

# Seleção de Estirpes de *Rhizobium* para o Feijoeiro. I — Precocidade para Nodulação e Fixação do Nitrogênio<sup>1</sup>

C. A. Barradas\*, M. Hungria\*\*

## ABSTRACT

In common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), there is a period of N stress, between 15 and 22 days after emergence (DAE), due to a lack of synchronization between the depletion of N in the cotyledons and the beginning of nitrogen fixation. In three experiments performed under glasshouse conditions, 24 *Rhizobium* strains were examined for precocity of nodulation and N<sub>2</sub> fixation. Plants were harvested between 16 and 31 DAE. The strains H-20, H-24, H-37 and H-41 (from EMBRAPA-CPAC) and CNPAF 111, 112, 119, 233 and 234 (EMBRAPA-CNPAF) were the earliest to nodulate, showing differences in total N accumulation in tissues at 16 DAE. These strains also showed, since the first harvest, a pink internal nodule colour, higher nitrogenase activity, less electron loss via H<sub>2</sub> evolution, a higher ureide concentration in the xylem sap and a higher transport of total N in the xylem. Nitrogen accumulated in the nodules during this critical period of N stress, probably showing a deficient translocation of this element. Results showed that it is possible to select *Rhizobium* strains that avoid the initial classical symptoms of N deficiency in nodulated beans.

## INTRODUÇÃO

O potencial para a obtenção de grandes produções de grãos baseadas na nodulação efetiva e na fixação biológica do nitrogênio eficiente e prolongada existe para a maioria das leguminosas. No caso do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), porém, embora seja uma das leguminosas mais utilizadas na alimentação brasileira, os programas de melhoramento até recentemente conduzidos não consideraram a capacidade dessa planta de fixar nitrogênio. Esse enfoque deveu-se às suposições iniciais de que o feijoeiro

## RESUMO

Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulado tem-se observado um período de deficiência de N, entre os 15 e os 22 dias após a emergência (DAE), que ocorre devido à falta de sincronização entre o esgotamento de N dos cotilédones e o início da fixação do N<sub>2</sub>. Em três experimentos conduzidos sob condições de casa-de-vegetação procurou-se identificar, entre 24 estirpes de *Rhizobium*, as mais precoces para nodulação e fixação do N<sub>2</sub>. As coletas foram realizadas entre os 16 e os 31 DAE. As estirpes H-20, H-24, H-37 e H-41 (provenientes da EMBRAPA-CPAC) e as CNPAF 111, 112, 119, 233 e 234 (EMBRAPA-CNPAF) foram bastante precoces, apresentando diferenças no N total acumulado nos tecidos já aos 16 DAE. Essas estirpes se caracterizaram por apresentar, desde a primeira coleta, coloração interna rósea nos nódulos, maior atividade da nitrogenase, pequena perda de elétrons pela evolução do H<sub>2</sub>, maior concentração de ureídeos na seiva do xilema e maior transporte de N total no xilema. Observou-se que ocorre um acúmulo de N nos nódulos durante esse período crítico de estresse de N, provavelmente indicando a deficiência de translocação desse elemento. Os resultados mostraram que é possível selecionar estirpes de *Rhizobium* que consigam evitar os sintomas iniciais clássicos de deficiência de N em feijoeiro nodulado.

apresentaria uma baixa capacidade de fixação do N<sub>2</sub>, relacionada com o ciclo curto da cultura, sua sensibilidade aos fatores ambientais (3), pequena porcentagem de células infectadas nos nódulos (21), causando uma baixa atividade específica (8), e a queda abrupta de fixação logo após o florescimento (23).

Estudos mais recentes, porém, têm mostrado que o feijoeiro nodulado pode acumular altos teores de N, às vezes semelhantes aos das plantas recebendo N mineral (6, 12, 16), desde que sejam utilizadas cultivares e estirpes de *Rhizobium* adequadas e condições ambientais favoráveis. O estudo dos fatores ambientais e intrínsecos à simbiose que limitam a maximização da fixação biológica do N<sub>2</sub> nessa cultura é, portanto, de grande relevância, devido à utilização extensiva dessa leguminosa na América Latina.

