

EFEITO DO SOMBREAMENTO NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM FEIJOEIRO¹

MARIANGELA HUNGRIA², RICHARD J. THOMAS³ e JOHANNA DÖBEREINER⁴

RESUMO - Conduziram-se dois experimentos com o objetivo de verificar o efeito da redução da luminosidade e da temperatura, causado pelo sombreamento, na fixação biológica do N₂ em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Quando se realizou um sombreamento de 25%, houve um aumento, em relação à luminosidade total, do peso de matéria seca, atividade da nitrogenase, nitrogênio total transportado na seiva do xilema, percentagem de N transportado sob a forma de ureídeos, e do nitrogênio-total acumulado na parte aérea. Nesse nível de sombreamento, o aumento na eficiência nodular compensou a redução no peso dos nódulos. O efeito favorável do sombreamento de 25% foi atribuído à redução das temperaturas máximas diurnas nos vasos sombreados e a redução da energia solar foi compensada por um aumento na área foliar. No nível de sombreamento de 40%, embora ocorresse redução da temperatura na zona radicular e aumento na área foliar, isso não foi suficiente para compensar a menor atividade fotossintética. De modo geral, as temperaturas elevadas não prejudicaram a formação e crescimento dos nódulos, mas sim o seu funcionamento, refletido na menor atividade da nitrogenase e no menor acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, fixação do N₂, atividade da nitrogenase, nodulação, área foliar, transporte de N na seiva do xilema, sombreamento, luz, temperatura.

EFFECTS OF SHADING ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN BEAN PLANTS

ABSTRACT - Two experiments were performed to investigate the effect of decreasing luminosity and temperature caused by shading on biological nitrogen fixation of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). When the shading was at 25% level, there was an increase, in relation to full light, of the dry weight, nitrogenase activity, total nitrogen in xylem sap, rate of N as ureides and total nitrogen in shoots. At this level of shading, an increase in nodular efficiency compensated for the decrease in nodule weight. The favourable effect of reducing 25% of the luminosity was caused by the decrease in maximal diurnal temperature in the shaded pots and the decrease of solar energy was compensated by and increase in leaf area. At 40% shading, there was a decrease in the rhizosphere temperature and an increase in leaf area but this was not enough to compensate for the lower photosynthetic activity. Generally the high temperature did not affect the infection process and the growth of the nodules, but altered nodule metabolism, decreasing nitrogenase activity and total nitrogen in shoots.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, N₂ fixation, nitrogenase activity, nodulation, leaf area, transport of N in the xylem sap, shading, light, temperature.

INTRODUÇÃO

Na América Latina, cerca de 80% do cultivo de feijão é realizado em associação com outras culturas, principalmente com o milho (Francis 1978). Dada a alta suscetibilidade da cultura do feijão aos fatores climáticos, o consórcio pode diminuir os riscos dessa cultura, reduzindo as oscilações na temperatura e teor de umidade do solo e propi-

ciando maiores produções (Costa et al. 1981).

O feijão é uma leguminosa que pode associar-se a bactérias que convertem o N₂ atmosférico em amônia, que é utilizada pela planta hospedeira. Entretanto, a seleção natural em solos mais férteis, a utilização de variedades de ciclo curto e os fatores climáticos têm subestimado o potencial de fixação de N₂ dessa cultura, mas os resultados experimentais têm mostrado que o feijão pode beneficiar-se da simbiose em quantidade suficiente para produzir até 1.500 kg/ha (Döbereiner & Duque 1980).

A fixação de N₂ é um processo termo-sensível no qual todos os estádios de formação, desenvolvimento e funcionamento dos nódulos podem ser afetados pela temperatura (Joffe et al. 1961, Lie 1974). Além disso, há o efeito da temperatura nos processos metabólicos da planta, tais como respiração, fotossíntese, transpiração e crescimen-

¹ Aceito para publicação em 29 de agosto de 1985. Apresentado na XVI Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo. Ilhéus, BA, 22 a 27 de julho de 1984.

² Enga. - Agra., Dra. EMBRAPA, Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS), km 47, CEP 23460 Seropédica, RJ.

³ Botânico, Ph.D. Hill Farming Research Organization, Pennicuik, Scotland.

⁴ Enga. - Agra., Ph.D. EMBRAPA-UAPNPBS.

to de raízes (Lie 1981). Sabe-se que a faixa de temperatura do solo adequada para a simbiose é mais estreita do que a das plantas que recebem N mineral e, no caso do feijão, deveria estar entre 25°C e 30°C. (Barrios et al. 1963, Graham 1979). As temperaturas elevadas podem prejudicar, em *Phaseolus vulgaris*, o início de nodulação, o crescimento dos nódulos (Small et al. 1968) e a atividade da nitrogenase (Pankhurst & Sprent 1976, Graham 1979). Nos solos tropicais, muitas vezes pode-se chegar a temperaturas de 40°C nos primeiros centímetros do solo, onde ocorre o maior crescimento das raízes e a temperatura torna-se um fator limitante para a simbiose, que pode ser atenuado pelo sombreamento da superfície do terreno em culturas associadas.

Por outro lado, o sombreamento do feijão reduz a disponibilidade da radiação para a fotossíntese e há consideráveis evidências de que é o suprimento de fotossintatos que freqüentemente limita a eficiência dos sistemas simbióticos (Hardy & Havelka 1973, Streeter 1974).

A redução parcial ou total da luminosidade pode causar diminuições de parâmetros tais como o N-total da planta, a atividade da nitrogenase, o teor de sacarose e o nível de ATP nos nódulos de soja (Lawn & Brun 1974, Ching et al. 1975), ervilha (Bethlenfalvay & Phillips 1977), trevo (Gibson 1976), caupi (Neves et al. 1982), e guandu (Setter et al. 1984).

Sampaio & Döbereiner (1968) verificaram que o sombreamento da soja diminuía o peso dos nódulos e o N total das plantas, embora aumentasse a eficiência nodular. Já Wahua & Miller (1978b) observaram que, submetendo-se a soja a vários níveis de sombreamento (0%, 20%, 47%, 63%, 80% e 93%), havia uma queda na produção de grãos e atividade da nitrogenase, mas só a partir do nível de 20% de sombreamento. Um aumento no número de nódulos em plantas de soja sombreadas foi observado por Rocha et al. (1970), mas houve uma queda no teor de nitrogênio fixado.

Em condições de campo, Wahua & Miller (1978a) constataram que um sombreamento de 50% da soja, causado pela cultura do sorgo, diminuía a atividade da nitrogenase, o peso e a atividade específica dos nódulos e o peso de matéria seca. Por outro lado, Orcutt & Fred (1935) observaram que

o sombreamento da soja em dias muito claros de verão promovia um aumento da fixação de N₂, pois acima de um determinado nível de luminosidade a simbiose seria prejudicada.

No caso do feijão, experimentos conduzidos no Centro Internacional de Agricultura Tropical (1976) mostraram que os níveis de fixação de N₂ foram maiores nas culturas associadas com milho do que em monocultura, o que se atribui às menores oscilações de temperaturas e umidade do solo.

No presente trabalho, teve-se por objetivo verificar o efeito da redução da luminosidade e da temperatura, causados pelo sombreamento, na fixação do N₂ em feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos na EMBRAPA-UAPNBS, km 47, Rio de Janeiro, nos períodos de março a maio e setembro a novembro de 1983.

Utilizou-se feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Negro Argel (CNPAF-EMBRAPA) submetido à inoculação com *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* C-05 (CENA, Piracicaba). As bactérias cresceram em meio definido de Vincent (1970) a 29°C, por quatro dias, com agitação. As sementes foram esterilizadas com HgCl₂ 0,2% (Vincent 1970), colocando-se, então, 1 ml de inoculante (com cerca de 10⁸ células/ml) para cada 15 sementes, durante uma hora.

