

INTERAÇÃO ENTRE CULTIVARES DE PHASEOLUS VULGARIS E ESTIRPES DE RHIZOBIUM NA FIXAÇÃO E TRANSPORTE DO NITROGÊNIO¹

MARIANGELA HUNGRIA² e MARIA CRISTINA P. NEVES³

RESUMO - Utilizaram-se cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. e seis estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* em um experimento conduzido sob condições de casa de vegetação. Foram observados efeitos da cultivar e da estirpe nos seguintes parâmetros: peso seco e N total acumulado nas folhas, caules e vagens; peso seco dos nódulos; eficiência dos nódulos (mg N.g nódulo⁻¹); atividade da nitrogenase; evolução do H₂ pelos nódulos; eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER); concentração de N total na seiva do xilema; taxa de translocação do N na seiva do xilema e percentagem do N total da seiva sob a forma de ureídeos. Os parâmetros (avaliados no florescimento, aos 35 dias após a germinação) que apresentaram as melhores correlações com o N total das vagens aos 50 dias foram: ER (0,872**), taxa de translocação do N na seiva do xilema (0,949**) e percentagem do N sob a forma de ureídeos (0,907**). Encontrou-se uma correlação positiva entre a ER e a percentagem N-ureído (0,903**), o que pode ser atribuído a uma possível relação entre o metabolismo do H₂ e o metabolismo dos ureídeos.

Termos para indexação: nodulação, atividade da nitrogenase, liberação do hidrogênio, ureídeos.

INTERACTIONS BETWEEN PHASEOLUS VULGARIS CULTIVARS AND RHIZOBIUM STRAINS IN NITROGEN FIXATION AND TRANSPORT

ABSTRACT - One experiment was performed, under greenhouse conditions, using five cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. and six strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* to evaluate the nitrogen fixation and transport in the plants. Both cultivars and strains affected significantly the dry weight and total N of leaves, stems and pods; nodule dry weight; nodule efficiency (mg N. g nod⁻¹); nitrogenase activity; H₂ evolution by the nodules; relative efficiency (RE); N concentration and rate of N translocation in the xylem sap and percentage of the N of the xylem sap as ureides. The parameters (estimated at flowering time, 35 days after germination) that showed best correlations with total N of pods at 50 days were: RE (0,872**), rate of N translocation in the xylem sap (0,949**) and percentage of N as ureides in the xylem sap (0,907**). A positive correlation was found between RE and percentage of N as ureides (0,903**), and this can be best explained in terms of a relationship between H₂ metabolism and ureide metabolism.

Index terms: nodulation, nitrogenase activity, hydrogen release, ureides.

INTRODUÇÃO

Existe grande variabilidade genética entre e dentro de espécies de leguminosas quanto à capacidade de fixar nitrogênio biologicamente, o que representa um material inesgotável para seleção genética. Essa variabilidade já foi demonstrada em *Phaseolus vulgaris*, refletindo em diferenças no peso, número e eficiência dos nódulos, atividade

da nitrogenase e nitrogênio total acumulado pelas plantas (Döbereiner & Ruschel 1961, Franco & Döbereiner 1967, Ruschel et al. 1979, Hungria & Ruschel 1982). Do mesmo modo, já foram detectadas diferenças entre plantas da mesma cultivar de feijão inoculadas com diferentes estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (Ruschel & Reuszner 1973, Ruschel & Saito 1977, Saito et al. 1978, 1980a, Hungria & Ruschel 1982). Conseqüentemente, torna-se importante o estudo dos fatores intrínsecos das plantas hospedeiras e das estirpes de *Rhizobium* que estariam relacionados com a maior fixação do nitrogênio e que poderiam contribuir para agilizar os processos de melhoramento genético.

Há muitas evidências de que o fornecimento de fotossintatos para os nódulos limita a capacidade

¹ Aceito para publicação em 4 de setembro de 1985. Parte da tese de doutorado da primeira autora. Trabalho apresentado na XII RELAR, Campinas, 21 a 26 de outubro 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 Bióloga, Ph.D., EMBRAPA/UAPNPBS.

de fixação dos sistemas simbióticos (Hardy & Halvka 1976). Por outro lado, durante o período de máxima fixação do nitrogênio os nódulos podem desviar de 10% a 30% dos fotossintatos da planta, reduzindo diretamente a produtividade das leguminosas (Schubert & Ryle 1980). Desse modo, deve-se procurar selecionar os sistemas simbióticos que utilizem mais eficientemente as fontes de carbono e energia da planta hospedeira (Gibson 1966, Neves et al. 1981, Rainbird et al. 1983).

Um dos gastos energéticos que diminuem a eficiência da fixação do nitrogênio é o processo de liberação do hidrogênio pelos nódulos, que ocorre simultânea e obrigatoriamente com a redução do nitrogênio, consumindo elétrons e ATP que, de outro modo, seriam utilizados para a produção de amônia (Schubert & Evans 1976, McCrae et al. 1978). Parte da energia perdida, porém, pode ser recuperada se houver a ação da enzima hidrogenase, que oxida o hidrogênio produzido, resultando em H^+ e ATP (McCrae et al. 1978, Walker & Yates 1978). As correlações entre menor gasto energético com a liberação do hidrogênio e a maior fixação do nitrogênio são controversas. Há citações de correlações positivas (Zablotowicz et al. 1980, Hungria & Ruschel 1982), negativas (Gibson et al. 1981) ou inexistência de correlação (Rainbird et al. 1983).

O transporte dos compostos nitrogenados também afeta a economia energética do sistema simbiótico. As leguminosas tropicais noduladas, como soja, caupi e feijão utilizam principalmente os ureídios para o transporte do nitrogênio fixado (Matsmoto et al. 1977, Herridge et al. 1978, Cookson et al. 1980). A baixa relação C/N desses compostos, e as evidências de que há um menor gasto energético envolvido na sua síntese indicam que as leguminosas que transportam ureídios são, possivelmente, mais econômicas na utilização dos compostos de carbono do que as espécies de clima temperado, que transportam principalmente amidas (Atkins et al. 1978, Thomas & Schrader 1981).

Neste trabalho, procurou-se verificar como a atividade da nitrogenase, evolução do hidrogênio pelos nódulos e o transporte de compostos nitrogenados na seiva do xilema variam em algumas cultivares de feijão inoculadas com estirpes mais ou menos eficientes na fixação do nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na EMBRAPA-UAPNPBS, km 47, Rio de Janeiro, no período de outubro a dezembro de 1983.