Um dos fatores limitantes está na constatação de um período inicial de estresse de N em feijoeiro nodulado, que ocorre devido à falta de sincronização entre o esgotamento das reservas de N dos cotilédones da planta hospedeira e o início da fixação e exportação

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 14 junho 1988

Agradecimentos a bióloga Lúcia Helena Boddey, pelo auxílio na condução dos experimentos. Ao CNPq, pela bolsa concedida à C. A. A. Barradas e à FINIP, pelo financiamento parcial desta pesquisa. Gostaríamos de agradecer também à Srta. Miriam pela datilografia do trabalho e ao Sr. Jair pelas ilustrações.

\* Eng. Agrônomo, Bolsista do CNPq

\*\* Eng. Agra., Dra. EMBRAPA, Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS, Km 47 Cep 23851, Rio de Janeiro)

do N<sub>2</sub> fixado pelos nódulos (5, 7, 9) Devido ao ciclo curto da cultura, esse período pode afetar diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Consequentemente, tem sido recomendada, muitas vezes uma dose de arranque de fertilizante nitrogenado, que pode apresentar efeitos benéficos para o crescimento das plantas (17) e até estimular o crescimento dos nódulos (1) Mas o feijoeiro é considerado como extremamente sensível ao N mineral, que geralmente prejudica a nodulação e atividade da nitrogenase (4, 11, 12)

Por isso, neste trabalho, procurou-se investigar a capacidade de diferentes estirpes de *Rhizobium* de apresentarem nodulação e fixação do N<sub>2</sub> precoces, bem como identificar alguns parâmetros fisiológicos relacionados com a fase inicial de fixação do N<sub>2</sub> no feijoeiro.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos sob condições de casa -de-vegetação na EMBRAPA-UAPNPBS, Km 47, Rio de Janeiro, no período de outubro de 1986 a julho de 1987

Utilizaram-se sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro Argel, que tem sido reconhecida como responsiva à fixação do N<sub>2</sub> (10). Foram utilizadas 24 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, escolhidas entre o material mais promissor proveniente da EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (Experimento 1) (H-20, H-24, H-37, H-38, H-39, H-40, H-41 V-23), da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Experimento 2) (CNPAF 100, 109, 111, 112, 125, 126, 192, 512) e da EMBRAPA - CNPAF e CPAC (Experimento 3) (H-4, H-5, CNPAF 103, 105, 107, 119, 233, 234) As estirpes de *Rhizobium* cresceram em meio de cultura extrato de levedura - manitol - agar (20) a 30°C, por quatro dias com agitação. A inoculação, plantio, desbaste e fornecimento de solução nutritiva foram como descritas anteriormente (10). As plantas cresceram em vasos de Leonard modificados (20), cada um contendo duas plantas e utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições e três coletas, respectivamente aos 16, 22 e 27 dias após a emergência (DAE) no experimento 1, aos 17, 24 e 31 DAE no experimento 2 e aos 17, 24 e 30 DAE no experimento 3.

Em cada coleta cortou-se a parte aérea das plantas na altura do nó cotiledonar, lavando-se com água destilada e, após a secagem com papel absorvente, iniciou-se a coleta da seiva do xilema durante 15 minutos, calculando-se posteriormente a taxa de exsudação. A seiva das três repetições (6 plantas) foi co-

letada em um único tubo, que foi mantido a -20°C até o momento de analisar o N-total e o N-ureído (2).

Das duas plantas de cada vaso, uma foi usada para a determinação da atividade da nitrogenase, pelo método de redução do acetileno, e a outra para a determinação da evolução do H<sub>2</sub>. A atividade da nitrogenase foi avaliada em raízes noduladas destacadas, incubadas em frascos de 270 ml hermeticamente fechados, durante 4 minutos, em uma atmosfera de 12% do acetileno (10). A determinação do etileno produzido, da evolução do H<sub>2</sub> pelos nódulos e da eficiência relativa da nitrogenase foi realizada conforme descrito anteriormente (10).

A parte aérea, raiz e nódulos foram colocados para secagem em estufa a 60-70°C até atingirem peso constante, determinando-se então o N total (2).

#### RESULTADOS

No primeiro experimento, pode-se constatar que algumas estirpes, como a H-20, H-37 e H-41 conseguiram se destacar das demais já aos 16 dias após a emergência (DAE), com maior peso seco de nódulos (Tabela 1). Os nódulos dessas estirpes e da H-24 apresentaram coloração rósea desde essa coleta inicial, destacando-se também em relação à atividade e eficiência relativa da nitrogenase (Fig. 1). As plantas inoculadas com essas 4 estirpes mostraram somente leves sintomas de deficiência de N, apresentando maior acúmulo de N total na parte aérea (Tabela 1).