Foram usados vasos de plástico com capacidade de 3,5 litros, preenchidos com areia e vermiculita (1:2, v/v) lavadas por sete dias em água corrente, secadas ao ar e esterilizadas a seco a 120°C, por 36 horas.

Os vasos foram colocados em três mesas expostas ao ar livre, medindo, cada uma, 4 m de comprimento por 2 m de largura e dispostas no sentido leste-oeste. O sombreamento dos vasos foi obtido através da cobertura das mesas com tela de plástico, branca (a 1, 5 m de altura).

Em uma das mesas colocaram-se 24 vasos que ficaram expostos à luminosidade total; outro grupo de vasos foi colocado em uma mesa coberta com uma camada única de tela; e o terceiro grupo ficou em outra mesa com uma camada dupla de tela. Diariamente leu-se a irradiância com radiômetro Li-cor (inc. Lincoln); constatou-se que os tratamentos correspondiam, em média, a 100%, 74,15% e 61,70% da luminosidade total, que serão referidos como níveis de 100%, 75% e 60%. Durante a condução dos experimentos houve pouca variação da irradiação avaliada na mesma hora do dia (às 10:00). Ocorreram apenas três dias nublados no primeiro experimento e quatro dias no segundo experimento. Nos demais dias, a irradiação variou de 50 x 10³ a 55 x 10³ W.m⁻².s⁻¹.

Para se obter diferentes temperaturas em um mesmo nível de sombreamento, cobriram-se externamente 50%

dos vasos de cada nível de luminosidade, com uma camada dupla de folhas de alumínio, o que refletia a radiação, abaixando a temperatura de 0,2°C a 6,4°C na zona radicular (média de seis potes). Diariamente às 13,30 mediu-se a temperatura de seis potes de cada tratamento, sorteados ao acaso, colocando-se os termômetros a 5 cm de profundidade, de modo a se obter a máxima temperatura diurna na zona radicular.

Por ocasião da sementeira, foram colocadas cinco sementes por vaso, cobertas, depois, com uma camada de areia esterilizada de, aproximadamente, 3 cm. Aos sete dias após a germinação (DAG), procedeu-se ao desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

A cada quatro dias forneceu-se às plantas solução nutritiva isenta de nitrogênio e contendo: NaH_2PO_4 (0,75 mM), KH_2PO_4 (0,75 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,1 mM), $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,9 mM), K_2SO_4 (1,5 mM), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 μM), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 μM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 μM), H_3BO_3 (5 μM), NaCl (10 μM), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5 μM), $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 μM) e FeEDTA (5 μM), pH 6 a 6,2.

As adições de água foram feitas uma a duas vezes por dia, com base no peso dos vasos. O delineamento experimental usado foi o de parcelas subdivididas, onde as parcelas representaram os níveis de luminosidade e as subparcelas foram as diferentes temperaturas.

As coletas foram realizadas nas seguintes épocas: Primeiro experimento - 13, 16, 22, 28 e 34 dias após a germinação. Segundo experimento - 15, 25 e 35 dias após a germinação.

Para a determinação do peso de matéria seca, separou-se a parte aérea da raiz na altura do nó cotiledonar. A parte aérea foi levada para secagem em estufa a 60°C - 70°C, até atingir peso constante. Determinou-se a atividade da nitrogenase nas raízes noduladas e, posteriormente, foram separados os nódulos das raízes, levando-se ambos para secagem.

Determinou-se, em um medidor de área foliar eletrônico (Li-cor, inc. Lincoln, model. 3100), a área foliar (AF)/folha e AF/planta. Calcularam-se, posteriormente, os seguintes parâmetros usados na análise de crescimento: Razão de área foliar (RAF), taxa de crescimento relativo (TCR) e taxa de assimilação líquida (TAL) (Evans 1972).

Para a avaliação da atividade da nitrogenase, utilizou-se o método de redução do acetileno com raízes noduladas destacadas (Mague & Burris 1972). As raízes foram colocadas em frascos de vidro de 250 ml, que foram fechados hermeticamente com rolhas do tipo "suba seal", injetando-se, então, 15% de acetileno. A leitura do etileno produzido foi feita aos 30 minutos após o início da incubação no primeiro experimento, e aos quatro e 30 minutos no segundo experimento. Recentemente, Minchin et al. (1983) verificaram que a atividade da nitrogenase declinava rapidamente, em certos sistemas simbióticos, após a injeção do acetileno. Essa queda não seria constante: podia variar com a espécie de planta, com a estirpe de bactéria e com as condições ambientais. Desse modo, utilizou-se um sistema de fluxo contínuo em tubos de vidro

de 100 ml, que foram fechados com rolhas de borracha. Manteve-se um fluxo de 100 ml.min⁻¹, com 12% de acetileno. As leituras foram realizadas a um, três, quatro, cinco, sete, quinze e trinta minutos após o início da incubação. Verificou-se que a queda da nitrogenase foi somente de 4,2% para o sistema Negro Argel x C-05 e que, portanto, os resultados anteriores são válidos.

O etileno produzido foi determinado em um cromatógrafo Perkin Elmer F11, com detector por ionização de chama usando-se uma coluna de aço inoxidável com 0,32 cm diâmetro interno) x 50 cm de comprimento, contendo Poropak N (80 - 100 mesh) e operada a 40°C, utilizando o N₂ como gás carregador a um fluxo de 40 ml.min⁻¹.

Aos 35 DAG do segundo experimento, três dias após a última adição de solução nutritiva, realizou-se a coleta da seiva do xilema e, na noite anterior à coleta, forneceu-se abundantemente água às plantas. A coleta foi realizada às 8:30 h e, após o corte da parte aérea na altura do nó cotiledonar com uma gilete, procedeu-se à lavagem do corte com água destilada e à secagem com lenço de papel. A seiva exsudada foi, então, coletada, em durante quinze minutos, em tubos microcapilares calibrados (20 μl e 50 μl), e calculou-se a taxa de exsudação. A seiva foi mantida a -20°C até o momento das análises, e os compostos nitrogenados foram determinados usando-se 5 μl de seiva em cada um dos procedimentos colorimétricos.

O N-urefido foi determinado pelo método colorimétrico de Vogels & Driif (1970), baseado na hidrólise seletiva da alantoína e ácido alantóico a glioxalato.

O N α -amino foi determinado pelo método de Matheson et al. (1961) e a ninidrina-hidridantina foi preparada de acordo com a descrição feita por esses autores. A hidridantina foi preparada segundo Connel et al. (1955).

Para a determinação do N-amônia, utilizou-se o método de Mitchell (1972); mas a solução de hipoclorito de sódio foi substituída por dicloroisocianurato de sódio com hidróxido de sódio (Felker 1977).

Na determinação do N-amida, a hidrólise ácida do N-amida para N-NH₄⁺ foi feita segundo Thomas et al. (1979), e a amônia foi determinada segundo descrição acima.

O N-total da seiva foi determinado pelo método micro-Kjeldahl segundo Bohley (1967), e a amônia foi determinada de acordo com a descrição acima, enquanto o N total da parte aérea foi determinado pelo método Kjeldahl segundo Liao (1981), e a destilação e titulação foram realizadas segundo Bremner & Edwards (1965).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, vêem-se os dados do primeiro experimento referentes ao efeito da luminosidade no peso de matéria seca da parte aérea, raízes e nódulos, no número de nódulos, na atividade da nitrogenase e no nitrogênio acumulado na parte aérea. Até os 16 dias após a germinação (DAG), os

TABELA 1. Efeito de dois níveis de sombreamento na simbiose de feijão. Médias de 8 repetições.