Utilizou-se feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) das cultivares Negro Argel, Carioca, Venezuela 350, Costa Rica e Rio Tibagi (sementes fornecidas pela EMBRAPA-CNPAF). As estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* usadas foram as C05 (CENA, SP.FP₂) (UAPNPBS, RJ) SEMIA 487 (IPAGRO, RS), 127 K-17 (Nitragin Co., EUA), CIAT 255 e CIAT 727 (Colômbia). As estirpes de *Rhizobium* foram crescidas em meio definido de Vincent (1970) a 29°C, por quatro dias, com agitação. As sementes foram esterilizadas com $HgCl_2$ (Vincent 1970), colocando-se, então, 1 ml de inoculante (com cerca de 10^8 células/ml) para cada 15 sementes, por uma hora, e procedendo-se, então, à semeadura. As plantas cresceram em vasos de Leonard modificados (Vincent 1970) contendo areia e vermiculita (1:2, v:v), lavadas por sete dias e os vasos foram esterilizados em autoclave a 120°C, por uma hora. Na semeadura colocaram-se cinco sementes por vaso cobrindo-se então, com uma camada (± 3 cm) de areia esterilizada. O desbaste foi realizado cinco dias após a germinação (DAG), deixando-se duas plantas por vaso. Forneceu-se, alternadamente com água destilada, solução nutritiva isenta de nitrogênio e contendo: KCl (2 mM); K_2HPO_4 (2,20 mM); $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (2 mM); KH_2PO_4 (0,29 mM); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 mM); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,30 μM); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,76 μM); $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (0,90 μM); $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0,008 μM); H_3BO_3 (11,56 μM); $FeSO_4$ (18 μM), pH 6,0-6,2. Utilizou-se um esquema fatorial com cinco cultivares e seis estirpes no delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições, e as coletas foram feitas no florescimento (35 a 38 DAG) e aos 50 DAG.

Análises

Para a determinação do peso de matéria seca, as folhas, nódulos, caules e vagens foram separados e secos em estufa a 60°C - 70°C, até atingir um peso constante. Das duas plantas de cada vaso, uma foi usada para a avaliação da atividade da nitrogenase (redução do acetileno) e a outra para avaliar a liberação do hidrogênio pelos nódulos. Para a redução do acetileno utilizaram-se raízes noduladas destacadas, num sistema de fluxo contínuo (Goi et al. 1984), cujos recipientes de incubação eram vidros de 100 ml, pelos quais passavam ar comprimido e acetileno, controlados de modo a manter uma concentração de acetileno de aproximadamente 12% com um fluxo de 100 ml.min⁻¹. tubo⁻¹. As leituras foram realizadas a 1, 3, 4, 5, 7, 10, 15 e 30 minutos após o início da incubação. A variação entre as leituras consecutivas de uma mesma planta foi, em média, de 2,95% e, para os cálculos, tomou-se a maior taxa de redução do acetileno de cada planta. O acetileno produzido foi determinado em um cromatógrafo Perkin Elmer FII com detector de ionização de chama,

usando-se uma coluna de aço inoxidável com 0,32 cm de diâmetro interno por 50 cm de comprimento, contendo Poropak N (80 - 100 mesh) e operada a 40°C, utilizando-se o nitrogênio como gás de arraste a um fluxo de 40 ml. min.⁻¹.

A liberação do H₂ foi determinada em nódulos destacados com pequenos segmentos radiculares, ± 5 cm, para evitar injúrias e permitir um suprimento de carbono para os nódulos (Schubert & Evans 1976). Os nódulos foram colocados em vidros de 30 ml contendo um pedaço de papel absorvente umedecido para evitar o dessecamento. Os frascos foram fechados hermeticamente e incubados em ar por 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura do hidrogênio produzido foi feita em um cromatógrafo Varian modelo 1420 com um detector de condutividade térmica. Utilizou-se uma coluna de aço inoxidável com 0,32 cm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento, contendo peneira molecular 5A^o (80 a 100 mesh) e operada a 40°C, usando-se o argônio como gás de arraste a um fluxo de 25 ml.min.⁻¹.

A eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrificação foi calculada pelo parâmetro de Schubert & Evans

$$\frac{H_2 \text{ liberado (ar)}}{H_2 \text{ liberado (ar)}}$$

(1976), ou seja, ER = 1 -

$$\frac{C_2H_2 \text{ reduzido}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}$$

Para a coleta e análise da seiva do xilema, cortou-se a parte aérea das plantas na altura do nó cotiledonar. A superfície do corte foi lavada com água destilada e secada com papel absorvente. A seiva exsudada foi então coletada em pipetas microcapilares calibradas (20 e 50 µl) durante 15 minutos, calculando-se a taxa de exsudação. A seiva foi mantida a -20°C até o momento das análises, e os compostos nitrogenados foram determinados em alíquotas de 5 µl de seiva, segundo Hungria (1985). O N total das folhas, caule e vagens foi determinado pelo método semimicro-Kjeldahl segundo Liao (1981) e a destilação e titulação foram realizadas segundo Bremner & Edwards (1965).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acúmulo de matéria seca nas diversas partes da planta seguiu, em linhas gerais, o acúmulo de nitrogênio nessas mesmas partes. Interações altamente significativas foram observadas entre cultivares e estirpes no nitrogênio acumulado nas folhas e caule no florescimento, 35 dias após a germinação (DAG) (Fig. 1), e no nitrogênio das vagens aos 50 DAG (Fig. 2). A combinação de Negro Argel com a estirpe CO5 se destacou como a melhor, superando o nitrogênio total das folhas, caule e vagens da Rio Tibagi submetida a inoculação com a estirpe CIAT 255, respectivamente em

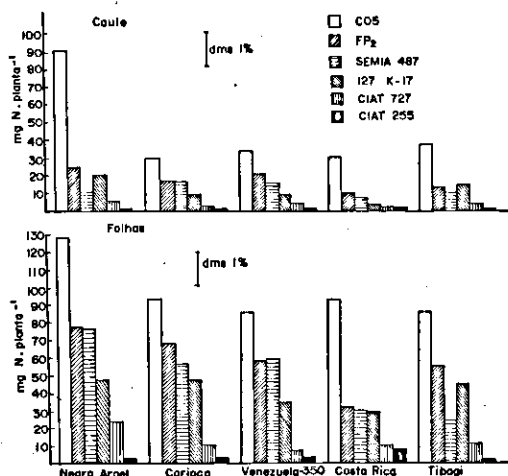


FIG. 1. Efeito da interação entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* no N total acumulado no caule e nas folhas aos 35 DAG. Médias de quatro repetições.

4.959%, 8.171% e 23.000%. Interações entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* na fixação do nitrogênio já haviam sido verificadas por Hungria & Ruschel (1982).

O peso dos nódulos pode ser visto na Fig. 3, constatando-se, também diferenças entre os tratamentos. As correlações entre o peso dos nódulos no florescimento e o nitrogênio total da parte aérea, nessa mesma época ($r = 0,508^{**}$), ou nitrogênio total das vagens aos 50 DAG ($r = 0,580^{**}$) (Tabela 1), embora significativas, são bastante baixas, o que confirma observações feitas em feijão (Saito et al. 1978, Rennie & Kemp 1981, Hungria & Ruschel 1982) de que nem sempre o maior peso de nódulos corresponde ao maior acúmulo de nitrogênio nos tecidos.