Até o final do ciclo vegetativo, aos 27 DAE, confirmou-se o melhor desempenho dessas estirpes, cuja média de fixação do N<sub>2</sub> superou em 92% a média das demais.

O N total dos nódulos aumentou, em cada coleta, devido ao aumento no número e, consequentemente, no peso seco dos mesmos. A concentração de N nos nódulos, porém, caiu de um valor médio de 5,18% no período de estresse de N (16 DAE) para 4,25% na coleta seguinte, realizada apenas após 6 dias. Nessa mesma época, houve um incremento considerável no transporte de ureídeos na seiva do xilema (Fig. 2) e na atividade da nitrogenase (Fig. 1), embora incrementos maiores nesses parâmetros tenham sido observados no período entre 22 e 27 DAE. Durante o período vegetativo analisado os nódulos representaram, em média, 19,7% do N total das plantas.

No segundo experimento, uma análise de todos os parâmetros relativos à precocidade da fixação aos 17 DAE (nodulação, atividade e eficiência da nitrogenase) mostrou um destaque para as estirpes CNPAF

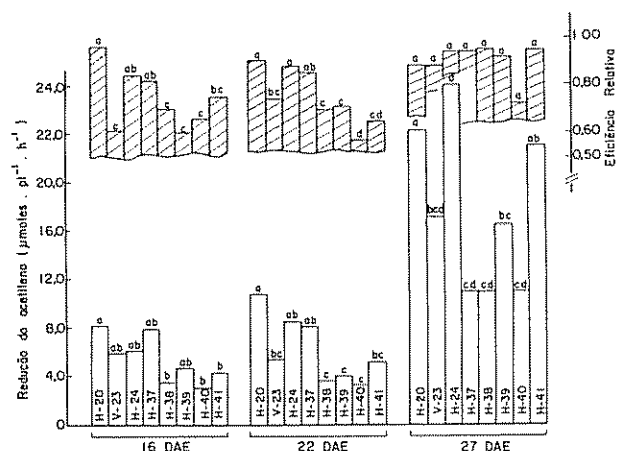


Fig. 1. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA - CPAC, na atividade e eficiência relativa

$$(ER = \frac{H_2/ar}{C_2 H_4}) \text{ da nitrogenase de feijão, cv Negro}$$

Argel, durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

111 e CNPAF 112 (Tabela 2 e Fig. 3). Esse desempenho se confirmou também até o período de pré-florescimento, com taxas bastante significativas de fixação do  $N_2$ , ou seja,  $3.36 \text{ mg N planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  para a CNPAF 111 e de  $6.70 \text{ mg N planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  para a CNPAF 112 no período entre 24 e 31 DAE (Tabela 2). As estirpes CNPAF 109 e CNPAF 126, embora tenham apresentado uma nodulação e fixação iniciais muito boas, já começaram a ser ultrapassadas pelas CNPAF 111 e, 112 aos 24 DAE (Tabela 2). Uma vez mais, foi verificada uma queda na % N dos nódulos de 4.59% aos 17 DAE (não considerando a estirpe CNPAF 125, que ainda não apresentava nódulos), para 3.87% de N aos 24 DAE (Tabela 2), concomitantemente com um aumento da % N-ureido na seiva do xilema (Fig. 4) e um enorme incremento na atividade da nitrogenase (Fig. 3). Estirpes pouco eficientes, como as CNPAF 125 e 192, além de apresentarem baixa nodulação (Tabela 2) e atividade da nitrogenase (Fig. 3) também apresentaram uma maior perda de elétrons e ATP pela evolução do  $H_2$  aos 17 e aos 31 DAE (Fig. 3) e um menor transporte de ureídos na seiva do xilema (Fig. 4). Os nódulos representaram, na coleta final, 21.75% do N total da planta

Tabela 1. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA-CPAC no peso seco ( $\text{mg.pl}^{-1}$ ) e % N dos nódulos e no N total ( $\text{mg N.pl}^{-1}$ ) acumulado em feijão cv. Negro Argel durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $P = 0.05$ ).