Tratamentos	Matéria seca (g.pl ⁻¹)			Número de nódulos pl ⁻¹	Redução do C ₂ H ₄		N-total da parte aérea (mg.pl ⁻¹)
	Parte aérea	Raiz	Nódulos		*	**	
13 dias após a germinação							
Luminosidade total	0,31a***	0,10a	0,028	50,7	4,34b	160,7b	4,75b
Sombreamento 25%	0,32a	0,09ab	0,033	54,8	9,01a	270,7a	5,88a
Sombreamento 40%	0,25b	0,07b	0,028	43,0	6,05ab	213,5ab	3,90c
16 dias após a germinação							
Luminosidade total	0,37a	0,13a	0,039ab	56,8	4,64ab	116,4	
Sombreamento 25%	0,33ab	0,10ab	0,046a	59,2	5,76a	126,5	
Sombreamento 40%	0,30b	0,09b	0,034b	49,0	3,69b	105,1	
22 dias após a germinação							
Luminosidade total	0,41	0,14	0,053	89,5a	3,14b	59,8b	
Sombreamento 25%	0,45	0,10	0,045	52,1ab	3,96ab	89,8a	
Sombreamento 40%	0,45	0,14	0,048	47,3b	4,11a	85,7a	
28 dias após a germinação							
Luminosidade total	0,58b	0,17	0,086a	100,5	5,51b	63,9b	14,28
Sombreamento 25%	0,70ab	0,19	0,071b	86,6	7,39a	104,9a	16,79
Sombreamento 40%	0,76a	0,19	0,070b	86,7	7,04a	103,4a	15,66
34 dias após a germinação							
Luminosidade total	0,68b	0,18	0,101	100,8ab	5,80	62,4b	18,74b
Sombreamento 25%	0,87a	0,22	0,105	120,3a	6,46	63,8ab	25,82a
Sombreamento 40%	0,92a	0,22	0,065	85,8b	5,85	92,1a	22,06ab

* $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ** $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

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

maiores pesos secos foram obtidos nos tratamentos com luminosidade total e sombreamento de 25%; mas, a partir dos 28 DAG e 34 DAG, todas as plantas sombreadas acumularam mais matéria seca do que aquelas expostas a plena luz. No segundo experimento (Tabela 2), observou-se que no florescimento (35 DAG) o maior peso da parte aérea ocorreu nas plantas sombreadas em 25% e que a redução de 40% da luminosidade prejudicou o crescimento das plantas.

Deve-se considerar, na análise desses dados, que o feijão é uma leguminosa de via fotossintética C₃ e que, portanto, a fotossíntese não responde linearmente à intensidade luminosa (Devlin 1975, Larcher 1980). Além disso, foi observado que em folhas sombreadas há um aumento na taxa fotossintética (Thorne & Koller 1974, Koller & Thorne 1978).

Desse modo, pode-se dizer que a redução de até 25% da luminosidade não provocou a diminuição do peso de matéria seca da parte aérea, o que já ocorreu no nível de 40% de sombreamento, quando a luz passou a ser um fator que limitou o acúmulo de matéria seca. Com exceção das coletas aos 13 e 16 DAG do primeiro experimento, não houve efeito da luminosidade no peso das raízes.

O peso de nódulos tendeu a ser menor nos tratamentos sombreados, mas houve um aumento na atividade da nitrogenase, especialmente na atividade específica ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nódulo}^{-1}$), o que também foi observado anteriormente em soja (Sampaio & Döbereiner 1968).

O teor de N total da parte aérea no florescimento (34 DAG no primeiro experimento e 35 DAG no segundo experimento) mostrou que a maior fixação de N₂ ocorreu nas plantas submetidas a

TABELA 2. Efeito de dois níveis de sombreamento na simbiose e ajustamento do aparelho fotossintético em feijão. Médias de 8 repetições.

Tratamentos	Peso de matéria seca (g.pl ⁻¹)			Número de de nódulos pl ⁻¹	Área foliar (dm ² .pl ⁻¹)	Número de folhas pl ⁻¹	Altura do caule (cm)	Redução do C ₂ H ₄ **		N-total da parte aérea (mg.pl ⁻¹)
	Parte aérea	Raiz	Nódulos					*	**	
15 dias após a germinação										
Luminosidade total	0,44	0,12	0,076a***	82,5a	1,17b	8,1	17,0b	1,20	16,1b	9,56b
Sombreamento 25%	0,43	0,13	0,067ab	67,0a	1,57a	8,2	27,5a	1,37	20,6b	11,46a
Sombreamento 40%	0,49	0,12	0,048b	49,4b	1,78a	8,2	29,4a	1,47	30,9a	13,00a
25 dias após a germinação										
Luminosidade total	0,67	0,30	0,119	116,5	2,02b	14,4	17,8b	7,93b	66,69c	19,8b
Sombreamento 25%	0,74	0,29	0,115	112,1	2,38b	12,4	28,0a	9,06b	78,45b	24,5a
Sombreamento 40%	0,74	0,28	0,122	116,6	2,76a	13,8	32,0a	17,44a	146,40a	23,3ab
35 dias após a germinação										
Luminosidade total	1,30ab	0,37	0,283a	162,2	2,63b	22,7	19,8b	10,50	37,25c	38,18b
Sombreamento 25%	1,44a	0,40	0,244ab	129,2	3,43a	21,8	31,8a	10,87	48,98b	50,32a
Sombreamento 40%	1,15b	0,33	0,160b	122,8	3,31a	20,1	33,7a	11,48	71,10a	35,01b

* $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ** $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

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

um sombreamento de 25%. Orcutt & Fred (1935) atribuíram o efeito favorável do sombreamento na fixação de N₂ em soja ao fato de que, tanto quanto uma relação C/N baixa, uma relação C/N muito elevada também prejudicaria a simbiose. Wahua & Miller (1978b) salientaram que, nos trabalhos normalmente conduzidos onde a fixação do N₂ foi prejudicada pela diminuição da luz, as plantas tinham sido submetidas a níveis de sombreamento severos, de pelo menos 50%. Desse modo, quando esses autores submeteram plantas de soja a diversos níveis de sombreamento, eles verificaram que a atividade máxima da nitrogenase e o maior peso de nódulos, parte aérea e vagens ocorriam em 80% da intensidade luminosidade total.

Na Tabela 2 pode-se ver, ainda, os dados relativos à área foliar, número de folhas e altura do caule. Como já foi verificado por Rocha et al. (1970) e Dennis & Woledge (1983), o sombreamento aumentou a área foliar, o que é interpretado como uma adaptação da planta à sombra, que coloca uma maior área foliar à menor quantidade de luz (Cooper & Qualls 1967). A altura do caule também aumentou na sombra, o que foi verificado por Dennis & Woledge (1983) em trevo branco e em feijão por Crookston et al. (1975), mas, ao contrário destes últimos autores, o número de folhas permaneceu o mesmo.

Os valores da razão de área foliar (RAF) - ou

seja, relação entre a superfície fotossintética e o peso seco da planta (dm².g⁻¹), da taxa de crescimento relativo (TCR), ou aumento do peso por unidade de peso (mg.mg⁻¹.semana⁻¹) e da taxa de assimilação líquida (TAL), ou aumento de peso por unidade de área foliar (mg.dm⁻².semana⁻¹), - podem ser vistos na Fig. 1. O comportamento do feijão submetido à inoculação, em relação a esses parâmetros, foi semelhante ao encontrado por Rocha et al. (1970) em soja submetida a inoculação e ao sombreamento. A TCR e a TAL não diferiram, nos níveis de 75% e 100%, da luminosidade total, embora houvesse um grande aumento na RAF. Isso nos indica que as plantas expandiram as suas folhas a fim de procurar compensar a menor radiação e conseguiram atingir um nível de fotossíntese suficiente para equiparar o incremento de peso. Já no nível de 40% de sombreamento, apesar de representar a máxima expansão das folhas por unidade de peso, isso não conseguiu suprir a deficiência luminosa, e causou um decréscimo na produção de matéria seca.

