido a atividade dos nódulos maiores. Paralelamente, a amostragem de todos os nódulos seria dificultada pelo grande número de nódulos em cada tratamento. No entanto, não foi obtida boa correlação

entre a atividade da nitrogenase total das plantas e a distribuição percentual das classes de nódulos por coloração, uma vez que, os nódulos dessas classes já estavam em senescimento ou totalmente senescidos (figura 6), sugerindo que, já aos 62 DAE, os nódulos responsáveis pela fixação de N_2 na soja inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W têm de 1-3 mm. Na análise desses resultados, deve-se considerar a possibilidade de ocorrência de alguma falha metodológica, uma vez que o número de nódulos para a classificação foi ainda bastante elevado, e consequentemente, o tempo necessário para o processo de classificação foi maior do que o desejado. Pode-se ressaltar, porém, que o sombreamento das plantas retardou o início do senescimento dos nódulos em ambas as simbioses, discordando dos resultados de Melges et al. (1989), que demonstram que a redução da luminosidade acelera o senescimento dos nódulos

A variação da atividade da nitrogenase ao longo do ciclo das plantas dependeram da estirpe de rizóbio e da interação desta com o sombreamento (tabela 4). Sob luminosidade total, as plantas inoculadas com a CB 1809 apresentaram taxa crescentes de ARA até o período de enchimento de grãos, enquanto, a atividade da nitrogenase das plantas inoculadas com a estirpe 29W foi reduzida, logo após o período do florescimento. No sombreamento, as duas estirpes apresentaram taxas crescentes de atividade da nitrogenase durante o todo o período reprodutivo. Diversos

trabalhos tem evidenciado a importância da manutenção da fixação de nitrogênio após o florescimento, para a obtenção de elevadas produções de grãos em leguminosas (Imsande 1989; Boddey & Hungria 1990; Vessey 1992; Vikman & Vessey 1992). Nossos resultados sugerem que o declínio na taxa de fixação de N_2 após o florescimento das plantas, observada por diversos autores, é uma característica da estirpe de rizóbio utilizada como inoculante. A manutenção de elevados níveis de atividade da nitrogenase durante o período reprodutivo, em plantas crescidas sob luminosidade reduzida, parecem confirmar essa hipótese. Do mesmo modo, em feijão (*Phaseolus vulgaris*) a taxa de senescência dos nódulos é, em grande parte, afetada pela estirpe de *Rhizobium* (Boddey & Hungria 1990).

A acumulação de N e a produção de grãos da soja refletiu a atividade dos nódulos durante o período reprodutivo. Summerfield & Lawn (1987) estimaram que em plantas de soja o prolongamento da atividade dos nódulos por uma semana, durante o período reprodutivo, pode aumentar o N fixado em cerca de 50%. Uma nodulação precoce e um senescimento tardio dos nódulos são critérios que têm sido propostos para a seleção de estirpes (Kipe-Nolte & Vargas 1988; Boddey & Hungria 1990).

Sob luminosidade plena, a maior parte do N das plantas inoculadas com a 29W (cerca de 80% do N da parte aérea), foi acumulado durante o período vegetativo, enquanto, as plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺,

duplicaram a quantidade de N na parte aérea, após o período de florescimento (tabela 3). No sombreamento, as plantas inoculadas com ambas as estirpes (Hup^+ e Hup^-) acumularam a maior parte do N, após o florescimento. Consequentemente, o efeito da inoculação da soja somente foi observado sob luminosidade plena.

Sob luminosidade total, as plantas inoculadas com a estirpe Hup^+ produziram significativamente mais grãos e acumularam mais N nas sementes do que as inoculadas com a estirpe Hup^- . Na análise desse resultados, deve-se considerar que, o N assimilado nos estágios iniciais do desenvolvimento das leguminosas está, em geral, ligado a compostos estruturais dos quais não é facilmente retirado. O nitrogênio fixado durante período reprodutivo das plantas, parece concorrer mais efetivamente para o aumento no número de vagens formadas e um melhor enchimento de grãos da soja (Imsande 1989). Esses resultados ressaltam a necessidade da manutenção dos nódulos ativos durante o período reprodutivo para a obtenção de elevadas produções de grãos em plantas de soja dependentes da FBN.

Os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, são a principal forma pela qual o N fixado biologicamente é transportado dos nódulos de soja (Atkins 1991). O transporte do N fixado como ureídeos pode representar uma vantagem energética para o sistema simbiótico devido a relação C/N unitária desses compostos associada a sua menor energia de síntese (Atkin et al. 1978; Thomas & Schrader 1981). Em

condições de menor disponibilidade de carbono para os nódulos, como em plantas crescidas em baixos níveis de luminosidade ou durante período de formação de vagens, o transporte do N como ureídos pode ser particularmente vantajoso para a economia de carbono dos nódulos e manutenção da fixação de N_2 .

Em soja, a proporção de N transportado sob a forma de ureídos na seiva do xilema está positivamente correlacionada com os níveis de fixação de N_2 (McClure & Israel 1979; Herridge & Peoples 1990). Os resultados recentes obtidos por Atkins (1992) demonstram haver estreita interdependência metabólica entre a atividade da nitrogenase e a síntese de ureídos nos nódulos. Desse modo, o conteúdo de N-ureído na seiva xilemática pode representar uma medida útil da proporção de N da planta proveniente da fixação de N_2 (Buttery et al. 1992). No presente trabalho, a porcentagem de N-ureído na seiva acompanhou as variações na atividade da nitrogenase. A maior porcentagem de N-ureídos transportado na seiva do xilema de soja inoculada com a estirpe Hup⁺ no tratamento controle após o florescimento das plantas, refletiu o aumento na atividade total da nitrogenase e concorda com os resultados obtidos em trabalhos anteriores (Neves et al. 1985; Rumjanek et al. 1991).

Neves et al. (1985) observaram que a maior porcentagem de N-ureído na seiva xilemática resultou em uma melhor distribuição do N fixado e em um maior índice de colheita de N das plantas. Nesse experimento não foi

observada uma diferença significativa no índice de colheita entre as duas simbioses, sendo a maior produção de grãos observada nas plantas inoculadas com a estirpe Hup⁺, provavelmente, resultado de uma maior fixação de N₂ durante o período reprodutivo das plantas.

Diversos trabalhos tem demonstrado a relação entre o metabolismo de hidrogênio e o metabolismo de ureídos nos nódulos de soja e feijão (Neves et al. 1985; Hungria & Neves 1986; Hungria et al. 1989). Nossos resultados indicam que a presença da hidrogenase parece estar associada a uma maior eficiência da fixação de N₂ resultando em uma maior quantidade de amônia disponível, assimilada em compostos de baixa relação C/N, como os ureídos.

4.6 - CONCLUSÕES

- O sombreamento das plantas reduziu a biomassa e nitrogênio acumulado na parte aérea em ambas as simbioses, no entanto, o índice de colheita em relação a biomassa e o índice de colheita em relação ao nitrogênio das plantas aumentou com a redução da luminosidade.
- As plantas sombreadas transportaram uma maior proporção de N-ureído na seiva xilemática quando comparada às plantas crescidas sob luminosidade plena.

Após o florescimento, as plantas crescidas sob luminosidade plena e inoculadas com a estirpe Hup⁺ acumularam mais N na parte aérea, produziram mais grãos e acumularam mais N nos grãos do que as plantas inoculadas com a estirpe Hup⁻.

- Em plantas sombreadas, não houve diferença entre as estirpes quanto ao acúmulo de matéria seca e N na parte aérea, nem quanto a produção de grãos.

5 - CAPÍTULO III

EFEITO DO SOMBREAMENTO NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA, ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DO NITROGÊNIO EM SOJA (*Glycine max* L.) INOCULADA COM MUTANTES HUP⁺ E HUP⁻ DE *B. japonicum*.

5.1 - RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos utilizando plantas de soja (*Glycine max* L. cv. *Doko*) inoculadas com a mutante PJ 17 (Hup⁻) da estirpe USDA 122 ou sua revertante isogênica PJ 17-1 (Hup⁺) de *B. japonicum* que cresceram sob luminosidade plena ou sombreadas (70% de sombreamento). No experimento 1, as plantas inoculadas com a revertante Hup⁺ apresentaram redução da massa nodular, menor acúmulo de matéria seca e nitrogênio na parte aérea quando cresceram sombreadas. A atividade da nitrogenase (ARA) dos nódulos formados com a mutante Hup⁻ foi significativamente aumentada pelo sombreamento, não sendo esse efeito observado na revertante Hup⁺. As variações na atividade específica da glutamina sintetase no citossol dos nódulos refletiram as variações na atividade da nitrogenase.