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Nódulos		Parte aérea		Raiz	N total da planta
	Peso seco	% N	N total	N total		
16 dias após a emergência (DAE)						
H-20	88 a	5.35 b	4.64 a	14.05 a	3.22 a	21.86 a
H-24	69 b	5.89 a	4.05 ab	14.12 a	3.06 a	21.13 a
H-37	77 abc	5.82 a	4.46 ab	13.30 a	3.21 a	20.91 a
H-38	59 bc	5.89 a	3.46 bcd	12.70 a	3.86 a	19.93 a
H-39	57 bc	4.43 b	2.54 d	9.50 b	2.36 a	14.34 b
H-40	62 bc	4.63 c	2.86 cd	9.62 b	2.67 a	15.08 b
H-41	79 ab	4.85 c	3.86 abc	15.40 a	3.44 a	22.62 a
V-23	53 c	4.57 c	2.43 d	7.18 b	3.50 a	13.11 b
22 DAE						
H-20	134 a	4.74 ab	6.38 a	28.74 a	3.95 ab	38.96 a
H-24	146 a	4.96 a	7.25 a	29.38 a	4.29 a	40.84 a
H-37	143 a	4.90 a	6.96 a	23.49 ab	3.61 abc	33.94 ab
H-38	162 a	4.82 ab	7.78 a	21.85 b	3.27 abc	32.82 ab
H-39	133 a	3.44 d	4.61 a	13.42 c	3.42 abc	21.36 cd
H-40	101 a	3.23 d	3.30 a	10.09 c	2.47 c	15.79 d
H-41	140 a	3.72 cd	5.22 a	20.15 b	2.93 bc	28.20 bc
V-23	119 a	4.24 bc	5.04 a	8.22 c	2.47 c	15.66 d
27 DAE						
H-20	243 a	4.19 ab	10.30 a	37.98 a	5.21 a	53.34 ab
H-24	202 a	4.65 a	9.43 a	41.52 a	5.87 a	58.72 a
H-37	213 a	4.92 a	10.48 a	38.32 a	4.90 ab	53.60 ab
H-38	218 a	4.75 a	10.39 a	27.80 b	5.21 a	43.36 b
H-39	226 a	3.48 b	7.84 ab	16.79 c	3.74 bc	28.31 c
H-40	124 b	3.86 b	4.74 bc	13.96 c	3.59 bc	22.18 c
H-41	216 a	3.61 b	7.79 ab	36.55 ab	5.20 a	49.10 ab
V-23	93 b	3.72 b	3.48 c	11.47 c	2.81 c	17.72 c

Tabela 2. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA-CNPAF no peso seco ( $\text{mg.pl}^{-1}$ ) e % N dos nódulos e no N total ( $\text{mg N.pl}^{-1}$ ) acumulado em feijão, cv. Negro Argel, durante a fase inicial de crescimento. Médias de 3 repetições e os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $P = 0.05$ ).

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Nódulos			Parte aérea	Raiz	N total da planta
	Peso seco	% N	N total	N total	N total	
17 dias após a emergência (DAE)						
100	23 c	4.18 c	1.0 b	4.87 b	2.04 a	7.91 b
109	72 a	4.38 bc	3.18 a	11.49 a	2.48 a	17.15 b
111	59 ab	5.05 ab	2.97 a	11.84 a	1.93 a	16.74 a
112	76 a	4.89 abc	3.71 a	13.25 a	2.30 a	19.26 a
125	0 c	0 c	0 c	4.39 b	1.86 a	6.26 b
126	65 ab	5.37 a	3.58 a	10.29 a	2.23 a	16.09 a
192	15 c	3.21 d	0.50 b	5.26 b	2.47 a	8.23 b
512	47 b	5.07 ab	2.35 a	5.40 b	1.93 a	9.68 b
24 DAE						
100	89 bc	4.69 a	4.15 b	10.60 bc	2.73 a	17.48 bc
109	131 ab	4.61 a	6.03 ab	17.49 b	4.29 a	27.81 ab
111	158 ab	4.70 a	7.43 a	30.15 a	3.31 a	40.89 a
112	138 ab	4.57 a	6.33 ab	19.61 b	3.66 a	29.60 ab
125	20 d	3.87 b	0.77 c	4.06 c	3.22 a	8.05 c
126	125 ab	4.77 a	5.96 ab	15.62 b	3.06 a	24.65 b
192	32 cd	2.78 c	0.87 c	4.32 c	2.20 a	7.39 c
512	162 a	4.85 a	7.90 a	18.07 b	2.65 a	28.62 ab
31 DAE						
100	141 c	4.73 a	6.66 cdc	25.59 c	2.78 c	35.00 cd
109	340 ab	4.21 ab	14.32 ab	32.66 bc	3.65 bc	50.63 bc
111	316 ab	3.96 b	12.48 abc	46.90 ab	5.06 a	64.44 ab
112	362 a	4.80 a	17.36 a	53.69 a	5.48 a	76.53 a
125	137 cd	3.68 bc	5.04 de	10.17 d	3.57 bc	18.78 de
126	216 bc	4.33 ab	9.35 bcd	38.18 bc	4.50 ab	52.04 bc
192	64 d	3.17 c	2.01 e	3.32 d	2.54 c	7.88 e
512	171 cd	4.10 ab	7.03 cde	25.41 c	3.51 c	35.95 cd