Quanto ao efeito da temperatura na fixação simbiótica do N₂, pode-se constatar, pelas Tabelas 3 (primeiro experimento) e 4 (segundo experimento), que a cobertura dos vasos com folhas de alumínio, reduzindo as temperaturas máximas diurnas na zona radicular, aumentou a atividade da nitrogenase e o N total das plantas.

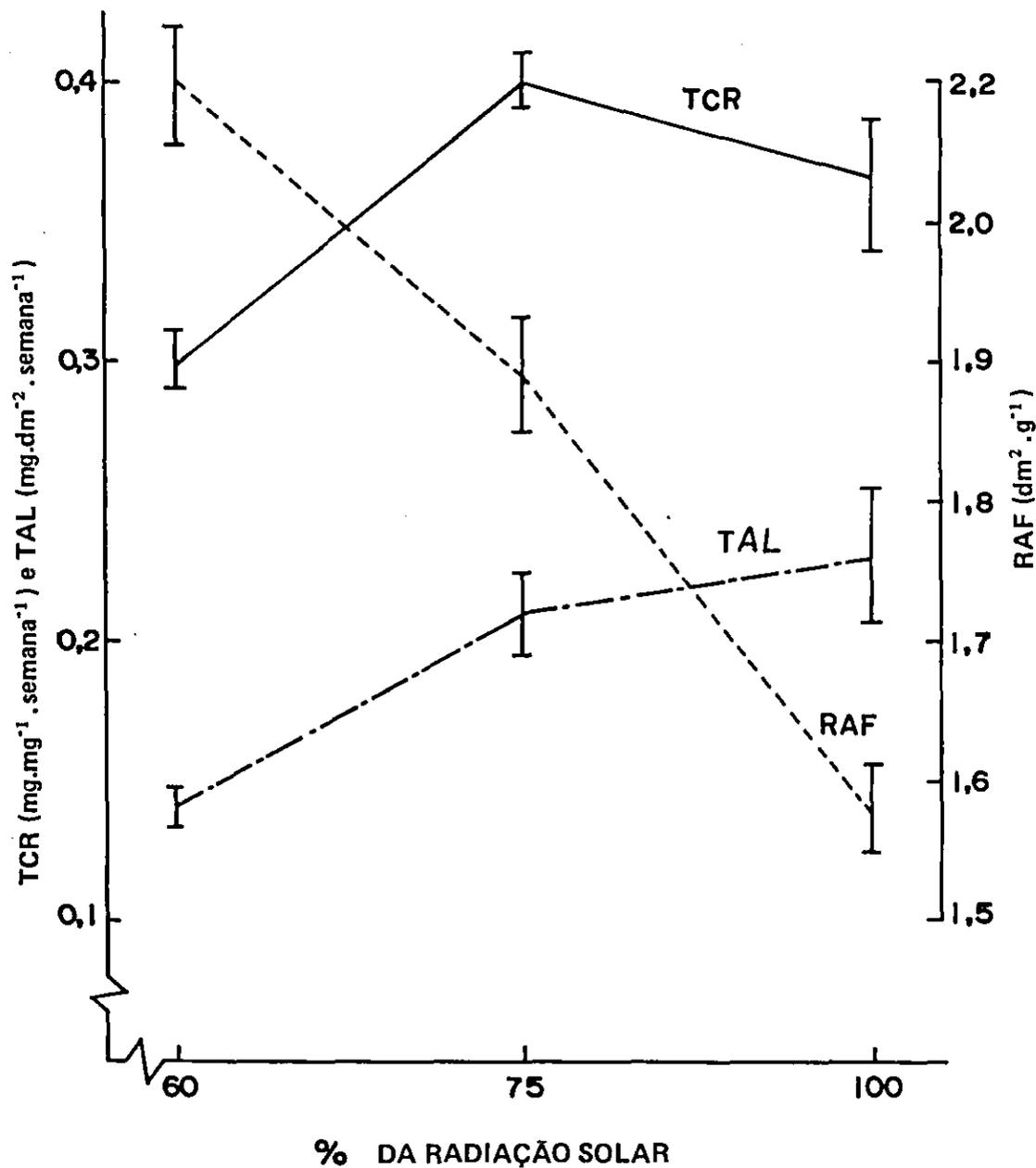


FIG. 1. Efeito da intensidade luminosa na taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de assimilação líquida (TAL) e razão de área foliar (RAF) de feijão, no período de 15 a 35 dias após a germinação. Médias de 8 repetições. As barras verticais representam o desvio padrão da média.

TABELA 3. Efeito da temperatura na simbiose de feijão. Médias de 12 repetições.

Tratamentos (vasos)	Peso de matéria seca (g.pl ⁻¹)			Número de nódulos pl ⁻¹	Redução do C ₂ H ₄		N-total da parte aérea (mg.pl ⁻¹)
	Parte aérea	Raiz	Nódulos		*	**	
16 dias após a germinação							
Não cobertos***	0,34	0,11	0,036b****	53,7	3,67b	97,2b	
Cobertos	0,33	0,10	0,043a	56,3	5,72a	134,1a	
22 dias após a germinação							
Não cobertos	0,41b	0,13	0,048	62,2	3,41b	73,2b	
Cobertos	0,47a	0,13	0,049	63,7	4,06a	83,6a	
28 dias após a germinação							
Não cobertos	0,66	0,19	0,079	91,4	6,36b	83,3b	13,58b
Cobertos	0,69	0,18	0,073	91,1	6,93a	98,1a	17,57a
34 dias após a germinação							
Não cobertos	0,75b	0,21	0,122	95,3	5,21b	56,3b	19,52b
Cobertos	0,90a	0,20	0,081	109,3	6,86a	89,3a	24,89a

* $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ** $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

*** Vasos cobertos, ou não, externamente, com folhas de alumínio, reduzindo a temperatura na zona radicular.

**** Valores diferentes estatisticamente, pelo teste de Tukey, ao nível de 1%.

TABELA 4. Efeito da temperatura na simbiose de feijão. Médias de 12 repetições.

Tratamentos (vasos)	Matéria seca (g.pl ⁻¹)			Número de nódulos pl ⁻¹	Redução do C ₂ H ₄		N-total da parte aérea (mg.pl ⁻¹)
	Parte aérea	Raiz	Nódulos		*	**	
15 dias após a germinação							
Não cobertos***	0,43b****	0,11	0,065	63,6	1,27	21,3	9,96b
Cobertos	0,48a	0,14	0,063	69,0	1,42	23,8	11,59a
35 dias após a germinação							
Não cobertos	1,78	0,35	0,22	138,1	9,32b	47,2b	37,45b
Cobertos	1,33	0,38	0,24	137,0	12,57a	56,4a	44,89a

* $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ** $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

*** Vasos cobertos, ou não, externamente, com folhas de alumínio, reduzindo a temperatura na zona radicular.

**** Valores diferentes estatisticamente, pelo teste de Tukey, ao nível de 1%.

A média das temperaturas máximas diurnas dos vasos não cobertos durante todo o ciclo do feijoeiro nos dois experimentos foi de 33,28°C, enquanto nos vasos cobertos com folhas de alumínio foi de 31,17°C. Mas a temperatura máxima nos vasos não cobertos foi de 40°C, enquanto a cobertura causou uma redução para 36°C. A maior diferen-

ça de temperatura verificada para um mesmo tratamento chegou a ser de 6,4°C. (média de seis vasos).