A atividade da glutamato desidrogenase foi maior nos nódulos formados com a revertante Hup^+ em ambos os tratamentos de luz. Sob luminosidade plena, uma maior atividade específica da uricase foi observada no citossol dos nódulos formados com a revertante Hup^+ e refletiram uma maior proporção de N-ureído transportado na seiva xilemática nesse tratamento. Maiores níveis de consumo de IMP (inosina 5- monofosfato) e atividade da uricase no citossol dos nódulos assim como uma maior porcentagem de N-ureídos na seiva xilemática foram observados em plantas sombreadas. O efeito do sombreamento na síntese e no transporte de ureídos foram, porém, mais pronunciados em plantas inoculadas com a mutante Hup^- . No experimento II observou-se um marcado aumento da eficiência relativa da nitrogenase nos nódulos formados com a mutante Hup^- com a redução da luminosidade. Houve uma correlação positiva entre a ER e a proporção de N-ureído transportados na seiva xilemática das plantas inoculadas com a mutante Hup^- que cresceram sombreadas. Os resultados confirmam a relação entre a ER da nitrogenase e o transporte de N-ureído na seiva das plantas de soja, e mostram que sob sombreamento, os nódulos formados pela Hup^- aumentaram a ER, possivelmente mudando a alocação de elétrons disponíveis para a nitrogenase do H^+ para a redução do N_2 .

5.2 - INTRODUÇÃO

O sistema nitrogenase cataliza simultaneamente as reduções de nitrogênio molecular à amônio e de prótons à hidrogênio (Schubert & Evans 1976; Smith et al. 1976). A evolução de hidrogênio pelos nódulos consome 25% ou mais do poder redutor e energia utilizados pela nitrogenase, sem nenhum benefício aparente para o sistema simbiótico (Yates 1988). Alguns organismos fixadores de N_2 possuem um sistema de oxidação do hidrogênio (Hup) catalizado pela hidrogenase, capaz de reciclar o H_2 produzido pela nitrogenase via cadeia respiratória. As estirpes de *Bradyrhizobium* capazes ou incapazes de oxidar o H_2 tem fenotipos Hup^+ e Hup^- , respectivamente. Recentemente, Van Berkum (1990) descreveu um terceiro fenótipo Hup regulado pelo hospedeiro (Hup-hr). Esse

fenótipo foi caracterizado pela capacidade apresentada por algumas estirpes de *Bradyrhizobium* de expressar a atividade da hidrogenase quando inoculada em caupi (*Vigna unguiculata* cv. Califórnia Black-eye five) mas não inoculadas em soja (*Glycine max* cv. Williams).

Dixon (1972) propôs três mecanismos pelos quais a presença da hidrogenase em nódulos poderia aumentar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio: (i) a presença do sistema hidrogenase nos nódulos poderia recuperar parte do poder redutor e ATPs gastos durante a redução do N_2 aumentando significativamente a eficiência do processo de fixação do nitrogênio; (ii) a oxidação do H_2 pela hidrogenase nos nódulos poderia representar mecanismo de proteção respiratória da nitrogenase, uma vez que, em sistemas fixadores de N_2 aeróbicos, a oxidação do H_2 está acoplado, através da cadeia transportadora de elétrons, à redução do O_2 . Em estudos mais recentes, Witty et al. (1987) propuseram um modelo no qual o suprimento de O_2 para os bacteróides é controlado por uma barreira de difusão de O_2 variável. Esta barreira manteria o balanço entre o fluxo de oxigênio na região bacteroidal e seu requerimento respiratório (Minchin et al. 1988), portanto, embora a hidrogenase possa contribuir para a proteção da nitrogenase da inativação pelo O_2 , não representa o mecanismo primário para sua proteção (Arp 1992); (iii) a oxidação do H_2 poderia proteger a nitrogenase da

inibição pelo H_2 , Arp (1992) sugeriu que a oxidação do H_2 nos nódulos representa um importante mecanismo de proteção da nitrogenase contra a inibição pelo hidrogênio.

Paralelamente, alguns autores tem sugerido que o metabolismo de H_2 nos nódulos está ligado a outras características genéticas como a capacidade de nodulação (Brewin et al. 1980), a eficiência nodular (Hungria & Neves 1987), a fixação de CO_2 nos nódulos (Arima 1981), a produção de rizobitoxina e a composição de polissacarídeos extracelulares (Minamisawa 1989) e ao metabolismo de ureídeos nos nódulos (Hungria & Neves 1987).

A avaliação dos benefícios promovidos pela hidrogenase tem sido baseada em comparações da fixação de nitrogênio e o crescimento do macrossimbionte inoculado com estirpes Hup^+ e Hup^- . Evans et al. (1985) calcularam que cerca de 70% de todos os experimentos descritos mostraram que a atividade da hidrogenase teve um efeito positivo no acúmulo de matéria seca ou nitrogênio total fixado das plantas. Em uma comparação feita, recentemente, com 92 isolados Hup^+ e Hup^- de *B. japonicum* não foi observada relação significativa entre o fenótipo Hup^+ e a acumulação de N em plantas crescidas em casa-de-vegetação (Fuhrmann 1990). A interpretação dos resultados utilizando estirpes ou grupos de estirpes Hup^+ e Hup^- é complicada devido a interferência de outras diferenças genéticas, além da presença da hidrogenase

que podem afetar a simbiose. A utilização de mutantes isogênicas Hup^+ e Hup^- de rizóbio como inoculantes permite uma melhor avaliação das vantagens da reciclagem de H_2 sobre a fixação de nitrogênio e o crescimento das leguminosas (Eisbrenmer & Evans 1983). Evans et al. (1985) utilizando mutantes isogênicas Hup^+ e Hup^- de *B. japonicum* observaram um maior acúmulo de matéria seca e nitrogênio em plantas de soja inoculadas com a estirpe Hup^+ . Drevon et al. (1987), em cultivo hidropônico, observaram um efeito negativo da inoculação com a revertante Hup^+ (PJ 17-1) em comparação com a mutante Hup^- (PJ 17) no acúmulo de matéria seca na parte aérea de soja, devido a deficiência de O_2 nos nódulos decorrente do sistema de cultivo. Utilizando o mesmo par isogênico, Hungria et al. (1989) observaram que a inoculação com a revertante Hup^+ promoveu um maior acúmulo de nitrogênio em plantas de soja, durante o período de florescimento. Esses resultados controverses podem ser, em parte, atribuídos a complexidade do sistema sujeito a interferências de fatores ambientais, tais como: a temperatura (Rainbird et al. 1983); a pO_2 no ambiente do nódulo (Drevon et al. 1982; Drevon & Salzac 1984; Godfroy & Drevon 1991); os níveis de irradiância (Bethlenfalvay & Phillips 1979; Nelson 1983); o comprimento do fotoperíodo (Murphy 1986). Van Soom e colaboradores (1993) sugeriram que a avaliação dos efeitos benéficos do fenótipo Hup^+ sobre o crescimento da planta, deve ser realizada

através de experimentos de longa duração, em condições ótimas para o crescimento vegetal.

A presença da hidrogenase nos nódulos parece alterar a assimilação do nitrogênio fixado em nódulos de soja, devido ao aumento na fixação de N_2 , podendo também, afetar a forma pelo qual o nitrogênio fixado é transportado dos nódulos para a parte aérea, via seiva xilemática (Minamisawa et al. 1981). Em uma série de estudos sobre o efeito da inoculação de soja com grupos de estirpes Hup⁺ e Hup⁻ de *B. japonicum* foi observado que a taxa de transporte de nitrogênio fixado de raízes de plantas noduladas por estirpes Hup⁺ foi maior do que aquelas noduladas por estirpes Hup⁻ (Minamisawa et al. 1983). Usando grupos de estirpes Hup⁺ e Hup⁻ de *Rhizobium phaseoli* como inoculante para várias cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*), Hungria & Neves (1987) observaram uma correlação positiva entre a porcentagem de N-ureídos na seiva xilemática e a eficiência relativa da nitrogenase. Hungria et al. (1989) observaram que além de promover uma maior fixação de N_2 , a inoculação de soja cv. Santa Rosa, com a revertante Hup⁺ (PJ 17-1) de *B. japonicum* aumentou a síntese e o transporte de N-ureído na seiva xilemática em comparação com a mutante Hup⁻ (PJ 17). Herridge & People (1990) não observaram correlação entre a eficiência relativa das estirpes de *B. japonicum* inoculadas em soja cv. Lincoln e a composição da seiva xilemática das plantas. Neves

et al. (1985) observaram diferenças entre as estirpes na composição da seiva xilemática em plantas quando cultivadas no campo, entretanto, essas diferenças não ocorreram quando as plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação. Esses autores sugeriram que a luminosidade pode interferir no efeito da estirpe na composição da seiva xilemática da soja.

Nesse trabalho, foi estudado o efeito da presença da hidrogenase na fixação de N_2 , no metabolismo do nitrogênio nos nódulos e na proporção de nitrogênio transportado como ureídos na seiva xilemática, e sua possível relação com o sombreamento durante o período de florescimento da soja.

5.3 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos no CNPAB/EMBRAPA, Itaguaí, RJ, nos períodos de abril a junho de 1989 e outubro a dezembro de 1990. Utilizou-se soja (*Glycine max* L.) cultivar Doko, inoculada com *B. japonicum* mutante Hup⁻ (PJ-17) da estirpe USDA DES 122 e sua revertante isogênica Hup⁺ (PJ 17-1) (Lepo et al. 1981). As bactérias foram crescidas em meio definido de Vincent (1970) à 29°C por 7 dias, com agitação. As sementes foram esterilizadas com HgCl₂ 0,2% (Vincent 1970). A inoculação foi feita aos 7 dias após a emergência (DAE), colocando-se 1ml de inoculante (cerca de 10⁸ células) por plântula.

