

MARIA AUXILIADORA FEIO GOMES

Professora Adjunta do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Pará

*Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida pela candidata MARIA AUXILIADORA  
FEIO GOMES e aprovada pela Comissão Julgadora  
25/03/87* 

INFLUÊNCIA DOS FRUTOS SOBRE A  
FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOJA  
(GLYCINE MAX L. MERRIL)  
CV, SANTA ROSA

Tese apresentada no Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas, para a  
obtenção do título de Doutor  
em Ciências na área de  
Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

CAMPINAS - SP

- 1987 -

À minha mãezinha ELISA e meu pai TEÓDULO (*in memoriam*),  
pelo amor, carinho e dedicação com que me encaminharam  
para a vida, minha

HOMENAGEM.

Aos meus pais Ubiratan (*in memoriam*) e Tecla,  
meus tios Hêlio e Aracy,  
Oneide,  
Selma e demais parentes,

DEDICO.

Ao meu marido José Maria, a quem com amor partilho  
essa vitória, pelo seu apoio e incentivo constante  
em todos os momentos, e as minhas filhas Ana Claudia  
e Ana Paula, para quem espero que a ciência possa  
no futuro, proporcionar uma vida cada vez melhor,

OFEREÇO.

## AGRADECIMENTOS

Na oportunidade em que encerro o presente trabalho, expresso os meus agradecimentos às seguintes pessoas e instituições:

Ao Professor Dr. Ladaslav Sodek, que com sua sabedoria e elevado espírito científico, soube transmitir confiança e ensinamentos do mais alto significado para minha vida na pesquisa científica e sobretudo pela grande amizade.

Ao Professor Dr. Antonio Celso Magalhães, pela amizade, disponibilidade constante e valiosas críticas e sugestões que enriqueceram sobremodo este trabalho.

Aos Professores Hilton Silveira Pinto e Maria de Fátima A. Pereira pela amizade, paciente revisão e sugestões apresentadas na fase da pré-banca.

Ao Professor Dr. João Paulo do Valle Mendes, pelo incentivo as minhas iniciativas profissionais e científicas e sobretudo pela amizade.

À Universidade Federal do Pará, através de seus dirigentes, pela oportunidade concedida para frequentar o curso de Pós-graduação.

À Universidade Estadual de Campinas pelos ensinamentos e oportunidade oferecida.

À Coordenadoria de aperfeiçoamento do pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização do curso.

À todos os Professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pelos valiosos ensinamentos transmitidos, apoio e amizade, que foram uma constante ao longo desses anos.

À todos os funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal por quem dispenso um carinho todo especial pela i nestimável ajuda, técnica e agradável convivência durante a realização desse trabalho.

À Esmê, pela amizade e carinhoso trabalho na confecção dos gráficos apresentados.

À amiga Sandra, pelo trabalho de datilografia.

À Jocely Maeda, pelas valiosas sugestões apresentadas.

À minha afilhada Valdinete pela ajuda e colaboração que prestou em casa.

Aos amigos, Enêas, Jocely, Sandra, Benedito, Ubiratan, Dora, Edinho, Adauto, Leandro, Paulinho, Douglas, Isabel, Beatriz, José Carlos, Áurea, Elbe, Kuniko, Paulo, Neide, Olinto, Wanda, Clara, Geni, Heitor, Doris, Lila, Bueno, Maria Helena, Thomaz e respectivas famílias pelo bom relacionamento, amizade e companheirismo que proporcionaram o marco inicial de uma profunda e eterna amizade.

Às Irmãs Franciscanas do Coração de Maria, pelo amor, ajuda e dedicação que sempre me dedicaram desde quando aqui cheguei.

Por fim agradeço a todos que, de modo direto ou indireto, contribuíram para a realização desse trabalho.