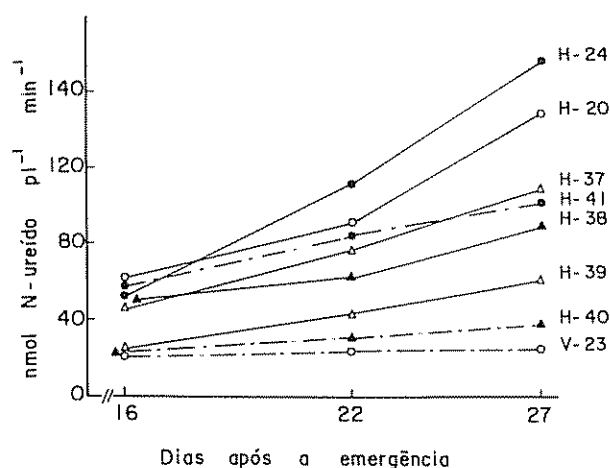


Fig. 2. Taxa de transporte de N-ureído na seiva do xilema de feijão, cv. Negro Argel, inoculado com 8 estirpes de *Rhizobium*. Cada ponto representa a seiva coletada de 6 plantas.

No terceiro experimento, as estirpes H-5 e CNPAF 103 foram extremamente tardias na nodulação (Tabela 3). A estirpe CNPAF 234 apresentou maior precocidade de nodulação e fixação do  $\text{N}_2$  já acumulando, aos 17 DAE, teores de N na parte aérea significativamente maiores do que nas plantas inoculadas com as outras estirpes. Até a coleta final, no pré-florescimento, destacaram-se as estirpes CNPAF 119, CNPAF 233 e CNPAF 234 (Tabela 3). Os dados de atividade da nitrogenase e transporte de N na seiva do xilema não foram aqui colocados porque concordam com os dados obtidos nos outros dois experimentos, ou seja, essas três estirpes apresentaram maior atividade da nitrogenase, menor evolução do  $\text{H}_2$  pelos nódulos, maior transporte de N total na seiva do xilema e maior produção de ureídeos. Novamente também se observou um decréscimo na % N média dos nódulos de 4.55% aos 17 DAE para 4.16% aos 24 DAE (Tabela 3). Aos 30 DAE o N total dos nódulos representou 19.76% do N total das plantas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium*, provenientes da EMBRAPA-CPAC e CNPAF, no peso seco (mg.pl<sup>-1</sup> e % N dos nódulos e no N total (mg N.pl<sup>-1</sup>) acumulado em feijão, cv. Negro Argel, até os 27 dias após a emergência (DAE). Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (P = 0.05).