Na Fig. 2, pode-se observar a variação da temperatura nos vasos cobertos e não cobertos expostos à luminosidade total. Segundo Barrios et al. (1963) e Graham (1979), a temperatura máxima em que ocorreria a fixação do N₂ em feijoeiro seria de

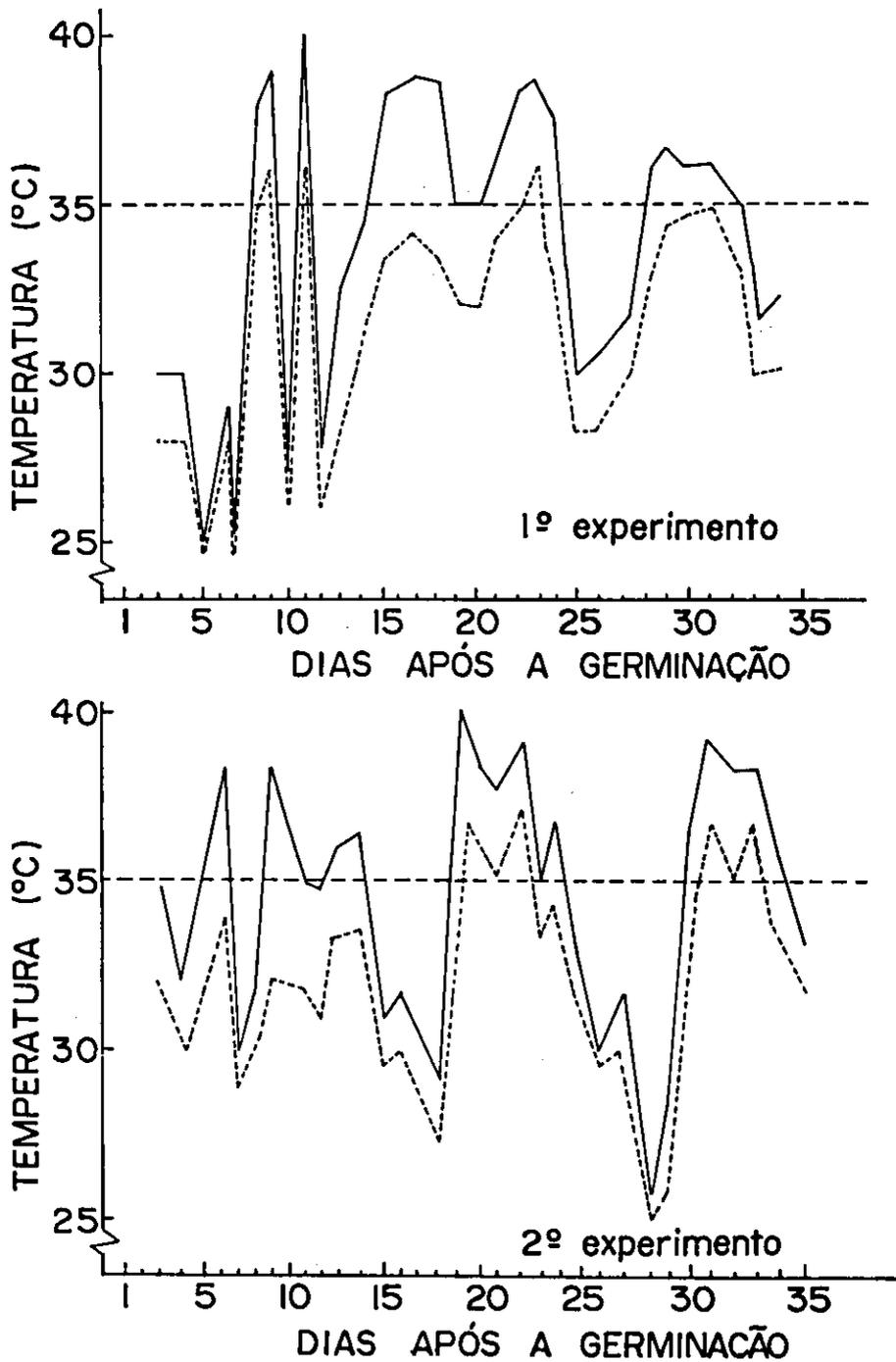


FIG. 2. Temperatura na zona radicular dos vasos não cobertos (—) e cobertos (---) externamente com folhas de alumínio, durante o crescimento de feijão exposto à luminosidade total.

30°C e, portanto, fica fácil verificar que esse foi um fator limitante. Considerando-se que a temperatura máxima diurna ocorre por um período curto de tempo e, portanto, considerando-se um limite de 35°C, verifica-se que, nos vasos não cobertos do tratamento de luminosidade total, a temperatura ultrapassou os 35°C por 14 dias (primeiro experimento) e 15 dias (segundo experimento). O revestimento externo com folhas de alumínio reduziu esses números para três dias (primeiro experimento) e 4 dias (segundo experimento), o que refletiu em maior fixação do N₂. Comportamento semelhante ocorreu nos tratamentos sombreados aos níveis de 25% e 40%.

Small et al. (1968) verificaram que as temperaturas elevadas prejudicaram o início da nodulação e crescimento dos nódulos de feijão. Neste experimento, porém, o efeito parece ter sido só no funcionamento dos nódulos, uma vez que, praticamente, não houve diferença no peso seco e número de nódulos.

As temperaturas elevadas no sistema radicular também diminuíram o peso de matéria seca das plantas, o que, provavelmente, ocorreu porque em *Phaseolus vulgaris* a fotossíntese é prejudicada, principalmente em decorrência de mudanças na taxa de respiração e na resistência dos estômatos (Peet et al. 1977).

Fazendo-se uma correlação entre o N total da parte aérea e a temperatura dos vasos submetidos a plena luz e a sombreamento de 25%, encontra-se um valor altamente significativo, tanto no primeiro ($r = -0,899^{**}$) como no segundo experimento ($r = -0,863^{**}$), como pode ser visto na Fig. 3. Mas, se forem incluídos nesta correlação os vasos submetidos a 40% de sombreamento, as correlações caem para $r = -0,561$ (primeiro experimento) e $r = -0,342$ (segundo experimento).

Essas correlações parecem indicar que, até 25% de redução do nível de luminosidade, o fator limitante foi a temperatura. Conseqüentemente, o abaixamento da temperatura dos vasos, causado pelo sombreamento, aumentou a fixação do N₂. Já no nível de 40% de sombreamento, a luz também passou a ser um fator que limita a fixação do N₂.

Também se verificou um efeito da interação entre luminosidade e temperatura no teor de nitrogê-

nio fixado, como pode ser visto na Fig. 4 (primeiro experimento). No florescimento (34 DAG), o maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea ocorreu no tratamento onde os vasos foram cobertos com folhas de alumínio e submetidos a um sombreamento de 25%, que superou o tratamento com vasos não cobertos e expostos à luminosidade total em 81%. O mesmo aconteceu no segundo experimento, onde superou em 65% (dados não mostrados).

Os resultados relativos à composição da seiva do xilema podem ser vistos na Fig. 5. A maior parte do nitrogênio foi transportada sob a forma de ureídeos, conforme já foi observado, em *Phaseolus vulgaris* nodulado, por Pate (1973) e Cookson et al. (1980). No caso deste experimento, uma média de 80% do N total se encontrava sob a forma de alantoína e ácido alantóico.