No experimento 1, foram usados vasos plásticos com capacidade de 3,5 l, preenchidos com o horizonte superficial do solo PVA série Itaguaí, incorporado com o equivalente a 0,5% de palha triturada de *Brachiaria*.

Por ocasião da semeadura foram colocadas 4 sementes pré-germinadas/vaso cobrindo-se em seguida com uma fina camada de solo. As plantas foram mantidas até os 10 DAE em casa-de-vegetação quando, então foram transferidas para o ar livre. Nessa ocasião, foi feito o desbaste deixando-se 2 plantas/vaso. O sombreamento dos vasos foi obtido através da cobertura das mesas com uma tela Sombrite (70% de sombreamento). A intensidade luminosa foi determinada por um radiômetro Li-cor mod. SB 190, constatando-se que a média do

tratamento sombreado correspondia a 32,7% da luminosidade total, a qual sera referida como 30% da luminosidade fotossinteticamente ativa. Para que se obtivesse uniformidade da temperatura radicular entre os tratamentos, cada vaso foi embutido em outro (com capacidade de 10 l) preenchendo-se os espaços vazios com areia mantida permanentemente úmida durante todo o decorrer do experimento. Diariamente, a temperatura radicular foi medida, sendo constatado que esta não ultrapassou 31°C com diferença de aproximadamente 2°C entre os dois níveis de luminosidade.

No experimento II, foram utilizados vasos de 10 l preenchidos com solo, de forma similar ao experimento anterior. Os vasos foram mantidos durante todo o período, imersos em tanque com água corrente afim de se manter a temperatura uniforme entre os tratamentos, sendo constatado que a temperatura dos vasos (5 cm de prof.) não ultrapassou 30°C com diferença de aproximadamente 2°C entre os dois níveis de luminosidade. O sombreamento dos vasos foi feito de modo similar ao experimento anterior.

O delineamento experimental utilizado em ambos os experimentos foi o de parcelas subdivididas, onde as parcelas representaram os níveis de luminosidade e as subparcelas as estirpes, com 3 repetições.

As coletas foram realizadas aos 47 dias após a emergência, no experimento I e aos 50 dias após a emergência, no experimento II (ambos no período de florescimento).

Análises

- Determinações da matéria seca e do teor de N na parte aérea

Separou-se a parte aérea da raiz na altura do nó cotiledonar e ambos foram colocados em estufa (60-70°C), até atingir peso constante. Em seguida, foram pesados e moídos a 0,84 mm (20 mesh). As análises de N-total da parte aérea e raízes foram determinadas pelo método semimicroKjeldhal segundo Liao (1981) seguida de destilação e titulação segundo Bremner & Edwards (1965).

- Atividade da nitrogenase

A evolução de H_2 foi determinada em raízes noduladas destacadas incubadas em frascos de 250 ml. Os frascos foram fechados hermeticamente com rolhas do tipo "suba seal" incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram retiradas alíquotas (0,5 ml) da fase gasosa que foram analisadas em um analisador de H_2 de alta sensibilidade construído conforme descrito por Layzell et al. (1984).

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno (ARA) em raízes destacadas (Mague & Burris 1972). Após a determinação do H_2 evoluído, injetou-se 30 ml de C_2H_2 aos frascos incubando-se por 10 min. A leitura do etileno produzido foi feita em um

cromatógrafo de gases Perkin Elmer F 11, com detector por ionização de chama, contendo coluna de Poropak N (80-100 mesh) e operada a 400°C utilizando N₂ como gás de arraste a um fluxo de 40 ml.min⁻¹.

A eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase foi calculada pelo parâmetro de Schubert & Evans (1976).

$$ER = 1 - ([H_2]/[C_2H_4])$$

- Coleta e análise do exsudato xilemático

Para coleta do exsudato xilemático, as plantas foram cortadas na altura do nó cotiledonar. A superfície do corte foi lavada com água destilada e seca com papel absorvente e conectada a uma bomba de vácuo. A seiva xilemática foi coletada em tubos do tipo 'vacuntainer' (5 ml) durante 10 minutos e imediatamente congelada, sendo mantida à -20°C até o momento das análises.

Os compostos nitrogenados foram determinados em alíquotas de 10 ml de seiva. A concentração de N-ureído na seiva xilemática foi determinado pelo método colorimétrico de Vogels & van der Drift (1970). A determinação da concentração de N-total na seiva foi feita pelo método microkjeldahl seguido de análise colorimétrica (Boddey et al. 1987).

- Determinações das atividades enzimáticas no citosol dos nódulos

A preparação do citossol dos nódulos foi feito segundo Farnden & Robertson (1980). O sobrenadante do homogeneizado de nódulos obtido após centrifugação à 30.000 g por 30 minutos, foi passado em uma coluna de dessalinização com Sephadex G-25 equilibrada com tampão de ensaio da respectiva enzima.

A atividade da glutamina sintetase (G.S.) foi determinada em ensaio biossintético de Elliot (1955). A atividade da glutamato desidrogenase (GDH) foi determinada pelo método de Duke & Ham (1976). A atividade da glutamato sintase (GOGAT) foi determinada pelo método de Boland & Benny (1977). Todos os ensaios foram feitos como descrito por Farnden & Robertson (1980). A atividade da uricase foi determinada segundo Schubert (1981). A determinação do consumo de IMP foi feita pelo método de Atkins et al. (1980) modificado (Marinho et al. 1989). Foi utilizado um cromatógrafo líquido (HPLC) Varian 5000 com detector de UV à 254 nm e integrador Varian 4270; uma coluna de fase reversa C-18 e como fase móvel uma solução de acetato de amônia 1mM (pH 4,8) com fluxo de 1 ml/min.

5.4 - RESULTADOS

5.4.1. - Experimento I

- *Fixação de N_2 e crescimento das plantas*

Com ambas as mutantes (Hup^+ e Hup^-), níveis similares de atividade da nitrogenase (ARA), foram observados em plantas expostas à luminosidade total. Nesse tratamento, também não foram observadas diferenças significativas entre as duas mutantes quanto ao peso de nódulos ao acúmulo de matéria seca e de N na parte aérea (tabela 1).

Com o sombreamento das plantas, a atividade total da nitrogenase dos nódulos formados com a mutante Hup^- aumentou cerca de 48% em relação ao tratamento controle (não sombreado), diferindo significativamente da atividade dos nódulos formados com a revertante Hup^+ . Houve uma tendência de aumento (embora não significativa) na ARA específica das plantas submetidas ao sombreamento. As plantas sombreadas e inoculadas com a revertante Hup^+ apresentaram uma redução na massa de nódulos e, paralelamente, um menor acúmulo de matéria seca e N na parte aérea. Não houve efeito significativo do sombreamento na nodulação, no acúmulo de matéria seca e de N na parte aérea de plantas inoculadas com a mutante Hup^- .

Tabela 1 - Peso de nódulos (g/planta), atividade da nitrogenase (mmol/h.planta), acúmulo de matéria seca (g/planta) e nitrogênio (mg N/planta) na parte aérea de soja cv. Doko no período do florescimento, inoculada com mutantes Hup⁺ e Hup⁻ de *B. japonicum* (experimento 1). Valores (em cada coluna) seguidos de mesma letra não diferem à P=0,05.

Mutantes ^a	ARA total	ARA específica	Peso nódulos	Peso da parte aérea	N parte aérea
Luminosidade total					
Hup ⁺	14,9 ab	38,7 ^{n.s}	0,40 a	6,0 a	183,1 a
Hup ⁻	13,5 b	30,5	0,43 a	6,1 a	169,2 a
Sombreamento (30% da luminosidade total)					
Hup ⁺	10,80 b	39,6	0,29 b	4,4 b	130,8 b
Hup ⁻	19,92 a	43,4	0,56 a	5,6 a	159,4 ab
cv%	29,4	29,9	12,5	8,6	9,0

a Mutante PJ 17 (Hup⁻) da estirpe USDA DES 122 de *B. japonicum* e sua revertante PJ 17-1 (Hup⁺).

- Enzimas de assimilação do nitrogênio

A atividade específica da GS no citosol dos nódulos não diferiu significativamente entre as estirpes em plantas que cresceram expostas à luminosidade total (tabela 2). O sombreamento induziu aumentos na atividade da GS, independentemente da estirpe inoculada, sendo o efeito da redução da luminosidade na atividade da GS, cerca de 37% maior nos nódulos formados com a mutante Hup^- em comparação com a revertante Hup^+ .

A atividade específica da GOGAT não foi significativamente afetada pela luminosidade nem pela inoculação com as mutantes Hup . No entanto, os níveis de atividade da GOGAT observados no citossol dos nódulos foram muito baixos e com elevado coeficiente de variação dos dados (tabela 2).

A atividade específica da GDH foi significativamente maior em nódulos formados com a revertante Hup^+ em comparação com a mutante Hup^- em ambos os tratamentos de luminosidade (tabela 2).

- Síntese e transporte de ureídeos

O efeito da estirpe de rizóbio e do sombreamento na síntese e transporte de ureídeos na seiva xilemática das plantas pode ser observado na tabela 3. As plantas que

Tabela 2 - Atividades específicas das enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH) no citossol dos nódulos de soja formados pelas mutantes Hup⁺ e Hup⁻ no período do florescimento (experimento 1). Valores (em cada coluna) seguidos de mesma letra não diferem à p=0,05. n.s. não significativo.