As diferenças entre as estirpes de *Rhizobium* podem ser vistas na Tabela 2, e estão de acordo com Saito et al. (1978) e Hungria & Ruschel (1982), que observaram que a estirpe CO5, embora apresentasse massa nodular relativamente baixa, acumulou bastante nitrogênio na parte aérea e nas vagens. As estirpes FP₂ e SEMIA 487 formaram mais nódulos, mas a eficiência destes foi, respectivamente, 2,7 e 2,5 vezes inferior à das plantas submetidas a inoculação com a estirpe CO5. Em um sistema simbiótico onde o suprimento de fotossin-

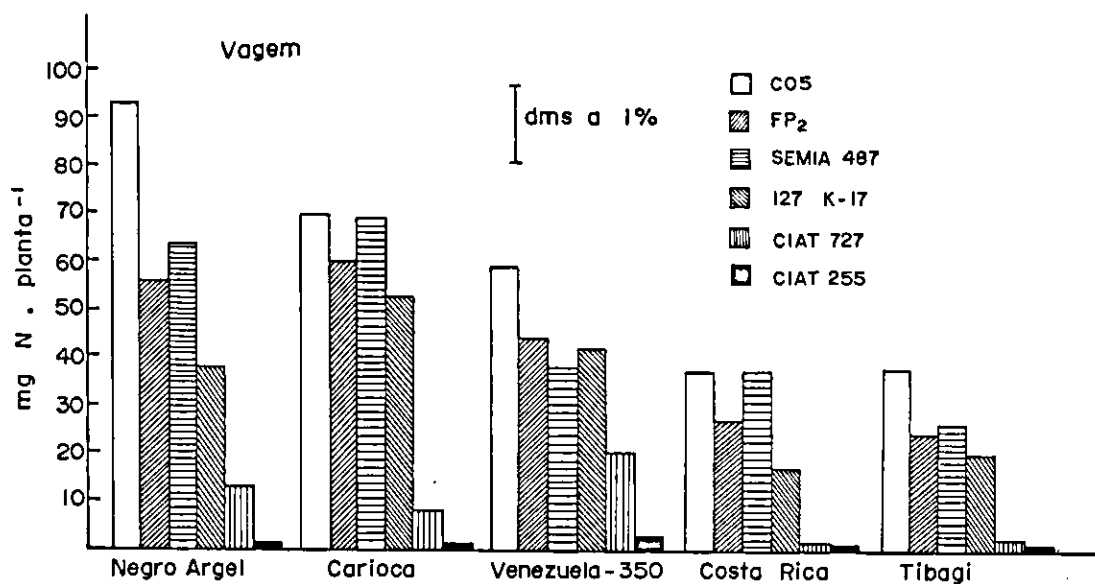


FIG. 2. Efeito da interação entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* no N total acumulado nas vagens aos 50 DAG. Médias de quatro repetições.

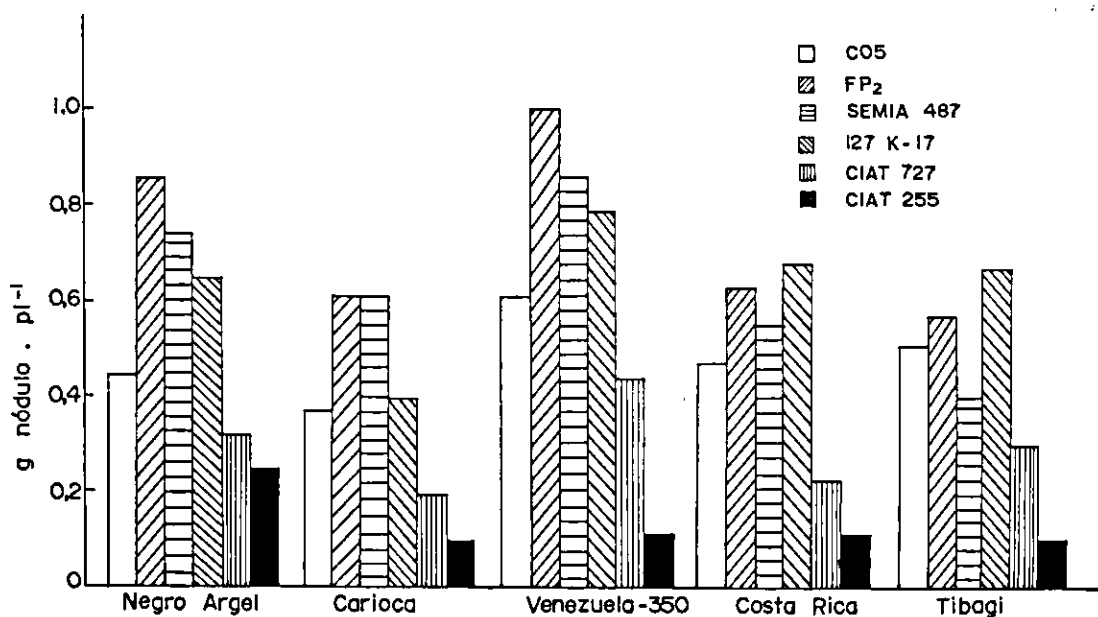


FIG. 3. Efeito da interação entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* no peso seco de nódulos aos 35 DAG. Médias de quatro repetições.

INTERAÇÃO ENTRE CULTIVARES DE *PHASEOLUS VULGARIS*

TABELA 1. Correlação entre nodulação (X) e diversos parâmetros fisiológicos (Y) em feijão. Coeficientes calculados a partir de 30 pares de dados.

X	Y	r
Peso seco dos nódulos (g.pl ⁻¹)	N total da parte aérea (mg.pl ⁻¹)	0,508**
	N total das vagens (mg.pl ⁻¹)*	0,580**
	Redução do acetileno (nmoles C ₂ H ₄ .pl ⁻¹ .min ⁻¹)	0,786**
	Evolução do H ₂ (μmoles H ₂ .pl ⁻¹ .h ⁻¹)	-0,273 n.s.
	Eficiência relativa	0,646**
Eficiência dos nódulos (mg N fixado.g nod ⁻¹)	Redução do acetileno	0,466**
	ER	0,638**

* Aos 50 dias após o plantio; todos os demais parâmetros foram avaliados no florescimento (35 dias).

** Significância ao nível de 1%.

n.s. não-significativo.

TABELA 2. Efeito da estirpe de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* na nodulação, na eficiência dos nódulos e acúmulo de N total na parte aérea (folhas + caule + vagem) aos 35 dias após a germinação, e no N total das vagens aos 50 dias. Médias de 20 repetições.

Estirpe	35 dias (florescimento)			50 dias
	Peso dos nódulos (g.pl ⁻¹)	N total da parte aérea (mg N.pl ⁻¹)	Eficiência dos nódulos (mg N.g nod. ⁻¹)	N total da vagem (mg N.pl ⁻¹)
CO5	0,479b*	183,37a	382,82a	58,04a
FP ₂	0,734a	102,72b	139,96b	42,58b
SEMIA 487	0,636ab	95,74b	150,53b	45,96b
127 K-17	0,634ab	77,60c	122,40b	33,78c
CIAT 727	0,288c	21,97d	76,28c	8,60d
CIAT 255	0,133c	6,06e	45,56c	0,96e

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

tatos para os nódulos pode ser o fator limitante para a fixação do N₂ (Hardy & Havelka 1976), o menor gasto de carbono com a formação e manutenção dos nódulos pode refletir diretamente no crescimento das plantas. Já as estirpes CIAT 727 e CIAT 255 formaram nódulos ineficientes, prejudicando o crescimento das plantas.

Quanto às cultivares (Tabela 3), observou-se que Negro Argel e Carioca foram as melhores plantas hospedeiras, resultando em maior acúmulo de nitrogênio e maior eficiência dos nódulos. Os piores desempenhos foram obtidos pelas cultivares Costa Rica e Rio Tibagi. Não houve relação entre a fixação do N₂ e o hábito de crescimento das cultivares, o que foi também verificado por Rennie &

Kemp (1981). Deve-se salientar, também, que uma cultivar com boa capacidade para resposta à fixação de nitrogênio, como é o caso da Negro Argel, pode se beneficiar e se destacar das demais quando inoculada com uma estirpe eficiente, como a CO5. Já em uma cultivar selecionada na presença de nitrogênio mineral, como é o caso da Rio Tibagi, a mesma estirpe não consegue expressar o seu potencial de fixação do nitrogênio.