## ÍNDICE

|     |   |                                                                                                               |    |
|-----|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I   | - | INTRODUÇÃO .....                                                                                              | 1  |
| II  | - | MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                      | 12 |
|     |   | 1. Material vegetal e condições de cultivo .....                                                              | 12 |
|     |   | 2. Metodologia .....                                                                                          | 14 |
|     |   | 2.1. Atividade da enzima nitrogenase, utilizando-se os sistemas de plantas intactas e raízes destacadas ..... | 14 |
|     |   | 2.2. Medidas da redução de acetileno .....                                                                    | 14 |
|     |   | 2.2.1. Cálculo da taxa da redução de acetileno .....                                                          | 16 |
|     |   | 3. Medidas de peso fresco .....                                                                               | 18 |
|     |   | 4. Análise estatística .....                                                                                  | 18 |
|     |   | 5. Energia radiante .....                                                                                     | 19 |
| III | - | RESULTADOS .....                                                                                              | 21 |
|     |   | 1. Experimentos preliminares .....                                                                            | 21 |
|     |   | 1.1. Comparação entre o sistema intacto e destacado (vaso) .....                                              | 21 |
|     |   | 1.2. Comparação entre os sistemas intacto e destacado (frasco) .....                                          | 22 |
|     |   | 1.3. Comparação entre os sistemas destacado no vaso e destacado no frasco .....                               | 25 |
|     |   | 2. Tempo de reação .....                                                                                      | 27 |
|     |   | 3. Taxas da redução de acetileno com controle da floração .....                                               | 29 |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 3.1. Experimento 1 .....                     | 29 |
| 3.1.1. Peso fresco e número de nódulos ..... | 31 |
| 3.1.2. Comparação entre os sistemas in-      |    |
| tacto e destacado utilizando plan-           |    |
| tas do mesmo experimento .....               | 34 |
| 3.2. Experimento 2 .....                     | 36 |
| 3.3. Experimento 3 .....                     | 42 |
| 3.3.1. Pesos frescos e números de nódu-      |    |
| los .....                                    | 45 |
| a) Pesos frescos da parte aérea e            |    |
| da raiz .....                                | 46 |
| b) Número e peso fresco das vagens .....     | 49 |
| c) Números e peso fresco dos nód <u>u</u>    |    |
| los .....                                    | 49 |
| 3.4. Experimento 4 .....                     | 54 |
| IV - DISCUSSÃO .....                         | 58 |
| V - CONCLUSÕES .....                         | 67 |
| VI - RESUMO .....                            | 68 |
| VII - SUMMARY .....                          | 70 |
| VIII - BIBLIOGRAFIA .....                    | 72 |
| IX - APÊNDICE .....                          | 83 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|    |   |                                                                                                                                                                |    |
|----|---|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 01 | - | Ilustração dos sistemas utilizados para as medidas da redução de acetileno em plantas intactas de soja (A) e raízes destacadas (b) .....                       | 15 |
| 02 | - | Redução de acetileno (formação de etileno), em relação ao tempo de incubação da enzima nitrogenase, nos sistemas de plantas intactas e raízes destacadas ..... | 28 |
| 03 | - | Curva da redução de acetileno durante o ciclo da planta, comparando os sistemas de plantas intactas e raízes destacadas .....                                  | 30 |
| 04 | - | Medidas do peso fresco e número de nódulos do sistema de raízes destacadas .....                                                                               | 33 |
| 05 | - | Medidas da redução de acetileno com os sistemas de plantas intactas e raízes destacadas utilizando a mesma planta .....                                        | 35 |
| 06 | - | Medidas do peso fresco e do número de nódulos das plantas utilizadas nas medidas da redução de acetileno mostradas na Figura 05 .....                          | 37 |
| 07 | - | Taxa da redução de acetileno de plantas de soja induzidas a florescer nos estádios de desenvolvimento $V_2$ e $V_5$ .....                                      | 39 |
| 08 | - | Taxas da redução de acetileno durante todo o ciclo de plantas induzidas a florescer em diferentes estádios de desenvolvimento; $V_2$ , $V_3$ e $V_5$ .....     | 41 |

|    |   |                                                                                                                                                                                         |    |
|----|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 09 | - | Taxa da redução de acetileno durante o ciclo de plantas induzidas nos estádios de desenvolvimento $V_2$ e $V_5$ , sistema intacto .....                                                 | 43 |
| 10 | - | Taxas da redução de acetileno durante o ciclo de plantas induzidas nos estádios de desenvolvimento $V_2$ , $V_5$ de plantas intactas e $V_2$ e $V_5$ de raízes <u>des</u> tacadas ..... | 44 |
| 11 | - | Variações do peso fresco da raiz e da parte aérea durante o ciclo de plantas induzidas no estágio de desenvolvimento $V_2$ .....                                                        | 47 |
| 12 | - | Variações do peso fresco da raiz e parte aérea <u>du</u> rante o ciclo de plantas induzidas no estágio $V_5$ .....                                                                      | 48 |
| 13 | - | Medidas do peso fresco e do número de vagens de plantas com raízes destacadas no estágio de desen <u>vol</u> vimento $V_2$ .....                                                        | 50 |
| 14 | - | Medidas do peso fresco e do número de vagens de plantas com raízes destacadas no estágio de desen <u>vol</u> vimento $V_5$ .....                                                        | 51 |
| 15 | - | Medidas do peso fresco e do número de nódulos durante todo o ciclo de plantas induzidas no está <u>di</u> o $V_2$ . Floração aos 45 dias .....                                          | 52 |
| 16 | - | Medidas do peso fresco e do número de nódulos durante todo o ciclo de plantas induzidas no está <u>di</u> o $V_5$ . Floração aos 62 dias .....                                          | 53 |