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Nódulos			Parte aérea	Raiz	N total da planta
	Peso seco	% N	N total	N total	N total	
17 DAE						
H-4	22 c	2.80 b	0.62 c	5.42 cd	2.42 a	8.46 d
H-5	0 c	0 c	0 c	4.75 d	2.40 a	7.15 d
103	0 c	0 c	0 c	4.76 d	2.49 a	7.25 d
105	50 b	4.85 a	2.42 b	6.58 ed	2.77 a	11.77 c
107	82 a	4.90 a	4.02 a	9.15 b	2.60 a	15.77 b
119	54 b	4.90 a	2.65 b	7.64 bc	2.68 a	12.97 bc
233	49 b	4.90 a	2.40 b	7.44 bc	2.67 a	12.51 bc
234	102 a	4.93 a	5.03 a	13.48 a	2.55 a	21.06 a
24 DAE						
H-4	33 d	2.68 b	0.88 d	5.62 d	2.72 a	9.22 d
H-5	0 d	0 c	0 d	4.80 d	2.50 a	7.30 d
103	0 d	0 c	0 d	4.11 d	2.50 a	7.41 d
105	114 c	4.70 a	5.36 c	12.00 c	3.23 a	17.28 c
107	104 c	4.55 a	4.73 c	14.22 bc	3.63 a	22.58 b
119	178 a	4.36 a	7.76 a	18.94 a	3.71 a	30.41 a
233	127 bc	4.37 a	5.55 bc	16.23 ab	3.51 a	25.29 ab
234	153 ab	4.30 a	6.58 ab	15.62 abc	3.36 a	25.56 ab
30 DAE						
H-4	68 b	2.72 b	1.85 d	7.84 c	3.68 c	13.37 c
H-5	17 b	2.94 b	0.50 d	5.79 c	3.42 c	9.71 c
103	22 b	3.95 a	0.87 d	5.80 c	3.66 c	10.33 c
105	182 a	4.50 a	8.19 c	27.20 b	3.84 bc	39.23 b
107	226 a	4.45 a	10.06 b	25.71 b	4.67 abc	40.44 b
119	219 a	4.30 a	9.42 b	40.45 a	5.71 a	55.58 a
233	188 a	4.98 a	9.36 b	41.03 a	5.15 ab	55.54 a
234	239 a	4.99 a	11.93 a	39.27 a	4.58 abc	55.78 a

### DISCUSSÃO

Na simbiose *Rhizobium* – leguminosa ocorre um fluxo constante de C proveniente da fotossíntese para os nódulos e de N proveniente da fixação para a planta hospedeira. Por isso, desde os estudos realizados na década de 30, a fotossíntese foi considerada como o fator limitante para a fixação do N<sub>2</sub> (14). Em leguminosas que produzem grãos grandes, como soja e feijão, o início da nodulação pode ocorrer independentemente da fotossíntese, somente às custas das reservas cotiledonares (15). Logo depois, porém, os nódulos passam a constituir um dreno considerável de fotosintatos, competindo com outros órgãos em crescimento, e vários trabalhos mostraram que a fixação do N<sub>2</sub> estaria limitada, já nessa fase inicial, pela disponibilidade de C (14). William *et al.* (24), porém, ao fornecerem CO<sub>2</sub> ou N mineral às plântulas de soja noduladas, observaram que o desenvolvimento e funcionamento inicial dos nódulos estavam limitados pela disponibilidade de N e não pela disponibilidade de fotosintatos. Essa observação indica que a deficiência inicial de N que ocorre antes do funcionamento pleno

dos nódulos prejudica não só a nutrição nitrogenada da planta hospedeira como a formação e funcionamento dos próprios nódulos.

A seleção de estirpes de *Rhizobium* com nodulação e fixação do N<sub>2</sub> precoces, portanto, é crucial tanto para o melhor crescimento das plantas no início do ciclo vegetativo como para a própria formação e funcionamento dos nódulos, mas pouca atenção tem sido dada a essa seleção. Voss (22) constatou, através de observações visuais da intensidade da coloração verde, que o início da fixação do N<sub>2</sub> variava entre os 19 e os 26 dias após a emergência em feijão cv. Carioca inoculado com 40 diferentes estirpes. Essa diferença de 7 dias em uma planta cujo ciclo está por volta de 70-80 dias, tem reflexos diretos na produção. Pelos dados apresentados neste trabalho, pode-se constatar que algumas estirpes, como a H-20, H-24, H-37, H-41, CNPAF 111, CNPAF 112, CNPAF 119, CNPAF 233 e CNPAF 234 conseguiram ser bastante precoces, apresentando maior atividade da nitrôgenase e baixa perda de elétrons pela evolução do H<sub>2</sub> pelos nódulos já aos 16-17 DAE. O transporte de N