Houve efeitos da estirpe (Tabela 4) e da cultivar (Tabela 5) na atividade da nitrogenase total e específica, na liberação do hidrogênio pelos nódulos e na eficiência relativa (ER) dos elétrons utilizados na reação catalizada pela nitrogenase. A estirpe CO5 se destacou das demais principalmente quan-

TABELA 3. Efeito da cultivar de feijão na nodulação, na eficiência dos nódulos e acúmulo de N total na parte aérea (folhas + caule + vagens) aos 35 dias após a germinação, e no N total das vagens aos 50 dias. Médias de 24 repetições.

Cultivar	35 dias (florescimento)			50 dias
	Peso dos nódulos (g.pl ⁻¹)	N total da parte aérea (mg N. pl ⁻¹)	Eficiência dos nódulos (mg N.g nod ⁻¹)	N total das vagens (mg N. pl ⁻¹)
Negro Argel	0,541b*	116,85a	215,99a	44,08a
Carioca	0,377c	92,04b	244,14a	45,52a
Venezuela-350	0,636a	80,47c	126,52b	33,85b
Costa Rica	0,442bc	55,43d	125,41b	18,50c
Rio Tibagi	0,424bc	61,43d	144,88b	18,31c

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

TABELA 4. Efeito da estirpe de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* na atividade da nitrogenase, na liberação do H₂ e na eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER)* em feijão aos 35 dias após a germinação. Médias de 20 repetições.

Estirpe	Atividade total (μmoles.pl ⁻¹ . h ⁻¹)		Atividade específica (μmoles.g nod ⁻¹ . h ⁻¹)		ER
	C ₂ H ₄	H ₂	C ₂ H ₄	H ₂	
CO5	10,96ab**	1,47c	25,48a	3,11b	0,88a
FP ₂	13,24a	2,33b	19,76b	3,44b	0,83a
SEMIA 487	11,28ab	2,28b	19,28b	3,98b	0,79a
127 K-17	9,82b	3,29a	14,92c	5,71a	0,62b
CIAT 727	2,49c	1,52c	9,02d	5,07a	0,44c
CIAT 255	0,64c	0,39d	6,66e	3,80b	0,43c

* ER = $1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}$ (Schubert & Evans 1976)

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

to à atividade da nitrogenase específica (Tabela 4). As melhores estirpes (CO5, FP₂ e SEMIA 487), embora apresentassem maior atividade da nitrogenase, não foram as que apresentaram maior liberação do hidrogênio e, portanto, caracterizaram-se por possuírem as eficiências relativas mais elevadas (Tabela 4). A cultivar Negro Argel, embora apresentasse maior atividade da nitrogenase total, foi superada pela cultivar Carioca quanto à atividade específica. A Negro Argel também se evidenciou por apresentar a mais baixa liberação do hidrogênio pelos nódulos, implicando maior eficiência relativa (Tabela 5).

Inicialmente, acreditava-se que a liberação do hidrogênio fosse determinada somente pela estirpe de *Rhizobium*, que controlaria as informações genéticas para a síntese da hidrogenase (Dixon 1967, Carter et al. 1978). Entretanto, Gibson et al. (1981), Hungria & Ruschel (1982) e Miller & Sirois (1982) observaram que a planta hospedeira também afeta a liberação do hidrogênio, talvez pela indução da síntese da hidrogenase, o que volta a ser confirmado pelos resultados obtidos neste experimento.

O método de redução do acetileno para avaliar a atividade da nitrogenase, embora seja rápido e

TABELA 5. Efeito da cultivar de feijão na atividade da nitrogenase, liberação do H₂ e eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER)* aos 35 dias após a germinação. Médias de 24 repetições.

Cultivar de feijão	Atividade total (μmoles.pl ⁻¹ . h ⁻¹)		Atividade específica (μmoles.g nod ⁻¹ . h ⁻¹)		ER
	C ₂ H ₄	H ₂	C ₂ H ₄	H ₂	
Negro Argel	10,14a**	1,25d	16,32b	2,52c	0,85a
Carioca	7,83b	1,56c	18,55a	4,78b	0,74b
Venezuela-350	9,10ab	2,42a	15,34b	4,02b	0,74b
Costa Rica	8,76ab	2,21ab	19,17a	6,14a	0,68b
Rio Tibagi	4,50c	1,96b	9,78c	4,74b	0,52c

* ER = $1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}$ (Schubert & Evans 1976)

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

TABELA 6. Correlações entre redução do acetileno e liberação do H₂ (X) e diversos parâmetros fisiológicos (Y) em feijão. Coeficientes calculados a partir de 30 pares de dados.

X	Y	R
Redução do acetileno (nmoles C ₂ H ₄ . pl ⁻¹ . min. ⁻¹)	N total da parte aérea (mg.pl ⁻¹)	0,707**
	N total da vagem (mg.pl ⁻¹)*	0,756**
	Evolução do H ₂ (μmoles H ₂ . pl ⁻¹ . h ⁻¹)	-0,221 n.s.
	Eficiência relativa (ER)	0,904**
	N total da parte aérea	0,745**
Atividade específica (nmoles C ₂ H ₄ . gnod ⁻¹ . min. ⁻¹)	N total da vagem	0,741**
	ER	0,858**
	N total da parte aérea	-0,107 n.s.
Liberação do H ₂ (μmoles H ₂ . pl ⁻¹ . h ⁻¹)	N total da vagem	-0,305 n.s.
	ER	-0,262 n.s.
	N total da parte aérea	0,823**
ER	Produtividade das plantas (g semente.pl ⁻¹)	0,850**
	N total da parte aérea	0,806**
Redução do acetileno x ER	N total das vagens	0,814**

* Aos 50 dias após o plantio; todos os demais parâmetros foram avaliados no florescimento (35 dias).

** Significância ao nível de 1%.

n.s. não-significativo.

barato, apresenta muitas limitações, como a avaliação apenas momentânea da atividade enzimática e a inibição da liberação do H₂ (Schubert & Evans 1976). Outra restrição ao uso dessa metodologia reside no fato de que, recentemente, Minchin et al. (1983) verificaram que o acetileno reduz a permeabilidade dos nódulos ao oxigênio, o que pode provocar um declínio de até 50% na atividade da nitrogenase. Neste experimento, porém, utilizando-se o sistema de fluxo contínuo, verificou-se que o

declínio na atividade da nitrogenase causado pelo acetileno foi, em média, de apenas 2,95%, sendo observada uma variação máxima de 9,67%. Os sistemas simbióticos estudados, portanto, não pareceram apresentar as limitações sugeridas por Minchin et al. (1983).