Visto que os ureídeos representaram a maior fração do nitrogênio transportado na seiva do xilema, obteve-se alta correlação entre o N total acumulado na parte aérea e a taxa de translocação de N-ureído na seiva do xilema ($r = 0,982^{**}$). Isso também foi verificado, em feijão, por Hungria & Neves (1984), que obtiveram uma correlação de $0,907^{**}$ no florescimento.

Há observações de que o teor de ureído pode variar com as condições ambientais, e Thomas & Sprent (1984) verificaram uma variação com a temperatura. Neste experimento, porém não se verificaram alterações na percentagem N-ureído com as diferentes temperaturas, mas houve um efeito significativo, ao nível de 1%, atribuído à luz. As plantas submetidas à luminosidade total, sombreamento de 25% e sombreamento de 40% transportaram, respectivamente, 78,76%; 84,82% e 81,33% de N sob a forma de ureídeos. Não houve efeito da luz nas percentagens de N-α-amino e percentagem de N-amônia, mas o aumento da percentagem de N-ureído implicou uma queda na percentagem de N-amida.

A maior percentagem de N sob a forma de ureídeos poderia ser uma vantagem para o sistema simbiótico, visto que na síntese e transporte desses compostos há economia de carbono e ATP.

No tratamento com 25% de sombreamento, encontrou-se o maior teor de ureídeos e o menor teor de amida. Como esse foi o tratamento que apresentou maior fixação do N₂, pode-se concluir que o

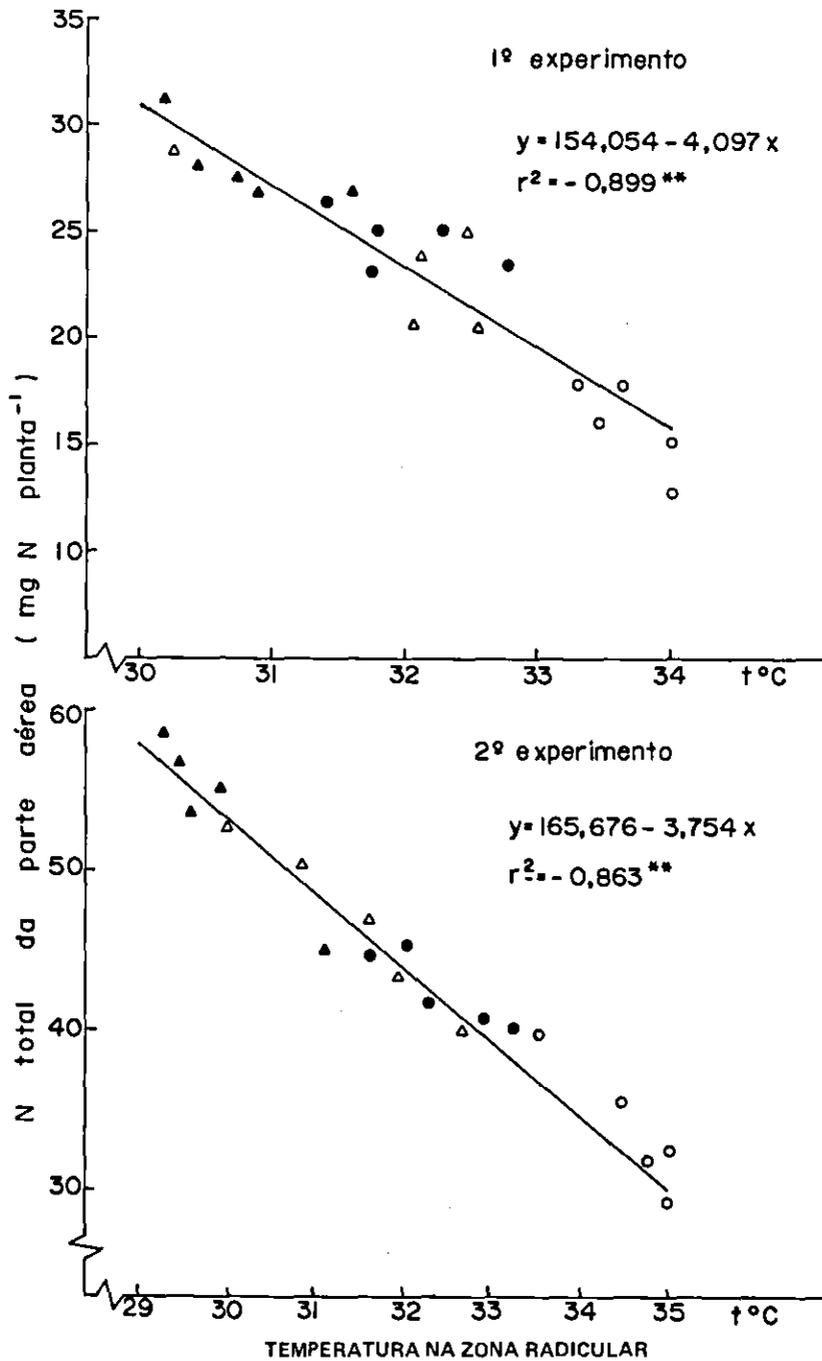


FIG. 3. Correlações entre o N total da parte aérea (aos 34 e 35 dias após a germinação) e a temperatura na zona radicular (médias das temperaturas máximas diurnas durante o ciclo vegetativo de feijão); O luminosidade total; Δ sombreamento de 25%; \bullet \blacktriangle potes cobertos com folhas de alumínio.