Mutantesa	GS	GOGAT	GDH
	----- (umol min-1 peso fresco de nód.) -----		
Luminosidade total			
Hup ⁺	9,6 c	0,11 n.s.	0,99 a
Hup ⁻	10,0 bc	0,17	0,48 b
Sombreamento (30% da luminosidade total)			
Hup ⁺	11,8 b	0,18	1,1 a
Hup ⁻	15,9 a	0,09	0,6 b
CV%	6,7	37,9	11,6

a Mutante PJ 17-1 (Hup⁻) da estirpe USDA DES 122 de *B. japonicum* e sua revertante PJ 17 (Hup⁺)

Tabela 3 - Consumo de IMP e atividade específica de uricase no citossol dos nódulos porcentagem de N-ureído transportados na seiva xilemática de soja inoculada com mutantes Hup⁺ e Hup⁻ no período de florescimento (Experimento 1). Valores (em cada coluna) seguidos de mesma letra não diferem à p=0,05.

Mutantes	Consumo de IMP --(mmol. min ⁻¹ . g nód. ⁻¹)--	Uricase	% N-ureído na seiva xilemática
Luminosidade total			
Hup ⁺	1,8 b	4,3 b	52,8 ab
Hup ⁻	1,8 b	2,6 c	43,0 b
Sombreado (30% da luminosidade total)			
Hup ⁺	3,2 a	6,5 a	54,6 a
Hup ⁻	2,1 ab	5,7 a	60,2 a
cv%	25,3	9,8	19,9

a Mutante PJ 17 (Hup⁻) da estirpe USDA DES 122 de *B. japonicum* e sua revertante PJ 17-1 (Hup⁺).

creceram expostas a luminosidade plena não diferiram significativamente quanto ao consumo de IMP no citossol dos nódulos, no entanto, a atividade específica da uricase foi significativamente maior nos nódulos formados com a revertante Hup⁺ em comparação com a mutante Hup⁻. Essa diferença na atividade da uricase entre as duas mutantes refletiu na proporção de N-ureído transportado na seiva xilemática. A porcentagem de ureídos na seiva foi cerca de 20% maior em plantas inoculadas com a revertante Hup⁺ quando comparada a mutante Hup⁻ no tratamento não sombreado.

No sombreamento, houve um aumento significativo tanto no consumo de IMP quanto na atividade específica da uricase no citossol dos nódulos. Paralelamente, uma maior porcentagem de N-ureído foi transportada na seiva xilemática das plantas. O efeito de indução na síntese e aumento na porcentagem de ureídos na seiva devido ao sombreamento foi mais acentuado em plantas inoculadas com a mutante Hup⁻.

5.4.2. - Experimento II

Resultados essencialmente similares aos apresentados anteriormente foram obtidos no segundo experimento, no qual, avaliou-se o efeito do sombreamento na ER da nitrogenase na proporção de nitrogênio transportado como ureídos na seiva do xilema. No entanto, os resultados

dos experimentos não são diretamente comparáveis entre si, devido as diferentes épocas em que foram cultivadas as plantas nos dois experimentos.

Novamente, não foram observadas diferenças significativas entre as mutantes Hup^+ e Hup^- na atividade da nitrogenase e no acúmulo de matéria seca na parte aérea de plantas expostas à luminosidade total (tabela 4). Nesse tratamento, o peso de nódulos das plantas inoculadas com a mutante Hup^- foi significativamente maior em comparação com a revertante Hup^+ . No sombreamento, não houve diferenças entre as duas mutantes na ARA, no peso de nódulos e da parte aérea.

Houve interação da luminosidade com as mutantes de *B. japonicum* na ER da nitrogenase (figura 1). Independentemente, da luminosidade os nódulos formados com a revertante Hup^+ reciclaram praticamente todo o H_2 produzido pela nitrogenase. Os nódulos formados com a mutante Hup^- apresentaram baixa eficiência relativa ($ER=0,35$) quando as plantas cresceram expostas à luminosidade plena, entretanto, no sombreamento houve uma menor evolução de H_2 que refletiu em um aumento na ER para 0,75.

Da mesma forma, em plantas expostas à luminosidade total, uma maior proporção de ureídeos na seiva xilemática foi observada em plantas inoculadas com a revertante Hup^+ em comparação com a mutante Hup^- . No sombreamento, o aumento na ER observado nas plantas inoculadas com a mutante Hup^- foi acompanhado por um aumento significativo na proporção de nitrogênio transportado como ureídeos na seiva do xilema, não

Tabela 4 - Peso de nódulos (g/planta), matéria seca acumulada na parte aérea (g/planta) e atividade da nitrogenase total (mmol/h.planta); atividade da nitrogenase específica (mmol/h.g nód.) em plantas de soja inoculada com mutantes Hup⁺ e Hup⁻ no período de florescimento (experimento II). Valores (em cada coluna) seguidos de mesma letra não diferem à p=0,05. n.s. não significativo.

Mutantes	ARA total	ARA específica	Peso nódulos	Peso parte aérea
Luminosidade total				
Hup ⁺	10,4 n.s.	72,3 n.s.	0,15 b	1,1 n.s.
Hup ⁻	11,1	44,9	0,24 a	1,3
Sombreado (30% da luminosidade total)				
Hup ⁺	8,3	82,4	0,11 b	1,0
Hup ⁻	10,1	61,5	0,17 ab	1,1
cv %	33,9	38,1	21,3	35,9

a Mutante PJ 17 (Hup⁻) da estirpes USDA DES 122 de *B. japonicum* e sua revertante PJ 17-1 (Hup⁺).

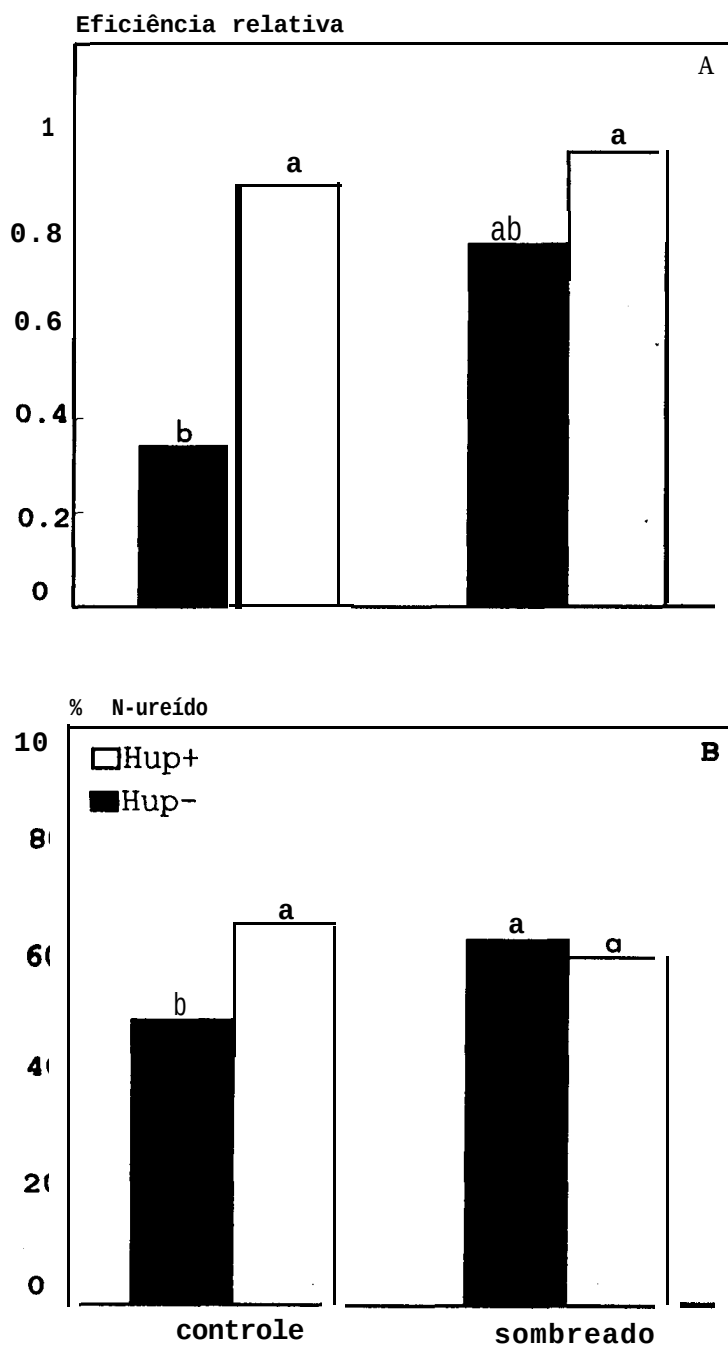


Figura 1 - (A) Eficiência relativa da FBN, e (B) porcentagem de N-ureído na seiva xilemática de soja cv. Doko cultivada sob luminosidade total ou sombreada (70% de sombreamento), inoculada com mutantes Hup⁺ e Hup⁻ de *B.japonicum* Barras verticais com mesma letra em cada quadro, não diferem à P=0,05.

diferindo das plantas inoculadas com a revertante Hup^+ (figura 1).

Uma correlação positiva ($r=0,884$) entre a ER e a porcentagem de N-ureído na seiva xilemática das plantas inoculadas com a mutante Hup^- foi observada (figura 2).