Apesar de todas as restrições do método de redução do acetileno, houve uma correlação significativa (Tabela 6) entre o acetileno reduzido na época do florescimento e o nitrogênio da parte

aérea nessa mesma época ($r = 0,707^{**}$) e o nitrogênio total das vagens aos 50 DAG ($r = 0,756^{**}$). Como pode ser constatado na Tabela 6, as correlações com o nitrogênio total da parte aérea e das vagens foram maiores quando feitas com a atividade da nitrogenase específica. Esse aumento foi estatisticamente significativo. Entretanto, as melhores correlações foram obtidas entre a eficiência relativa (ER) e o nitrogênio total da parte aérea aos 35 DAG ($r = 0,823^{**}$) (Tabela 6), ou nitrogênio total das vagens aos 50 DAG ($r = 0,872^{**}$) (Fig. 4). O aumento do valor da correlação devido à correção proposta por Schubert & Evans (1976) foi estatisticamente significativo. A correlação da redução do acetileno foi maior com o peso dos nódulos ($r = 0,786^{**}$) do que com a eficiência dos nódulos ($r = 0,466^{*}$) (Tabela 1).

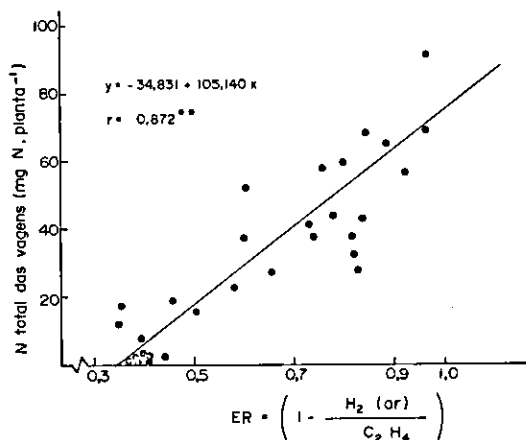


FIG. 4. Correlação entre a ER aos 35 DAG e o N total das vagens aos 50 DAG. Os pontos representam médias de quatro repetições.

Miller & Sirois (1982) observaram que, em alfafa, a correlação entre o produto algébrico da redução do acetileno pela ER ($C_2H_4 \times ER$) ou seja, $(C_2H_4 - H_2)$, e a produtividade da planta foi superior à correlação entre a redução do acetileno e a produtividade. Como pode ser visto na Tabela 6, a utilização do parâmetro de Miller & Sirois (1982) também foi mais elevada do que quando se utilizou apenas a redução do acetileno. Esses autores, porém, não encontraram correlação entre a ER e a produtividade das plantas, ao contrário

deste experimento, onde se obteve $r = 0,850^{**}$ (Tabela 6).

Não houve correlação significativa entre a liberação do hidrogênio e os parâmetros analisados, e a ER esteve relacionada positivamente com a redução do C_2H_2 (Tabela 6). Os valores de ER encontrados estiveram entre 0,37 (Rio Tibagi com 4002) e 0,96 (Negro Argel e Carioca com CO5) mostrando que, no primeiro sistema simbiótico, a perda de elétrons e ATP pela liberação do hidrogênio foi muito elevada. Saito et al. (1980b) encontraram, em feijão, valores de ER entre 0,65 e 0,68, Bethlenfalvay & Phillips (1977) citam ER entre 0,6 e 0,8 e Hungria & Ruschel (1982) entre 0,53 e 0,83.

Quando ocorre a redução do nitrogênio há um desvio mínimo e obrigatório de 25% dos elétrons destinados à nitrogenase. Desse modo, os valores de ER acima de 0,75 devem estar relacionados à atividade da hidrogenase, que oxida o hidrogênio liberado, recuperando parte da energia perdida. As eficiências relativas encontradas em feijão são, de um modo geral, bastante inferiores à ER de 0,99 constatada em caupi (Schubert & Evans 1976) e soja (Carter et al. 1978). Essa baixa ER pode ser característica de algumas espécies, pois em alfafa, ervilha e trevo nodulados, embora tenha sido detectada a presença de hidrogenase ativa, esta não é capaz de reciclar todo o hidrogênio produzido (Ruiz-Argueso et al. 1978, 1979, Nelson & Child 1981). Pacoksky et al. (1984) observaram que em diversas combinações de *Rhizobium phaseoli* com feijão a ER foi inferior a 0,60, o que provavelmente estaria limitando a simbiose e, desse modo, os autores sugeriram que o gene *hup* deveria ser introduzido em plasmídios recombinantes através da engenharia genética.

Em relação ao transporte de nitrogênio na seiva do xilema, podem ser vistos, na Fig. 5, os dados relativos à taxa de translocação de nitrogênio (estimada pelo produto entre a concentração de nitrogênio total na seiva e a taxa de exsudação da seiva). Houve grande similaridade entre a taxa de transporte de nitrogênio na seiva do xilema ($nmol N \cdot pl^{-1} \cdot min^{-1}$) no florescimento e o nitrogênio total acumulado na parte aérea nessa mesma época, de maneira que a correlação entre esses dois parâmetros foi altamente significativa ($r = 0,882^{**}$) (Tabela 7). Mas, se a correlação for calculada con-

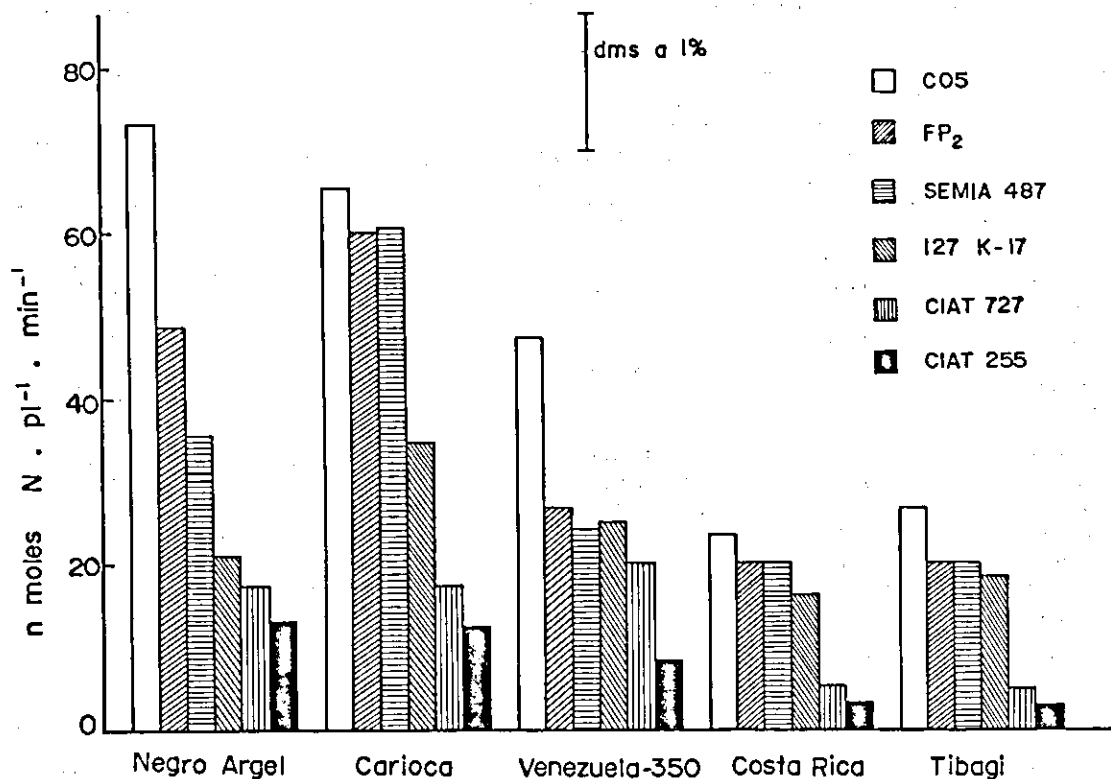


FIG. 5. Taxa de transporte de N total na seiva do xilema de cinco cultivares de feijão inoculadas com seis estirpes de *Rhizobium* aos 35 DAG. Médias de quatro repetições.