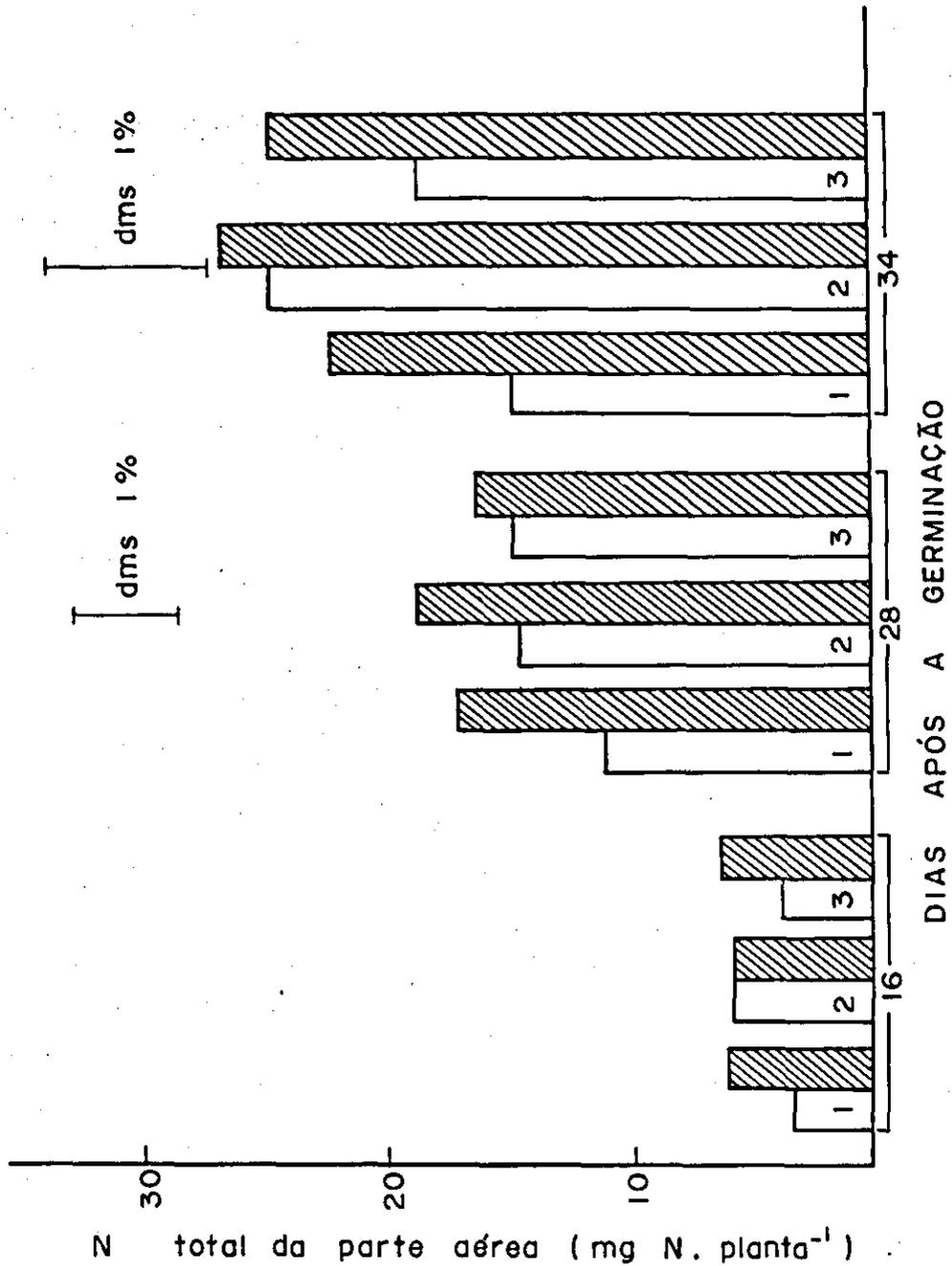


FIG. 4. Efeito da interação entre o sombreamento e a temperatura na simbiose do feijão. Os tratamentos são representados por: 1. luminosidade total; 2. sombreamento de 25%; 3. sombreamento de 40% □ Vasos não cobertos e vasos cobertos externamente com folhas de alumínio (reduzindo, a temperatura máxima diurna na zona radicular). Médias de 4 repetições.

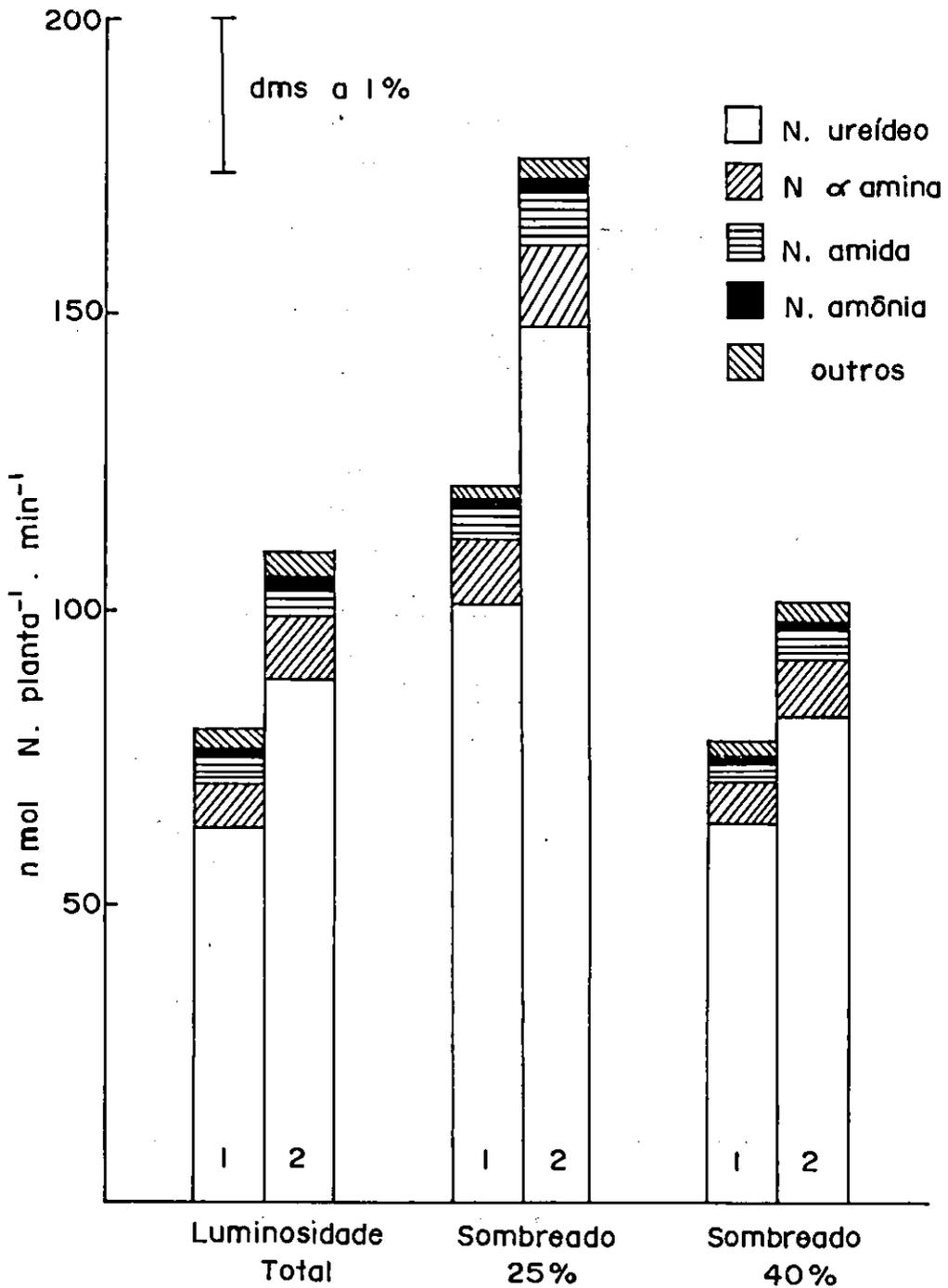


FIG. 5. Efeito de dois níveis de sombreamento e da temperatura dos vasos na composição da seiva do xilema de feijão dos 35 dias após a germinação. As colunas 1 e 2 representam, respectivamente, os vasos não cobertos e cobertos com folhas de alumínio (diminuindo a temperatura máxima diurna na zona radicular). Médias de 4 repetições.

melhor desempenho simbiótico esteve associado com a maior percentagem de N sob a forma de ureídeos. Esse tratamento também foi o que apresentou maior taxa de transporte de N total na seiva do xilema, superando os tratamentos de luminosidade total e sombreamento de 40% respectivamente em 57% e 66%.

CONCLUSÕES

1. O sombreamento correspondente à redução de 25% da luminosidade total aumentou o peso de matéria seca, a atividade da nitrogenase, o N total transportado na seiva do xilema, a percentagem de N transportado sob a forma de ureídeos e o N total acumulado na parte aérea. Nesse nível de sombreamento, o aumento na eficiência nodular compensou a redução no peso dos nódulos.

2. O efeito favorável do sombreamento de 25% foi atribuído à redução das temperaturas máximas diurnas nos vasos sombreados, e a redução da energia solar foi compensada por um aumento na área foliar fotossinteticamente ativa.

3. No nível de sombreamento de 40%, embora ocorresse redução da temperatura na zona radicular e aumento na área foliar, isso não foi suficiente para compensar a menor atividade fotossintética.

4. De modo geral, as temperaturas elevadas não prejudicaram a formação e crescimento dos nódulos, mas sim a sua capacidade metabólica, refletida na menor atividade da nitrogenase e no menor acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

AGRADECIMENTOS

À FINEP, pelo auxílio financeiro às pesquisas, e ao Conselho Britânico, pelo projeto de cooperação Brasil-Inglaterra.