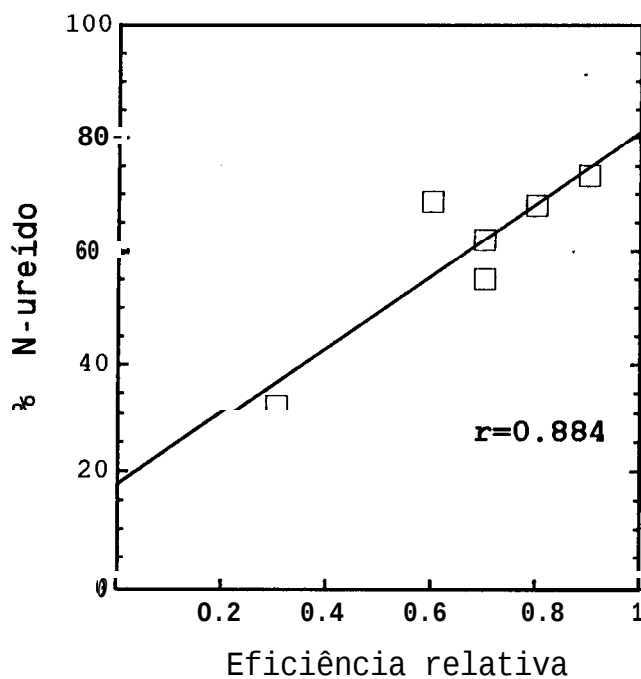


Figura 2 - Correlação entre a eficiência relativa e a porcentagem de N-ureído na seiva xilemática de soja cv. Doko cultivada sob luminosidade plena ou sombreada, inoculada com a mutante Hup⁻ de *B. japonicum*.

5.5 - DISCUSSÃO

A redução da luminosidade resulta numa diminuição da disponibilidade de fotossintatos que pode limitar a formação e o crescimento dos nódulos. Em ambos os experimentos, não foi observado efeito da luminosidade na atividade específica da nitrogenase ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g nod.}^{-1}$), sugerindo que a atividade da enzima não foi limitada pela menor disponibilidade de fotossintatos no tratamento sombreado (tabelas 1,4). Drevon et al. (1991) observaram que em condições sub-ótimas de intensidade luminosa, os baixos níveis de fixação de nitrogênio foram devidos a menor massa nodular e não a menor atividade dos nódulos. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Farnham e colaboradores (1986). No experimento I, o efeito do sombreamento na nodulação da soja somente foi observado em plantas inoculadas com a revertante Hup⁺, sendo que, a menor nodulação observada nesse tratamento foi acompanhado por um menor acúmulo de matéria seca e de N na parte aérea das plantas (tabela 1).

Em plantas exportadoras de ureídeos, como a soja, há um elevado requerimento de glutamina utilizada como substrato para a síntese de ureídeos (Oaks & Hirel 1985). Nessas plantas elevados níveis de atividade de GS no citossol dos nódulos são observados (Robertson et al. 1975; Oaks & Hirel 1985). A alta atividade da GS no citossol dos nódulos, associada à

grande afinidade por amônia apresentada por essa enzima, resulta em uma rápida remoção do NH_4^+ no citoplasma da planta facilitando a difusão de NH_4^+ do bacteróide (Döbereiner & Burris 1977) e em um aumento na taxa de nitrogênio total exportado para a parte aérea (Hungria et al. 1991). A redução da luminosidade induziu a um aumento significativo na atividade específica da GS no citossol dos nódulos tanto na mutante Hup^- como na Hup^+ (tabela 2). O efeito da redução da luminosidade na atividade da GS, entretanto, foi mais acentuado nos nódulos formados com a mutante Hup^- refletindo, provavelmente, o aumento na atividade da nitrogenase ocorrido nessa simbiose. A assimilação inicial do nitrogênio fixado simbioticamente em aminoácidos resulta da ação combinada da GS e da GOGAT (McGrath & Coruzzi 1991). Para a operação do sistema GS/GOGAT níveis similares de atividade dessas enzimas são esperados. No entanto, os níveis de atividade da GOGAT foram inferiores aos níveis de GS e da GDH. Robertson et al. (1975) sugeriram que a atividade da GOGAT, determinada nos ensaios, pode ser menor do que a atividade presente *in vivo*, devido a instabilidade da enzima e a presença de inibidores no citossol dos nódulos. A atividade da GOGAT no citossol dos nódulos apresentou um elevado coeficiente de variação indicando, provavelmente, a ocorrência de uma falha metodológica. A atividade da GDH no citossol dos nódulos não foi afetada significativamente pelo tratamento de luminosidade. A GDH apresentou níveis mais elevados de atividade nos nódulos formados pela revertante Hup^+ . A

relação entre a atividade da GDH no citossol dos nódulos e a presença da hidrogenase no bacteróide não foi estabelecida, no entanto, vários autores sugerem que essa enzima não está envolvida com a assimilação primária da amônia proveniente da FBN.

Os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, são a principal forma pela qual o N fixado biologicamente é transportado dos nódulos de soja (Matsumoto et al. 1977; Herridge et al. 1978; Atkins 1991). A síntese de ureídeos, envolve a síntese de IMP através das enzimas da síntese de purina e sua posterior degradação até alantoína e ácido alantóico (Fujihara & Yamaguchi 1978; Schubert 1981; Atkins et al. 1982; Atkins 1991).

O efeito da luminosidade reduzida e consequentemente, da menor disponibilidade de carbono para as plantas, no metabolismo de nitrogênio das raízes tem sido demonstrado. Sob condições limitantes de carbono, plantas supridas com amônia, assimilam o nitrogênio em compostos orgânicos de baixa relação C/N, como as amidas (Fernandes, 1983;1990) e em situações extremas, os ureídeos representam um mecanismo de desintoxicação por amônia (Reinbothe & Mothes 1962). Hungria et al. (1985) observaram que a redução de 25% na luminosidade total aumentou a proporção de N-ureído transportado na seiva xilemática de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas com rizóbio. No presente estudo, a redução da luminosidade induziu a síntese e aumentou a porcentagem de ureídeos transportados na seiva

xilemática em ambas as associações, no entanto, esse efeito foi mais acentuado na mutante Hup^- . O transporte do N fixado sob a forma de ureídos pode representar uma vantagem energética para o sistema simbiótico, devido a relação C/N unitária desses compostos associada a sua menor energia requerida na síntese (Atkins et al. 1978; Thomas & Schrader 1981). Desse modo, o efeito do sombreamento na composição da seiva xilemática pode ser atribuído a uma adaptação da simbiose à menor disponibilidade de carbono.

A presença da hidrogenase, em estirpes de rizóbio, tem sido apontada como um fator capaz de aumentar a eficiência dos nódulos, uma vez que este sistema pode oxidar o H_2 evoluído, utilizando elétrons na produção de ATPs (Emerich et al. 1979; Evans et al. 1983). A ER é definida com sendo a proporção de elétrons alocados para a redução do N_2 em relação ao fluxo total de elétrons disponíveis para a nitrogenase (Schubert & Evans 1976). Os organismos que possuem o sistema hidrogenase ativo (Hup^+) apresentam os valores de ER superestimados, em virtude da oxidação pela hidrogenase do H_2 produzido durante a redução do N_2 . Os nódulos formados por estirpes Hup^- responderam ao sombreamento e conseqüentemente, à menor disponibilidade de carbono com uma mudança na alocação de elétrons disponíveis para a nitrogenase do H^+ para a redução do N_2 , aumentando a ER. Os resultados do segundo experimento, mostram que com o sombreamento das plantas ocorreu um marcado aumento na ER da mutante Hup^- em relação ao controle. Nelson (1983) também

observou um aumento significativo na ER de isolados Hup⁻ de *R. leguminosarum* quando inoculados em plantas crecidas em baixos níveis de irradiância.

Em soja, a proporção de nitrogênio transportado sob a forma de ureídos na seiva xilemática está positivamente correlacionada com os níveis de fixação de N₂ (McClure & Israel 1979). Os resultados obtidos por Atkins et al. (1992) indicam haver uma estreita interdependência entre a atividade da nitrogenase e a síntese de ureídos, possivelmente, mediada pelo metabolismo respiratório. Do mesmo modo, o metabolismo do hidrogênio (atividade da hidrogenase e/ou eficiência na alocação de elétrons destinados à nitrogenase) parece também estar relacionado com o metabolismo do N-ureído nos nódulos. No entanto, a relação bioquímica entre esses dois metabolismos não foi ainda estabelecida. A inoculação de soja com dois grupos de estirpes, um com elevada ER e outro com baixa ER, mostrou que as estirpes eficientes transportaram uma maior proporção de N-ureído na seiva do xilema (Neves et al. 1985). Hungria & Neves (1987) observaram uma correlação altamente positiva (0,903) entre a ER e a porcentagem de N-ureídos na seiva xilemática de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os resultados dos experimentos I e II mostram que as plantas inoculadas com a revertante Hup⁺, quando expostas à luminosidade total, transportaram uma maior porcentagem de N-ureído na seiva em comparação com plantas inoculadas com a mutante Hup⁻, confirmando os resultados obtidos por Hungria et al. (1989). Entretanto, a diferença entre a mutante Hup⁻ e