TABELA 7. Correlações entre o N na seiva do xilema (X) e diversos parâmetros fisiológicos (Y) em feijão. Parâmetros avaliados no florescimento (35 dias após a germinação) e os coeficientes foram calculados a partir de 30 pares de dados.

X	Y	N total da parte aérea* (mg.pl ⁻¹)	Redução do acetileno (nmoles C ₂ H ₄ . pl ⁻¹ .min. ⁻¹)	Atividade específica (nmoles C ₂ H ₄ . gnod ⁻¹ . min. ⁻¹)	Eficiência relativa
Taxa de transporte de N (nmol N. pl ⁻¹ . min. ⁻¹)		0,882**	0,659**	0,696**	0,783**
Concentração de N (μmol N. ml ⁻¹)		0,713**	0,617**	0,572**	0,648**
Porcentagem de N-ureído		0,892**	0,812**	0,754**	0,903**

* Folhas + caule + vagem.

** Significativo ao nível de 1%.

siderando-se apenas a concentração de nitrogênio na seiva (μmol N.ml⁻¹), essa correlação cai para r = 0,713** . Esse decréscimo foi estatisticamente diferente. A diminuição da correlação ocorre por-

que houve diferença estatística, atribuída tanto às cultivares quanto às estirpes, na taxa de exsudação da seiva do xilema (Tabela 8). Thomas et al. (1984) também observaram que havia variação

TABELA 8. Efeito da cultivar de feijão e da estirpe de *Rhizobium* no transporte de N na seiva do xilema aos 35 dias após a germinação.

Tratamento	N total da seiva		Taxa de exsudação ($\mu\text{l.pl}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$)	Porcentagem de N sob a forma de ureído
	Concentração ($\mu\text{mol N.ml}^{-1}$)	Taxa de transporte ($\text{nmol N.pl}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$)		
Estirpe				
CO5*	41,83a***	47,31a	1,13a	90,55a
FP ₂	39,49a	35,13b	0,89b	85,26a
SEMIA 487	32,06b	32,74b	1,02a	87,11a
127 K-17	29,38b	23,20c	0,79c	78,30b
CIAT 727	29,57b	12,84d	0,43d	56,16c
CIAT 255	16,82c	5,20e	0,31e	51,10c
Cultivar				
Negro Argel**	34,65a	41,31a	1,19a	80,16a
Carioca	39,25a	40,51a	1,03a	79,51a
Venezuela-350	27,43b	25,17b	0,92a	73,79b
Costa Rica	24,96b	15,25c	0,61a	71,42b
Rio Tibagi	26,33b	15,51c	0,59a	68,85c

* Médias de 20 repetições.

** Médias de 24 repetições.

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

entre cultivares de feijão na taxa de exsudação, e o efeito da estirpe foi citado por Minamisawa et al. (1983) em soja.

Também foi encontrada uma correlação altamente significativa ($r = 0,949^{**}$) entre a taxa de transporte de nitrogênio no florescimento e o nitrogênio total das vagens aos 50 DAG, havendo novamente uma queda para $r = 0,783^{**}$, significativa estatisticamente, quando se considerou apenas a concentração de nitrogênio na seiva (Fig. 6). Assim, os resultados obtidos confirmaram os dados de Hungria & Neves (1984) e Thomas et al. (1984), segundo os quais as melhores combinações simbióticas apresentam maior taxa de translocação de nitrogênio na seiva do xilema.

A maior parte do nitrogênio da seiva foi transportada sob a forma de ureídos (Fig. 7), representando de 40% a 93% do nitrogênio total, e essa predominância foi observada também por Pate (1973), Cookson et al. (1980) e Hungria & Neves (1984). De acordo com Reinbothe & Mothes (1962), os ureídos desempenhariam um papel de diminuição da toxidez da amônia sob condições de estresse de carbono. Thomas & Schrader

(1981) sugeriram que os ureídos representariam um mecanismo de conservação do carbono, devido a menor relação C/N desses compostos e, juntamente com o menor gasto energético necessário para a síntese dos ureídos (Atkins et al. 1978), o seu transporte poderia estar relacionado com a maior eficiência dos sistemas simbióticos.

Foi encontrada uma correlação positiva entre a porcentagem de nitrogênio na seiva do xilema sob a forma de ureídos no florescimento e o nitrogênio total da parte aérea nessa mesma época ($r = 0,892^{**}$) (Tabela 7) ou o nitrogênio total das vagens aos 50 dias ($r = 0,907^{**}$) (Fig. 8). Com isso, confirmaram-se resultados obtidos anteriormente por Hungria & Neves (1984), indicando que esse índice pode ser usado para avaliar a eficiência da fixação do nitrogênio.

Houve efeitos da cultivar de feijão e da estirpe de *Rhizobium* na taxa de exsudação, na taxa de transporte e concentração de nitrogênio total na seiva do xilema e no teor de ureídos (Tabela 8). Thomas et al. (1984) também observaram que as cultivares de feijão apresentam variabilidade na taxa de translocação de nitrogênio total na seiva do

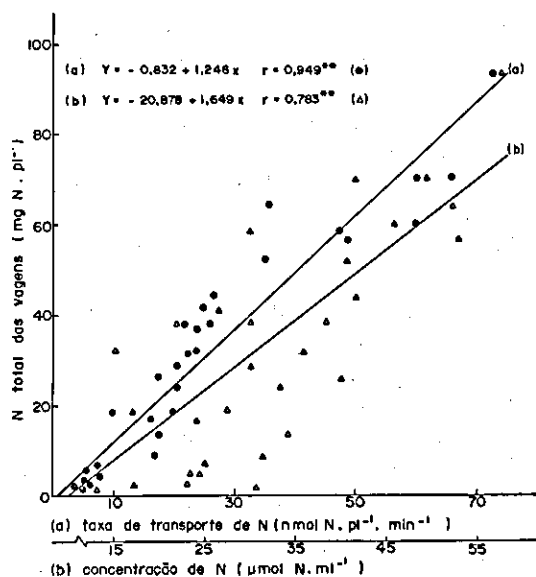


FIG. 6. Correlação entre (a) taxa de transporte e (b) concentração de N na seiva do xilema aos 35 DAG e o N das vagens aos 50 DAG. Os pontos representam médias de quatro repetições.

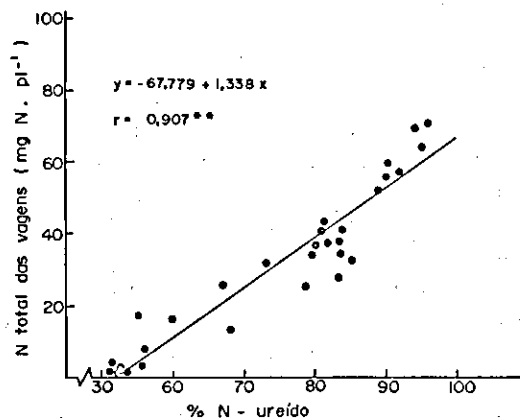


FIG. 8. Correlação entre a porcentagem da seiva do xilema sob a forma de ureídeos aos 35 DAG e o N total das vagens aos 50 DAG. Os pontos representam médias de quatro repetições.