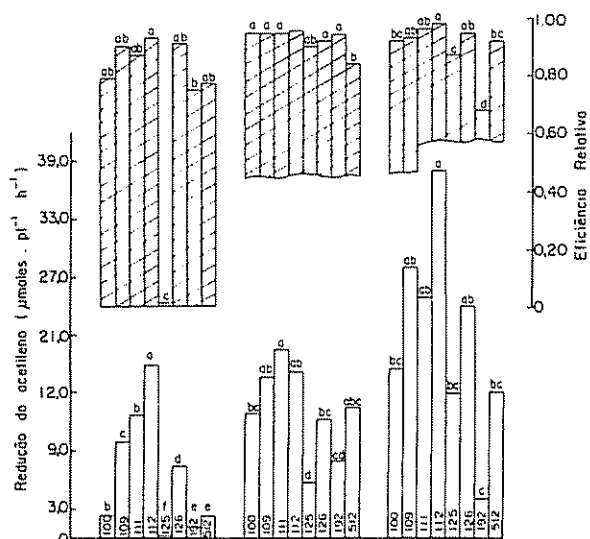


Fig. 3. Efeito de 8 estirpes de *Rhizobium* provenientes da EMBRAPA - CNPAF, na atividade e eficiência relativa

$$(ER = 1 - \frac{H_2/ar}{C_2H_4}) \text{ da nitrogenase de feijão, cv.}$$

Negro Argel, durante a fase de crescimento vegetativo. Médias de 3 repetições e valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%

total na seiva do xilema também foi maior, nessa época, nas plantas inoculadas com essas estirpes, o que resultou em maiores teores de N total na parte aérea já na primeira coleta e as plantas apresentaram apenas leves sintomas de clorose

As estirpes precoces também apresentaram maiores teores de N sob a forma de ureídeos na seiva do xilema. Os ureídeos representam a principal fração de N transportado na seiva do xilema de feijão nodulado (5, 10). De alguma forma as estirpes podem afetar o metabolismo de N nos nódulos e as combinações simbióticas mais eficientes passam a transportar mais N sob a forma de ureídeos (10), provavelmente devido à baixa relação C:N desses compostos (1, 0), o que representa uma economia considerável de esqueletos de C. Essa relação entre eficiência e transporte de ureídeos é também confirmada neste trabalho, observando-se também um aumento na produção desses compostos nitrogenados a partir dos 16 DAE.

Nos três experimentos conduzidos constatou-se que, aos 16-17 DAE, época de maior intensidade do estresse de N, a % de N dos nódulos era elevada, em média 4,77%. Apenas 6-7 dias depois, quando as plantas já exibiam coloração verde intensa, a % de N nos nódulos caiu para 4,09%, portanto cerca de 17%. Um relato semelhante foi feito em 1920 por Joshi (13), que relatou que a % de N nos nódulos de

*Crotalaria* caiu de 10,81% na primeira semana para 3,36% de N cinco semanas mais tarde. As observações de Joshi e as deste experimento podem indicar que, apesar da atividade da nitrogenase às vezes ser elevada antes mesmo dos 16 DAE, o transporte do  $N_2$  fixado para a parte aérea ainda não ocorre totalmente, havendo um acúmulo de N nos nódulos. Uma hipótese seria a de que a ligação entre os vasos do xilema dos nódulos e da planta hospedeira ainda não estaria totalmente completada. Outra hipótese poderia ser a de que as enzimas responsáveis pela assimilação da amônia fixada ainda não estariam em plena atividade. Isso poderia ocorrer porque há evidências de que a indução dessas enzimas resulta do estabelecimento da excreção de amônia pelos bacteróides (18)

Tem sido generalizada a idéia de que as leguminosas epigeas, como soja e feijão, quando noduladas, apresentam um período inicial de estresse de N (19). Os resultados dos três experimentos aqui relatados, porém, mostraram que é possível selecionar estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro que nodulem e fixem  $N_2$  precocemente. As melhores estirpes acumularam, até o período pré-florescimento, entre 49,10 e 76,53 mg de N por planta. Esses valores são bastante elevados e abrem perspectivas promissoras para que se possa eliminar a "dose de arranque" de fertilizante nitrogenado, normalmente usada em feijoeiro nodulado, e que prejudica a nodulação e fixação do  $N_2$ .