a revertante Hup⁺ na porcentagem de N-ureído na seiva somente foi observada em plantas que cresceram sob luminosidade plena. Com a redução da luminosidade as plantas inoculadas com a mutante Hup⁻ apresentaram um aumento significativo na eficiência da fixação de N₂ ocorrendo, provavelmente, um aumento na quantidade de amônia disponível para a GS. Este grupo de plantas, respondeu a esses dois fatores com uma indução na síntese de ureídos e com um aumento na proporção desses compostos transportados na seiva xilemática para a parte aérea. O aumento na proporção de nitrogênio transportados como ureídos ocorrido nessa simbiose representa um mecanismo de conservação de esqueletos de carbono que seriam utilizados para manter elevados níveis de fixação de nitrogênio. Nas plantas inoculadas com a revertante Hup⁺ e submetidas ao sombreamento, não houve aumento significativo no N-ureído transportado, talvez porque os níveis apresentados por essas plantas no tratamento controle já fossem bastante elevados. Esses resultados podem, em parte, explicar as dificuldades na interpretação dos dados da literatura referentes ao efeito das estirpes de rizóbio na composição da seiva das plantas (Thomas et al. 1983; Neves et al. 1985; McClure et al. 1980; Herridge & People 1990). No sombreamento, ocorreu um aumento na ER das estirpes Hup⁻ e, conseqüentemente, uma maior proporção de N-ureído seja transportada na seiva xilemática. A correlação positiva obtida entre a ER e a porcentagem de ureídos na seiva das plantas inoculadas com a mutante Hup⁻ parecem confirmar essa

hipótese. Outros estudos deverão ser feitos visando determinar os níveis críticos de luminosidade necessários para o cultivo das plantas em condições de casa-de-vegetação e fitotrons para a avaliação do efeito de estirpes Hup⁺ e Hup⁻ na composição da seiva xilemática.

5.6. - CONCLUSÕES

- A revertante Hup^+ apresentou elevada ER em ambos os tratamentos: sombreado e luminosidade plena, enquanto, a mutante Hup^- apresentou baixa ER nas plantas à plena luz e aumentou a ER no sombreamento.
- A atividade da GS no citosol dos nódulos refletiu as variações na atividade da nitrogenase e a proporção de N-ureído na seiva xilemática.
- O sombreamento das plantas aumentou a atividade da GS, a síntese e o transporte de ureídos na seiva xilemática. Esse efeito foi mais acentuado nas plantas inoculadas com a mutante Hup^- .
- O sombreamento das plantas afetou mais negativamente a nodulação das plantas inoculadas com a revertante Hup^+ do que as inoculadas com a mutante Hup^- .
- A inoculação com a revertante Hup^+ induziu a síntese de ureídos e aumentou sua proporção na seiva de soja no tratamento controle.

- Uma correlação positiva foi observada entre a ER e a porcentagem de N-ureído., em plantas inoculadas com a mutante Hup⁻.

6 - CONCLUSÕES GERAIS

- Soja cv. Doko inoculada com a estirpe CB 1809 (Hup⁺) de *B. japonicum* fixou mais N₂ do que quando inoculada com a estirpe 29W (Hup⁻) de *B. elkanii*.
- A inoculação da soja com a estirpe Hup⁺ aumentou a produção de grãos e o total de N acumulado nos grãos quando comparada a estirpe Hup⁻.
- A proporção relativa de N-ureído no exsudato xilemático da soja cv. Doko, durante o período reprodutivo, refletiu a eficiência da fixação de N₂, podendo ser utilizado como parâmetro para a avaliação FBN.

- A presença do sistema hidrogenase ativo (Hup^+) nos nódulos parece estar associada manutenção de elevados níveis de fixação de N_2 , durante o período reprodutivo da soja cv. Doko. A manutenção da FBN nessa fase foi também dependente da luminosidade.
- Os índices de colheita de biomassa e de N foram aumentados pelo sombreamento das plantas e pela inoculação da soja com a estirpe CB 1809 de *B. japonicum*.
- Os programas de seleção de estirpes de rizóbio, visando o aumento na produção de grãos na soja, devem considerar a eficiência da fixação de N_2 e o transporte do N-fixado durante o período reprodutivo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.J.R.; BODDEY, M. URQUIAGA, S.S. A rapid and sensitive flow injection technique for the analysis of ammonium in soil extracts. Commun. Soil Science Plant Analysis, v. 24, n. 3&4, p. 277-284, 1993.
- ANONYMOUS. Validation of the publication of new names and new combinations previously published outside the IJSB: list nº 45. International Journal of Syst. Bacteriology, v. 43, p. 398-399, 1993.
- ARIMA, Y. Respiration and efficiency of N₂ fixation by nodules formed with a H₂-uptake positive strain of *Rhizobium japonicum*. Soil Science Plant Nutrition, v. 27, p. 115-119, 1981.
- ARP, D.J. Hydrogen cycling in symbiotic bacteria. In: Biological Nitrogen Fixation.eds. Stacey, G.; Burris, R.H. & Evans, H.J., p. 432-460. New York and London: Chapman & Hall, 1992.
- ATKINS, C.A. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation.eds. Dilworth, M.J. & Glenn, A.R., p. 293-319, Elsevier Science, Amsterdam, 1991.
- ATKINS, C.A.; FERNANDO, M.; HUNT, S.; LAYZELL, D.B. A metabolic connection between nitrogenase activity and synthesis of ureides in nodulated soybean. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 84, p. 441-447, 1992.

- ATKINS, C.A.; RAINBIRD, R.M.; PATE, J.S. Metabolism of purine nucleotides to form ureides in nitrogen fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). FEBRS LETTERS, v. 125, n. 1, p. 89-93, 1982.
- BETHLENFALVAY, G.S.; PHILLIPS. Variation in nitrogenase and hydrogenase activity of Alaska pea root nodules. Plant Physiology, Bethesda, v. 63, p.816-820, 1979.
- BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. II. Senescência tardia dos nódulos. Turrialba, Costa Rica, v. 40, n. 1, p. 33-39, 1990.
- BODDEY, R.M.; CHALK, M.; VICTORIA, R.L.; MAISUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical conditions estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.16, n. 6, p. 583-588, 1984.
- BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; NEVES, M.C.P. Methods for the study of nitrogen fixation assimilation and transport in grain legumes. MIRCEN J., v. 3, p. 3-22, 1987.
- BOHLEY, P. von. Reihenbestimmungen von Stickstoff in Ultramikromasstab; Kjeldahverrassung und Phenolhypoclorite Reaktion Reaktion. Hoppe Seyler's Z. Phisiol. Chem., v. 348, p. 100-110, 1967.
- BREMNER, J.M.; EDWARDS, A.P. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. I. Apparatus and procedures for distillation and

determination of ammonium. Soil Sci. Soc. Am. Proc., v. 29, p. 504-507, 1965.

- BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen-total. In: Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological Properties, Monograph, n. 9. eds. Page, A.L.; Miller, R.H.; Keeney, D.R., p. 595-624. American Society of Agronomy, Madison, 1982.
- BREWIN, N.J.; DeJONG, T.M.; PHILLIPS, D.A.; JOHNSTON, A.W.B. Cotranfer of determinatés for hydrogenase activity and nodulation ability in *Rhizobium leguminosarum*. Nature, v. 288, p. 77-79, 1980.
- BUTTERY, B.R.; PARK, S.J.; HUME, D.J. Potencial for increasing nitrogen fixation in grain legumes. Canadian Journal of Plant Science, v. 72, p. 323-349, 1992.
- CRESSWELL, A.; GORDON, A.J.; MYTTON, L.R. The physiology and biochemistry of cultivar-strain interactions in the white clover-*Rhizobium* symbiosis. Plant and Soil, Dordrecht, v. 139, p. 47-57, 1992.
- DENISION, R.F.; WEISZ, P.R.; SINCLAIR, T.R. Variability among plants in nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. Agronomy Journal, Madison, v. 77, P. 947-950, 1985.
- DIXON, R.O.D. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Archiv für Mikrobiologie, v. 85, p.193-201, 1972.

- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAM, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasília, v. 5, p. 155-161, 1970.
- DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S. Soil biology and sustainable agriculture. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 64 (supl.1), 1992.
- DREVON, J.J.; FRAZIER, L.; RUSSELO, S.A.; EVANS, H.J. Respiratory and nitrogenase activities of soybean nodules formed by hydrogenase uptake negative (HUP⁻) mutant and revertant strain of *Rhizobium japonicum* characterized by protein patterns. Plant Physiology, Rockville, v.71, p.1341-1346,1982.
- DREVON, J.J.; GAUDILLERE, J.P.; BERNOUD, J.P.; JARDINET, F.; EVRARD, M. Influence of photon flux density and flutuaction of the nitrogen fixing Glycine Max-*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis in a controlled environment. Agronomie, v. 11, p.193-199, 1991.
- DREVON, J.J.; KALIA, V.C.; HECKMANN, M.O.; SALSAC, L. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hidrogenase on the growth of Glycine and Vigna species. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 3, p. 610-612, 1987.
- DREVON, J.J.; SALZAC, L. Is hydrogenase activity beneficial for nitrogen fixation by soybean root nodules? In: Advances in Nitrogen Fixation Research. eds. Veeger, C. & Newton, W.E., p.499. The Hague: Nijhoff/JunK, 1984.