Israel & McClure (1980) e Minamisawa et al. (1983) observaram que as estirpes mais eficientes de soja alteram a composição da seiva do xilema, transportando maiores teores de asparagina e glutamina. Esses resultados, adicionados ao aumento no teor de ureídeos encontrados em feijão neste experimento e por Hungria & Neves (1984), e em soja por Didonet et al. (1984), confirmam as sugestões de Minamisawa et al. (1983) de que os bacteríodes podem influenciar o sistema assimilatório no citossol da planta ou em algum passo do ciclo metabólico de Krebs.

É possível que o aumento encontrado no teor de ureídeos se deva ao fato de que, nas combinações simbióticas caracterizadas por altas taxas de fixação de nitrogênio, o carbono seja o fator limitante e, sob condições de limitação de esqueletos de carbono, aumentaria a produção de ureídeos para diminuir a toxidez da amônia (Reinbothe & Mothes 1962). Já nas combinações simbióticas com baixa eficiência de fixação de nitrogênio, o fator limitante foi o nitrogênio e não o carbono e, desse modo, não houve aumento no teor de ureídeos.

As altas correlações encontradas entre o nitrogênio acumulado nos tecidos e a taxa de translocação de nitrogênio na seiva do xilema ou a porcentagem de N-ureído indicam que as análises da seiva do xilema podem ser úteis nos programas de seleção ou avaliação dos sistemas simbióticos. A seiva

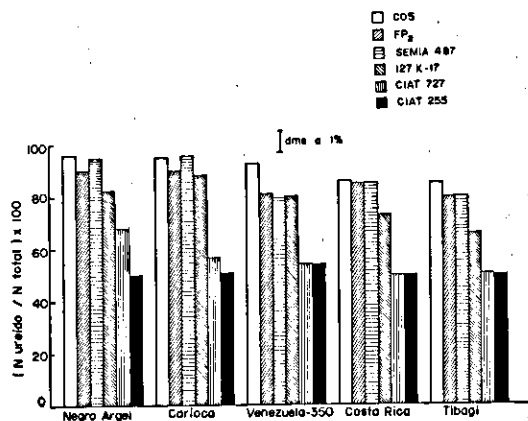


FIG. 7. Efeito da interação entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* na porcentagem de N da seiva do xilema sob a forma de ureído aos 35 DAG. Médias de quatro repetições.

xilema, e Minamisawa et al. (1983) observaram um efeito da estirpe de soja, mas nenhum desses autores observou modificações na porcentagem de N-ureído.

é um material de fácil manipulação, dispensando as etapas de secagem e moagem. Além disso, pode-se facilmente obter informações sobre outros nutrientes, como fósforo e potássio.

Apesar de ser uma medida instantânea, a taxa de transporte de nitrogênio apresentou uma alta correlação com o nitrogênio total da parte aérea ou das vagens, ao contrário da redução do acetileno, embora essas avaliações tenham sido feitas sob as mesmas condições ambientais e simultaneamente. Como se vê na Tabela 8, a correlação entre esses dois métodos, embora significativa, foi bastante baixa. No caso do feijão, Hungria & Neves (1984) observaram que as melhores correlações foram obtidas na época entre o florescimento e o período médio de enchimento dos grãos. Thomas et al. (1984) constataram, ainda, que essa correlação pode ser encontrada sob condições de campo e que independe da fonte de nitrogênio disponível ao sistema radicular. Mas, como salientam esses autores, é necessário que sejam desenvolvidos mais trabalhos para caracterizar os fatores que afetam as taxas de exsudação, tais como a concentração de sais e o potencial de água no solo.

Houve uma correlação positiva e significativa entre a ER e a percentagem de ureídios na seiva do xilema, como pode ser visto na Fig. 9, confirmando

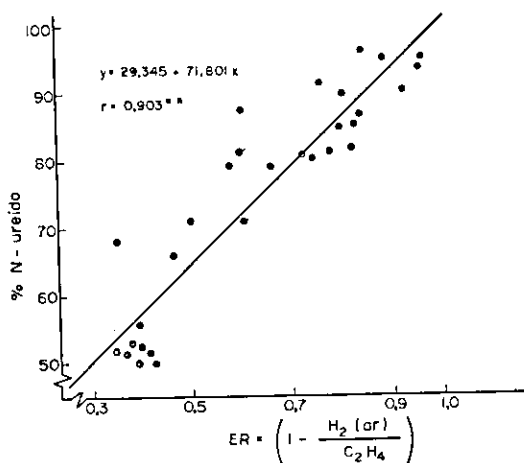


FIG. 9. Correlação entre a ER e a percentagem do N da seiva do xilema sob a forma de ureídios aos 35 DAG. Os pontos representam médias de quatro repetições.

resultados encontrados previamente por Hungria & Neves (1984) em feijão e por Didonet et al. (1984) em soja. Esta correlação sugere uma possível relação entre o metabolismo do hidrogênio (atividade da enzima hidrogenase ou eficiência de alocação dos elétrons destinados à nitrogenase) e o metabolismo dos ureídios. A explicação pode também estar relacionada ao fato de que as estirpes com maior ER apresentam maior fixação de nitrogênio e, para assimilar a maior quantidade de amônia produzida, há necessidade de utilizar compostos nitrogenados com menor relação C/N, como os ureídios.

Deve-se salientar, ainda, que essa alta correlação entre percentagem ureídios e ER ($r = 0,903^{**}$) é específica para esses compostos nitrogenados e não consequência do transporte total do nitrogênio, pois a correlação entre a taxa de transporte do nitrogênio e a ER foi de $0,783^{**}$ (Tabela 7) e esse valor foi estatisticamente menor.

CONCLUSÕES

1. Foram observados efeitos da cultivar de feijão e da estirpe de *Rhizobium* nos seguintes parâmetros: peso seco e N total acumulado nas folhas, caule e vagens; peso seco dos nódulos; eficiência dos nódulos ($\text{mg N.g nódulo}^{-1}$); atividade da nitrogenase; liberação do H_2 pelos nódulos; eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER); concentração de N total na seiva do xilema; taxa de translocação de N total na seiva do xilema e percentagem de N do N total da seiva sob a forma de ureídios.

2. O N total acumulado nas vagens aos 50 dias após a germinação apresentou boas correlações com os seguintes parâmetros avaliados no florescimento (35 dias): redução do acetileno total ($0,756^{**}$); atividade específica ($0,741^{**}$); ER ($0,872^{**}$); concentração de N total na seiva do xilema ($0,783^{**}$); taxa de translocação do N total na seiva ($0,949^{**}$), e percentagem do N da seiva sob a forma de ureídios ($0,907^{**}$).

3. As análises da seiva do xilema (taxa de translocação de N e percentagem de N-ureído) parecem ser promissoras na avaliação e seleção de sistemas simbióticos mais eficientes.

INTERAÇÃO ENTRE CULTIVARES DE *PHASEOLUS VULGARIS*

4. Houve uma correlação positiva entre a ER e a percentagem de N-ureído ($r = 0,903^{**}$), o que pode ser atribuído a uma possível relação entre o metabolismo do H_2 e o metabolismo dos ureídos.

AGRADECIMENTOS

À Silvia Regina Goi (UFRRJ), pela ajuda nas análises de redução do acetileno. A pesquisa deste trabalho foi parcialmente financiada pela FINEP.