REFERÊNCIAS

- BARRIOS, S.; RAGGIO, N. & RAGGIO, M. Effect of temperature on infection of isolated bean roots by rhizobia. *Plant Physiol.*, 38: 171-4, 1963.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Effect of light intensity on the efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.*, 60: 871-8, 1977.
- BOHLEY, P. von. Reihenbestimmungen von Stickstoff in Ultramikromassstab; Kjeldahverraschung und Phenolhypo-chlorite Reaktion. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 348: 100-10, 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.*, 29: 504-7, 1965.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Cali, Colômbia. *Annual report*. Cali, 1976. p.30-1.
- CHING, T.M.; HEDTKEI, S.; RUSSELL, S.A. & EVANS, H.J. Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-grown plants. *Plant Physiol.*, 55: 796-8, 1975.
- CONNEL, G.E.; DIXON, G.H. & HANES, C.S. Quantitative chromatographic methods for the study of enzymic transpeptidation reactions. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33: 416-27, 1955.
- COOKSON, C.; HUGHES, H. & COOMBS, J. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 148: 338-45, 1980.
- COOPER, C.S. & QUALLS, M. Morphology and chlorophyll content of shade and sun leaves of two legumes. *Crop Sci.*, 7: 672-3, 1967.
- COSTA, J.G.C.; OLIVEIRA, I.P.; ZIMMERMANN, M.J. O. & ZIMMERMANN, F.J.P. Sistemas de produção de feijão; efeitos de níveis de fertilidade e cultivares. *Poliagro*, 3(1): 9-16, 1981.
- CROOKSTON, R.K.K.; THEHARNE, K.J.; LUDFORD, P.K. & OZBUN, J.L. Response of beans to shading. *Crop Sci.*, 15: 412-6, 1975.
- DENNIS, W.D. & WOLEDGE, J. The effect of shade during leaf expansion on photosynthesis by white clover. *Ann. Bot.*, 51: 111-8, 1983.
- DEVLIN, R.M. *Plant physiology*. 3.ed. New York, D. van Nostr., 1975. 600p.
- DÖBEREINER, J. & DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. *R. Econ. rural*, 18(3): 447-60, 1980.
- EVANS, G.C. *The quantitative analysis of plant growth*. Oxford, Blackwell, 1972. 734p. (Studies in ecology, 1).
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichlorocyanurate color reaction. *Anal. Chem.*, 49: 1080, 1977.
- FRANCIS, C.A. Multiple cropping potentials of beans and maize. *Hortic. Sci.*, 13: 12-7, 1978.
- GIBSON, A.H. Recovery and compensation by nodulated legumes to environmental stress. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1976. p.385-409.
- GRAHAM, P.H. Influence of temperature on growth and nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris*

- L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci.*, 93: 365-70, 1979.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. Symbiotic N₂ fixation; multifold enhancement by CO₂ enrichment of field grown soybeans. *Plant Physiol.*, 48: 35-8, 1973. Suplemento.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Seasonal variations on nodule metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E., eds. *Advances in nitrogen fixation research*. The Hague, M. Nijhoff, 1984. p.505.
- JOFFE, A.; WEYER, F. & SAUBERT, S. The role of root temperature in symbiotic nitrogen fixation. *S. Afr. J. Sci.*, 57: 278-82, 1961.
- KOLLER, H.R. & THORNE, J.H. Soybean pod removal alters leaf diffusion resistance and leaflet orientation. *Crop Sci.*, 18: 305-7, 1978.
- LARCHER, W. *Physiological plant ecology*. 2. ed. Berlin, Springer, 1980. 303p.
- LAWN, R.J. & BRUN, W.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. *Crop Sci.*, 14: 11-6, 1974.
- LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 852-5, 1981.
- LIE, T.A. Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: QUISPÉL, A., ed. *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, North Holland, 1974. p.555-82.
- LIE, T.A. Environmental physiology of the legume - *Rhizobium* symbiosis. In: BROUGHTON, W.J., ed. *Nitrogen fixation*. Oxford, Oxford Univ. Press, 1981. p.104-34.
- MAGUE, T.H. & BURRIS, R.H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. *New Phytol.*, 71: 275-86, 1972.
- MATHESON, A.T.; TIGANE, E. & HANES, C.S. Quantitative chromatographic methods; an improved ninhydrin-hydrindantin reagent. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39: 417-25, 1961.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J.E. & MULLER, M. A major error in the acetylene reduction assay; decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.*, 34: 641-9, 1983.
- MITCHELL, H.T. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 55: 1-3, 1972.
- 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. *Trop. Agric.*, 59: 248-53, 1982.
- ORCUTT, F.S. & FRED, E.B. Light intensity as an inhibiting factor in the fixation of atmosphere nitrogen by Manches soybeans. *J. Am. Soc. Agron.*, 27: 550-8, 1935.
- PANKHURST, C.E. & SPRENT, J.I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybean and french bean root nodules. *J. Exp. Bot.*, 27: 1-9, 1976.
- PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5: 109-19, 1973.
- PEET, M.M.; OZBUN, J.L. & WALLACE, D.H. Physiological and anatomical effects of growth temperature on *Phaseolus vulgaris* L. cultivars. *J. Exp. Bot.*, 28: 57-69, 1977.
- ROCHA, H.M.; ALVIM, P.T. & DÖBEREINER, J. Influência da intensidade de radiação solar sobre o crescimento e a fixação simbiótica do nitrogênio pela soja. *Turrialba*, 20: 293-8, 1970.
- SAMPAIO, I.B.M. & DÖBEREINER, J. Efeito do sombreamento e do calcário na taxa relativa de fixação de nitrogênio e na eficiência dos nódulos da soja. (*Glycine max*). *Pesq. agropec. bras. Sér. Agron.*, Rio de Janeiro, 3: 255-62, 1968.
- SETTER, T.L.; MCDAVID, C.R. & LOPEZ, F.B. Photosynthate partitioning in pigeon pea in response to defoliation and shading. *Crop Sci.*, 24: 221-4, 1984.
- SMALL, J.G.C.; HOUGH, M.C.; CLARKE, B. & GROB-BELAAR, N. The effect of temperature on nodulation of whole plants and isolated roots of *Phaseolus vulgaris* L. *S. Afr. J. Sci.*, 64: 218-24, 1968.
- STREETER, J.G. Growth of two soybean shoots on a single root. *J. Exp. Bot.*, 25: 189-98, 1974.
- THOMAS, R.J.; FELLER, U. & ERISMANN, K.H. The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris* L. *New Phytol.*, 82: 657-69, 1979.
- THOMAS, R.J. & SPRENT, J.I. The effects of temperature on vegetative and early reproductive growth of a cold-tolerant and a cold-sensitive line of *Phaseolus vulgaris* L.; 2. Nodular uricase, allantoinase, xylem transport of N and assimilation in shoot tissues. *Ann. Bot.*, 53: 589-98, 1984.
- THORNE, J.H. & KOLLER, H.R. Influence of assimilate demand on photosynthesis, diffusive resistances, translocation and carbohydrate levels of soybean leaves. *Plant Physiol.*, 54: 201-7, 1974.
- VINCENT, J.M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 164p. (Int. Biol. Programme Handb., 15).
- VOGELS, G.D. & DRIFT, C. van der. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.*, 33: 143-57, 1970.
- WAHUA, T.A.T. & MILLER, D.A. Effects of intercropping on soybean N₂ fixation and plant composition on associated sorghum and soybeans. *Agron. J.*, 70: 292-5, 1978a.
- WAHUA, T.A.T. & MILLER, D.A. Effects of shading on the N₂-fixation, yield and plant composition of field-grown soybeans. *Agron. J.*, 70: 387-92, 1978b.