- DUQUE, F.F.; DIDONET, A.D.; DÖBEREINER, J. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* visando maior eficiência na fixação biológica do nitrogênio, na competitividade e na sobrevivência no solo. In: Anais do II Seminário Nacional de Pesquisa da Soja. EMBRAPA-CNPSO, Londrina, p. 752-765, 1982.
- EISBRENNER, G.; EVANS, H.J. Aspect of hydrogen metabolism in nitrogen fixing-legumes and other plant-microbe associations. Annual Review Plant Physiology, Rockville, v.34, p.105-136,1983.
- EMERICH, D.W., RUIZ-ARGUESO, T.; CHING, T.M.; EVANS, H.J. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. Journal of Bacteriology, v. 137, p. 153-158, 1979.
- EVANS, H.J.; HANUS, F.J.; HAUGLAND, R.A.; CANTRELL, M.A.; XU, L.S.; RUSSEL, F.J.; LAMBERT, G.R. & HARKER, A.R. Hydrogen recycling in nodules affects nitrogen fixation and growth of soybeans. In: World Soybean Research Conference III Proceedings. ed. Shibles, R., p. 935-942, Boulder: Westview Press, 1985.
- FARNDEN, K.L.F.; ROBERTSON J.G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: Methods of evaluating biological nitrogen fixation. p.265-316, Bergensen, J.F. ed. Chiclistor, 1980.
- FARNHAM, M.W.; GROSS, H.D. & CAPPY, J.J. Effect of light level on dinitrogen fixation and carbohydrate distribution in Virginia peanuts. Crop Science, Madison, v. 26, p. 311-316, 1986.

- FERNANDES, M.S. Efeito das fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 2, n. 1, p.1-6, 1990.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitxine, and hydrogenase phenotypes. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 56, p. 224-229, 1990.
- FUJIHARA, S.; YAMAGUCHI, M. Probable site of allantoin formation in nodulating soybean plants. *Phytochemistry*, v. 17, p. 1239-1243, 1978.
- FUJIHARA, S.; YAMAMOTO, K.; YAMAGUCHI, M. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Soil*, v. 48, p.233-238, 1977.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, v. 51, 1991.
- GODF'ROY, A.; DREVON, J.J. Hydrogen effect on nitrogenase (C_2H_2 reduction) response to oxygen in *Bradyrhizobium japonicum*-Phaseoleae symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, London, v. 42. p. 1379-1385, 1991.
- GOMES, M.A.F.; SODEK, L. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Physiology Plant*, v. 62, p. 105-109, 1984.

- HENRY, L.T.; RAPER, C.D.; RIDEOUT, J.W. Onset of and recovery from nitrogen stress during reproductive-growth soybean. International Journal of Plant Science, of Chicago, v. 153, n. 2, p. 178-185, 1992.
- HERRIDGE, D.F. Effect of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root bleeding, and vacuum extracted exudates of soybean. Crop Science, Madison, v. 24, p. 173-179, 1984.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; RAINBIRDT, R.M. Allantoin and allantoicacid in nitrogen economy of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). Plant Physiology, Bethesda, v. 62, p. 495-498, 1978.
- HERRIDGE, D.F.; O'CONNELL, P.; DONNELLY, K. The xylem ureide assay for nitrogen fixation: sampling procedures and source of error. Journal Experimental Botany, London, v. 39, p.12-22, 1988.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ^{15}N methods. Plant Physiology, Bethesda, v. 93, p. 495-503, 1990.
- HOLLIS, A.B.; KLOOS, W.E., ELKAN, G.H. DNA: DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiacea. Journal General Microbiology, v. 123, p. 215-222, 1981.
- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A.A.; WALLSGROVE, R.M. Nitrogen Fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. Journal of

Experimental Botany, London, v. 42, n. 240, p.839-844, 1991.

- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris* L. Tropical Agriculture, Trinidad, v. 65, n. 4, p. 341-346, 1988.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 21, p. 127-140, 1986.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Cultivar and strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. Plant and Soil; Dordrecht, v. 103, p. 111-121, 1987.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybean inoculated with isogenic HUP mutants of *B. japonicum*. Biology Fertil Soils, v. 7, p. 325-329, 1989.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; DÖBEREINER, J. Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 20, p. 1143-1156, 1985.
- HUNT, P.G.; KAUSBAUER, M.J.; MATHENY, T.A. Influence of *Bradyrhizobium japonicum* strain and far-red/red canopy light ratios on nodulation of soybean. Crop Science, Madison, v. 30, p. 1396-1408, 1990.

- IMSNADE, J. Ineffective utilization of nitrate by soybean during pod fill. *Physiology of Plant*, v. 68, p. 689-694, 1986.
- IMSANDE, J. Rapid N₂ fixation during pod-fill enhances net photosynthetic output and seed yield of soybean: A new perspective. *Agronomy Journal*, Madison, v. 81, p. 549-556, 1989.
- KEYSER, H.; VAN BERKUM, P.; WEBER, D. Nitrogenase activity and hydrogen evolution by *Rhizobium japonicum* in symbiosis with sirato and cowpea. In: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. eds. Gibson. H.A.; Newton, W.E., Australian Academy of Science, Canberra, p. 374, 1981.
- KIPE-NOLTE, J.A.; VARGAS, H. Components of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In: *Current topics in breeding of common bean*, p. 403. *Proc. Int. Bean Breed. Workshop*. Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Colômbia, 1988.
- LAWN, R.J.; BRUN, W.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthate source-sink manipulations. *Crop Science*, Madison, v. 14, p. 11-16, 1974.
- LAYZELL. D.B.; RAINBIRDT, R.M.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. Economy of use in nitrogen fixation legume nodules; observations on two contrasting simbioses. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 64, p. 888-891, 1979.

- LAYZELL, D.B.; WEAGLE, G.E.; CANVIN, D.T. A highly sensitive flow through H_2 gas analyzer for use in N_2 fixation studies. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 75, p. 582-585, 1984.
- LEPO, J.E.; HICKOK, R.E.; CANTRELL, M.A.; RUSSELL, S.A.; EVANS, H.J. Revertible hydrogen uptake-deficient mutants of *Rhizobium japonicum*. *Journal Bacteriology*, v.146, p. 614-620, 1981.
- LIAO, C.F.H. Deverda's alloy methods for total nitrogen determination. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v. 45, p. 852-855, 1981.
- MAGUE, T.H.; BURRIS, R.M. Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. *New Phytol.*, v. 71, p. 275-286, 1972.
- MARINHO, C.C.; PEIXOTO, R.C.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Avaliação em HPLC do metabolismo de nucleotídeos monofosfatados em nódulos de soja. *Anais do I Simpósio Bras. sobre Nitrogênio em Plantas*, p. 503, 1989.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M.; YAMAMOTO, Y. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulation soybean plants. *Plant cell Physiology*, v.18, p. 353-359, 1977.
- McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology*, Bethesda, v. 64, p. 411-416, 1976.

- McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W.; VOLK, R.J. Evaluation of relative content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybean. *Plant Physiology*, v. 66, p. 720-725, 1980.
- MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Cell Physiology*, v. 30, p. 877-884, 1989.
- MINAMISAWA, K.; ARIMA, Y.; KUMAZAWA, K. Rapid turnover of aspartic acid in soybean nodules formed with H₂- uptake positive *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Science of Plant Nutrition*, v. 27, p. 387-391, 1981.
- MINAMISAWA, K.; ARIMA, Y.; KUMAZAWA, K. Transport of fixed nitrogen from soybean nodules inoculated with H₂- uptake positive and vegetative *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Science of Plant Nutrition*, v. 29, n 1, p. 85-92, 1983.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SKOT, L. Limitations and benefits of oxygen diffusion control in legume nodules. In: *Physiological Limitations and Genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation*. eds. O'Gara, F.; Manian, S. & Drevon, J.J., p.77-85. Dordrech: Kluwer Academic, 1988. Publishers.
- MOSQUIM, P.R.; SODEK, L. Partitioning of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allantoin. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 30, n. 4, p. 451-457, 1992.

- MUCHOW, R.C.; ROBERTSON, M.J.; PENGELLY, B.C. Accumulation and partitioning of biomass and nitrogen by soybean, mungbean and cowpea under contrasting environmental conditions. *Field Crops Research*, v. 33; p. 13-36, 1993.
- MURPHY, P.M. Effect of light and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen fixation by herbage legumes. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 95, p. 399-409, 1986.
- NELSON, L.M. Hydrogen recycling by *Rhizobium leguminosarum* isolates and growth and nitrogen contents of pea plants (*Pisum sativum* L.) *Applied Environmental Microbiology*, V. 45, n. 3, p. 856-861, 1983.
- NELSON, L.M.; CHILD, J.J. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism by *Rhizobium leguminosarum* isolates in pea root nodules. *Can. Journal Microbiology*, v. 29, p. 1028-1031, 1981.
- NEVES, M.C.P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium-Leguminosas*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 5, p. 79-92, 1991.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *Journal Experimental Botany*, London, v. 169, p. 1179-1192, 1985.
- NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Critical Review Plant Science*, v. 6, p. 267-321, 1987.