REFERÊNCIAS

- ATKINS, C.A.; HERRIDGE, D.F. & PATE, J.S. The economy of carbon and nitrogen in nitrogen-fixing annual legumes. In: ISOTOPES in biological dinitrogen fixation. Vienna, IAEA, 1978. p.211-42.
- BENTHLENFALVAY, 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.
- BREMNER, J.M. & EDWARDS, A.P. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soil. I. Apparatus and procedures for distillation and determination for ammonium. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:504-7, 1965.
- CARTER, K.R.; JENNINGS, N.T.; HANUS, J. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, 24:304-11, 1978.
- 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.
- DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F. & NEVES, M.C.P. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *An. Acad. Bras. Ci.*, 56(3): 361-2, 1984.
- DIXON, R.O.D. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. *Ann. Bot.*, 31:179-88, 1967.
- DÖBEREINER, J. & RUSCHEL, A.P. Fixação biológica do nitrogênio atmosférico em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). I. Influência do solo e da variedade. Rio de Janeiro, Inst. Ecol. Exper. Agríc., 1961. 16p. (Comunicado Técnico, 10).
- FRANCO, A.A. & DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesq. agropec. bras.*, Rio de Janeiro, 2:467-74, 1967.
- GIBSON, A.H. The carbohydrate requirements for symbiotic nitrogen fixation; a "whole-plant" growth analysis approach. *Aust. J. Biol. Sci.*, 19:449-515, 1966.
- GIBSON, A.H.; DREYFUS, B.L.; LAWM, R.L.; SPRENT, J.I. & TURNER, G.L. Host and environmental factors affecting hydrogen evolution and uptake. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in nitrogen fixation; proceedings of the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation*. Canberra, Aust. Acad. Sci., 1981. p.373.
- GOI, S.R.; NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. Considerações sobre a utilização do método de redução de acetileno na avaliação da fixação do nitrogênio em feijão. *An. Acad. Bras. Ci.*, 56(3):362, 1984.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1976. p.421-39.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & RAINBIRD, R.M. Allantoin and allantoinic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant Physiol.*, 62:495-8, 1978.
- HUNGRIA, M. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. L. Itaguaí, UFRRJ, 1985. 292p. Tese Doutorado - Ciência do Solo.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Seasonal variations on nodule metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.C., ed. *Advances in nitrogen fixation research; proceedings of the 5th International Symposium on Nitrogen Fixation*. s.l., Noordwijkerhout, 1984. p.505.
- HUNGRIA, M. & RUSCHEL, A.P. Eficiência da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. I. Efeito da cultivar de feijão e da estirpe de bactéria. In: REUNIÃO LATINOAMERICANA DE RHIZOBIUM, 11., Lima, Peru, 1982. *Memórias ... Lima, ALAR*, 1982. p.60.
- ISRAEL, D.W. & MCCLURE, P.A. Nitrogen translocation in the xylem of soybeans. In: CORBIN, F.T., ed. *Proceedings of the 2nd World Soybean Research Conference*. Granada, Westview Press, 1980. p.111-27.
- LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45:852-5, 1981.
- MCCRAE, R.E.; HANUS, F.J. & EVANS, H.J. Properties of hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80(2):384-90, 1978.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoinic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant Cell Physiol.*, 18:353-9, 1977.
- MILLER, R.W. & SIROIS, J.C. Relative efficacy of different alfalfa cultivar - *Rhizobium meliloti* strain combinations for symbiotic nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(4):764-8, 1982.
- MINAMISAWA, K.; ARIMA, Y. & KUMAZAWA, K. Transport of fixed nitrogen from soybean nodules. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 21(2):127-140, fev. 1986.

- inoculated with H₂-uptake positive and negative *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 29(1):85-92, 1983.
- 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(142):641-9, 1983.
- NELSON, L.M. & CHILD, J.J. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism by *Rhizobium leguminosarum* isolates in pea root nodule. *Can. J. Microbiol.*, 27: 1028-34, 1981.
- NEVES, M.C.P.; MINCHIN, F.R. & SUMMERFIELD, R. J. Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) plants dependent on nitrate-nitrogen or on one of two strains of *Rhizobium*. *Trop. Agric., Trinidad*, 58(2):115-32, 1981.
- PACOKSKY, R.S.; BAYNE, M.G. & BETHLENFALVAY, G.J. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.*, 24:101-5, 1984.
- PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5:109-19, 1973.
- RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & SANFORD, P. Significance of hydrogen evolution in the carbon and nitrogen economy of nodulated cowpea. *Plant Physiol.*, 71:122-7, 1983.
- REINBOUHE, H. & MOTHES, K. Urea, ureides and guanidines in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 13: 129-50, 1962.
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. Dinitrogen fixation on pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by growth stage and temperature regime. *Can. J. Bot.*, 59(7): 1181-8, 1981.
- RUIZ-ARGUESO, T.; HANUS, J. & EVANS, H.J. Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.*, 116:113-8, 1978.
- RUIZ-ARGUESO, T.; MAIER, R.J. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution from alfalfa and clover nodules and hydrogen uptake by free-living *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(3):582-7, 1979.
- RUSCHEL, A.P. & REUSZNER, H.W. Desenvolvimento da nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em variedades de soja, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. *Pesq. agropec. bras. Sér. Agron.*, Rio de Janeiro, 8(8):251-6, 1973.
- RUSCHEL, A.P. & SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)). *R. bras. Ci. Solo*, 1:21-4, 1977.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T. & TULMAN NETO, A. Eficiência da inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. I. Efeito de fontes de nitrogênio e cultivares. *R. bras. Ci. Solo*, 3:13-7, 1979.
- SAITO, S.M.T.; CASSINI, S.T.A. & RUSCHEL, A.P. Determinação da eficiência de estirpes de *Rhizobium phaseoli* usando características culturais e em simbiose com *Phaseolus vulgaris* L. In: REUNIÃO LATINOAMERICANA DE RHIZOBIUM, 10., 1980. *Memorias ... Maracay, IAP, 1980a*. p.109-27.
- SAITO, S.M.T.; MATSUI, E. & SALATI, E. ¹⁵N₂ fixation, H₂ evolution and C₂H₂ reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 49:37-42, 1980b.
- SAITO, S.M.T.; ZAIA, V.M. & RUSCHEL, A.P. Efficiency of N₂ - fixation of *R. phaseoli* strains inoculated in the bean cultivar Venezuela - 350. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.*, 21:12-4, 1978.
- 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*, 73(4):1207-11, 1976.
- SCHUBERT, K.R. & RYLE, G.J.A. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated legumes. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A.H., ed. *Advances in legume science*. London, H.M.S.O., 1980. p.85-96.
- THOMAS, R.J.; MCFERSON, J.R.; SCHRADER, L.E. & BLISS, F.A. Composition of bleeding sap nitrogen from lines of field-grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 79:77-88, 1984.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. Review; ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry*, 20:361-71, 1981.
- VINCENT, J.M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 164p. (*Int. Biol. Program Handb.*, 15).
- WALKER, C. & YATES, M.G. The hydrogen cycle in nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. *Biochimie*, 60:225-31, 1978.
- ZABLOTOWICZ, R.M.; RUSSEL, S.A. & EVANS, H.J. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. *Agron. J.*, 72:555-64, 1980.