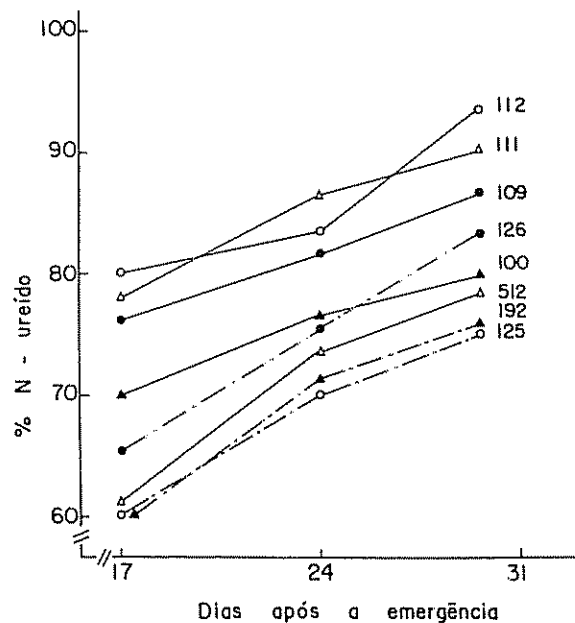


Fig. 4. % N ureide ( $\frac{N \text{ ureide}}{N \text{ total}} \times 100$ ) na seiva do xilema de feijão, cv Negro Argel, inoculado com 8 estirpes de *Rhizobium*. Cada ponto representa a seiva coletada de 6 plantas.

## LITERATURA CITADA

- 1 BECANA, M.; SPRENT, J. I. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiologia Plantarum* 70:757-765.
- 2 BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; NEVES, M.C.P. 1987. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. *MIRCEN Journal* 3:3-22.
- 3 BURTON, J.C. 1974. Pragmatic aspects of the *Rhizobium*. Leguminous plant association. In *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Ed. by Newton, W.E.; Nyman, C.J. Washington, D.C.: State University Press. v.1, p. 429-446.
- 4 CARTWRIGHT, P.M. 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Annals of Botany* 31:309-321.
- 5 COOKSON, C.; HUGHES, H.; COOMBS, J. 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 148:338-345.
- 6 DUBOIS, J.D.; BURRIS, R.H. 1986. Comparative study of N uptake and distribution in three lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at early pod filling stage. *Plant and Soil* 93:79-86.
- 7 FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N. 1982. Nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. *Plant and Soil* 66:149-160.
- 8 HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43:1185-1207.
- 9 HILDEBRAND, D.F.; HARPER, J.E.; HYMOWITZ, F. 1981. Effect of nitrate level on nitrogen metabolism in winged and soya bean. *Annals of Botany* 48:307-313.
- 10 HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. 1986. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 21:127-140.
- 11 HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J. 1987. Effects of cotyledons and nitrate on the nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris*. *MIRCEN Journal* 3:411-419.
- 12 HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. 1985. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro II. Absorção e translocação do N mineral e do N<sub>2</sub> fixado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 9:201-209.
- 13 JOSHI, N.V. 1920. Studies on the root nodule organism of the leguminous plants. *Bacteriology Series* 1:274-276.
- 14 NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. 1987. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Critical Review in Plant Sciences* 3:267-321.
- 15 RAGGIO, M.; RAGGIO, N. 1956. Relación entre cotiledones y nodulación y factores que la afectan. *Phyton* 7:103-119.
- 16 RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. 1984. N-determined time course for N<sub>2</sub> fixation in two cultivars of field bean. *Agronomy Journal* 76:146-154.
- 17 RIGAUD, J. 1981. Comparison on the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. In *Nitrogen and Carbon Metabolism*. Ed. by Bewley, J.D. The Hague, Martinus Nijhoff. p. 217-248.
- 18 ROBLERTSON, J.G.; FARNDEN, K.J.F.; WARBURTON, M.P.; BANS, J.A.M. 1975. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. *Australian Journal of Plant Physiology* 2:265-272.
- 19 SPRENT, J.; THOMAS, R.J. 1984. Nitrogen nutrition of seedlings of grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Plant, Cell and Environment* 7:637-645.
- 20 VINCENT, J.M. 1970. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell. 164 p. (International Biological Program Handbook no. 15).
- 21 VINCENT, J.M. 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In *The biology of nitrogen fixation*. Ed. by Quispel, A. Amsterdam, North-Holland Publishers. p. 265-341.
- 22 VOSS, M. 1981. Seleção de *Rhizobium phaseoli* de regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado. Porto Alegre, UFRS. 75 p.
- 23 WESTERMAN, D.T.; KOLAR, J.J. 1978. Symbiotic N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation by bean. *Crop Science* 18:986-990.
- 24 WILLIAMS, L.E.; DE JONG, T.M.; PHILLIPS, D.A. 1981. Carbon and nitrogen limitations on soybean seedling development. *Plant Physiology* 68:1206-1209.