- NEVES, M.C.P.; SUMMERFIELD, R.J.; MINCHIN, F.R. Effects of complete leaf shading during the late reproductive period on carbon and nitrogen distribution and seed production by nodule-dependent cowpea (*Vigna unguiculata*) plants. Tropical Agriculture, Trinidad, v. 59, n. 3, p. 248-253, 1982.

- OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. Annual Review of Plant Physiology, v. 36, p. 345-365, 1985.

- OHYAMA, T.; OWA, N.; FUJISHIMA, Y .; KUMAZAWA K. Nitrogen assimilation in soybean nodules. IV. Allantoin formation and transport in relation to supply with various forms of combined nitrogen. Soil Science of Plant Nutrition, v. 27, p. 55-60, 1981.

- PATE, J.S.; MINCHIN, F.R. Comparative studies of carbon and nitrogen nutrition of selected grain legumes. In: Advances in Legumes Science. eds. Summerfield, R.J.; Bunting, A.H., Royal Botanic Gardens, Kew, p. 85, 1980.

- PRUDEN, G.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. The measurement of ^{15}N in soil and plant material. of nitrogen from the legume nodule. In: Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. eds. Dilworth, M.J. & Glenn, A.R., p. 293-319, Elsevier Science, Amsterdam, 1985.

- RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules. Plant Physiology, Rockville, v. 64, p. 888-891, 1983.

- RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; COOKSON, C.; COOMBS, J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry*, v. 19, p. 341-346, 1980.
- REINBOTHE, H.; MOTHES, K. Urea, ureides and guanidines in plants. *Annual Review Plant Physiology*, v. 13, p. 129-150, 1962.
- RICE, C.F.; LUKASZAWISKI, K.M.; WALTER, S.; BLEVINS, D.G., WINKLER, R.G.; RANDALL, D.D. Changes in ureide synthesis, transport and assimilation following ammonium nitrate fertilization of nodulated soybeans. *Journal of Plant Nutrition*, v. 13, n. 12, p. 1539-1553, 1990.
- ROBERTSON, J.G.; FARNDEN, K.J.F.; WARBURTON, M.P.; BANKS, J.M. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 2; p. 265-269. 1975.
- ROSSUM, VAN D.; MUYOTCHA, A.; VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOVERD, F.C. Effect of *Bradyrhizobium* strain and host genotype, nodule dry weight and leaf area on groundnut (*Arachis hypogaeae* L. ssp. *fastigiata*) yield. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 154, p. 279-288, 1993.
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; VAN BERKUM, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brasil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 12, p. 4371-4373, 1993.

- RUMJANEK, N.G.; PEIXOTO, R.C.; NEVES, M.C.P. Fatores que influenciam a composição da seiva xilemática em soja inoculada com *B. japonicum*. Proc. III Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Viçosa, p. 3, 1991.
- SCHUBERT, K.R. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*: Comparison of activities with N₂ fixation and composition of xylem exudate during nodule development. Plant Physiology, v. 68: 1115-1122. 1981.
- SCHUBERT, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. Annual Review Plant Physiology, v. 37, p. 539-574, 1986.
- SCHUBERT, K.R.; EVANS, H.J. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc Natl Acad Sci. USA, v. 73, p. 1207-1211, 1976.
- SCHUBERT, K.R.; RYLE, G.J.A. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated legumes. In: Advances in Legumes Science. eds. Summerfield, R.J.; Bunting, A.H., Royal Botanic Gardens, Kew, p. 85, 1980.
- SHEIKHOLESLAM, S.N.; FISHBECK, K.A.; PHILLIPS, D.A. Effect of irradiante on partitioning of photosynthate to pea root nodules. Bot. Gaz., v. 141, p. 48-52, 1980.
- SHELPS, B.J.; SILVA, M.C. Distribution and metabolism of xylem-borne ureido and amino compounds in developing soybean shoots. Plant Physiology, v. 94, p. 1505-1511, 1990.

- SMITH, L.A.; HILL, S.; YATES, M.G. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. *Nature*, v. 262, p. 209-210, 1976.
- STREETER, J.G. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field growth soybean plants. *Plant Physiology*, v. 63, p. 478-483, 1979.
- SUMMERFIELD, R.J.; LAWN, R.J. Tropical grain legume crops: a commentary. *Outlook Agriculture*, v. 16, p.189-197, 1987.
- THOMAS, R.J.; JOKINEN, K.; SCHRADER, L.E. Effect of *Rhizobium japonicum* mutants with enhanced N₂ fixation activity on N transport and photosynthesis of soybean during vegetative growth. *Crop Science*, v. 23, p. 453-456, 1983.
- THOMAS, R.J.; SCHRADER, L.E. Review: Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry*, v. 20, p. 361-371, 1981.
- VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 3835-3841, 1990.
- VAN BERKUM, P.; SLOGER, C.; WEBER, D.F.; CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H. Relationship between ureide N and N₂ fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* L. (Merr.). *Plant Physiology*, V. 77, n. 1, p. 53-58, 1985.
- VAN SOOM, C.; RUMJANEK, N.G.; VANDERLEYDEN, J.; NEVES, M.C.P. Review: Hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*:

genetics, regulation and effect on plant growth. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 9, 1993.

- VESSEY, J.K. Cultivar differences in assimilate partitioning and capacity to maintain N_2 fixation rate in pea during pod-filling. Plant and Soil, Dordrecht, v. 139, p. 185-194, 1992.
- VIKMAN, P.; VESSEY, J.K. The decline in N_2 fixation rate in common bean with the onset of pod-filling: Fact or artifact. Plant and Soil, Dordrecht, v. 147, p. 95-105, 1992.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. I.B.P. Handbook n.15. Blackwell Scientific Publishers, London, 164p., 1970.
- VOGELS, G.D.; DRIFT, C. van der. Differential analysis of glyoxylate derivatives. Anal. Biochemistry, v. 33, p. 143-57, 1970.
- WALSH, K.B.; VESSEY, J.K.; LAYZELL, D.B. Carbohydrate supply and N_2 fixation in soybean. The effect of varied daylength and stem girdling. Plant Physiology, v.85, p. 137-144, 1987.
- WITTY, J.F., SKOT, L.; REVESBECH, N.P. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O_2 diffusion. Journal of Experimental Botany, London, v. 38, p. 1129-1140, 1987.

- YATES, M.G. The role of oxygen and hydrogen in nitrogen fixation. In: The Nitrogen and Sulphur Cycles. Society of General Microbiology Symposium.eds. Cole, J.A. & Ferguson. Published by Cambridge University Press, 1988.
- YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrogen supplied as nitrate, amides, and allantoin to detached vegetative shoots of soybean via transpiration stream. Soil Science of Plant Nutrition, v. 30, p. 333, 1984a.
- YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrate, asparagine, and allantoin in the soybean shoots at the grain-filling stage. Soil Science of Plant Nutrition, v. 30, p. 583-587, 1984b.

8 - ANEXO

Análise de N-total na seiva xilemática

1- Digestão: Alíquotas (10 ml) de seiva xilemática foram colocadas em tubos de ensaio, adicionadas ao líquido digestor (200 ml) e colocadas em um bloco digestor (Grant mod.BT5-16). As amostras foram submetidas às seguintes temperaturas: 100°C (30 min.), 150°C (60 min.) e 300°C (90 min.).

A determinação do NH_4^+ foi feita utilizando o sistema de fluxo contínuo descrito por Alves et al. (1993) modificado nas concentrações dos reagentes e vazão dos tubos de tygon para a análise da seiva xilemática das plantas de soja, conforme a especificação no item 2.

Antes do início da leitura do NH_4^+ foram adicionados aos tubos de ensaio 5 ml de NaOH 0,005 N para a redução da acidez residual da solução evitando a formação de precipitado. O volume final de 5 ml foi suficiente para a leitura do NH_4^+ das amostras pelo sistema de fluxo contínuo-FIA permitindo boa sensibilidade de detecção.

As concentrações do padrão (alantoína 0,05 mM) foram: 0,403; 0,806; 1,61; 2,42; 3,22 mg N/5 ml.

2- Sistema de fluxo contínuo - FIA para análise do N-total da seiva xilemática

O sistema de fluxo contínuo consta de um espectrofotômetro digital (Micronal mod. B342) equipado com células de fluxo contínuo, uma bomba peristáltica com 6 canais (Micronal mod. B322II) acoplada a um comutador-injetor de amostras equipado com bobinas de reação imersa em banho de água a 70°C.

A vazão dos tubos de tygon da bomba peristáltica foram as seguintes:

Salicilato - 2,18 ml/min.;

Hipoclorito - 1,06 ml/min.;

Hidróxido de sódio - 1,76 ml/min.;

Água (carreador) - 3,23 ml/min.;

Amostra - 3,23 ml/min.

O comprimento de onda do espectrofotômetro utilizado foi de 647 nm.

Reagentes:

Líquido digestor: 203 g de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ dissolvidos em 300 ml de água deionizada + 230 ml H_2SO_4 conc. + 5,4 g HgCl_2 dissolvidos em 200 ml de água deionizada completados para um volume final de 1 litro.

Salicilato: 20 g salicilato de sódio + 80 mg de nitroprussiato de sódio em 100 ml de água deionizada.

Hipoclorito de sódio: 10% de hipoclorito de sódio.

Hidróxido de sódio: 5 g de hidróxido de sódio em 100 ml de água deionizada.