|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 17 - Taxa da redução de acetileno no sistema de plantas intactas com 4 tratamentos: indução nos estádios de desenvolvimento $V_2$ , $V_5$ , plantas com flores removidas-F e plantas em dias longos durante todo o ciclo DL ..... | 56 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## ÍNDICE DE TABELAS

|    |   |                                                                                                                                            |    |
|----|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 01 | - | Quantidade relativa de acetileno de plantas mantidas no próprio vaso de cultivo .....                                                      | 17 |
| 02 | - | Valores de N em horas e $Q_0$ em $\text{cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ (15º dia do mês) para 22º Lat. Sul (VILLA NOVA, 1974) ..             | 20 |
| 03 | - | Medidas da redução de acetileno dos sistemas de plantas intactas e raízes destacadas. Número e peso dos nódulos do sistema destacado ..... | 24 |
| 04 | - | Medidas da redução de acetileno e número de nódulos do sistema de raízes destacadas no vaso e no frasco .....                              | 26 |
| 05 | - | Análise de variância dos dados do sistema intacto representado na Figura 03 .....                                                          | 32 |

## ÍNDICE DE TABELAS EM APÊNDICE

|    |   |                                                                                                                                      |    |
|----|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 01 | - | Dados climatológicos dos dias das medidas da redução de acetileno referentes à Figura 07 .....                                       | 84 |
| 02 | - | Dados climatológicos dos dias das medidas da redução de acetileno referentes à Figura 09 .....                                       | 85 |
| 03 | - | Dados climatológicos dos dias das medidas da redução de acetileno referentes à Figura 17 .....                                       | 86 |
| 04 | - | Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de soja <i>Glycine max</i> (L.) Merrill segundo FEHR <i>et al.</i> (1971) ..... | 87 |

## I - INTRODUÇÃO

Entre as plantas agriculturalmente importantes, que presentemente alimentam o mundo, destaca-se a soja como a mais importante oleaginosa em produção sob cultivo extensivo. A soja produz mais proteína por hectare que qualquer outra planta cultivada. As qualidades como fonte de calorias fazem desta leguminosa o alimento básico potencial na luta contra o espectro da fome, que já se vislumbra em certas áreas densamente populosas e menos desenvolvidas. Portanto, o desenvolvimento de novas áreas de produção e a difusão do consumo de soja podem ser fundamentais para o suprimento alimentar diário de grande parte da população nas diferentes latitudes (BONETTI, 1981).

Apesar da introdução da soja no Brasil datar do século passado, somente a partir de 1970 é que essa cultura ganhou grande impulso, com uma produção atualmente de dez milhões de toneladas de grãos. Hoje a utilização da soja no Brasil concentra-se no óleo, margarina, torta e farelo. A pesquisa está procurando encontrar melhores opções para permitir um maior consumo, especialmente na alimentação humana. Assim, estão sendo desenvolvidos trabalhos no sentido de se encontrar as melhores cultivares para a fabricação de farinhas, extratos proteicos e consumo "in natura". Espera-se desse modo, melhorar a dieta alimentar de boa parte da população e aumentar a utilização da soja, criando no País um mercado capaz de absorver boa parcela da crescente produção brasileira (KASTER & BONATO, 1981). A espécie *Glycine max*, utilizada nesse trabalho, destaca-se pela sua importância em proporcionar alimento ao homem, com elevado valor nutricional em forma de proteína e óleo.

Durante a fase inicial de crescimento, as plantas necessitam de um abundante suprimento de compostos nitrogenados essenciais aos processos que resultam na síntese de proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos, nucleótides de piridina, etc. Essas substâncias são produzidas a partir da incorporação do nitrogênio inorgânico nos esqueletos de carbono resultantes do metabolismo dos carboidratos (MAGALHÃES, 1981).

Na soja, a fonte de nitrogênio orgânico para o desenvolvimento da plântula está contida, principalmente, nas reservas cotiledonares. A partir do momento em que o organismo se torna autotrófico pelo desenvolvimento do sistema fotossintético, a síntese dos compostos nitrogenados passa a depender da absorção e assimilação do nitrogênio mineral contido no solo. Somente mais tarde, devido o estabelecimento da simbiose com as bactérias fixadoras do nitrogênio do ar, as plantas passam a depender progressivamente menos do nitrogênio dissolvido, que até então era absorvido pelas raízes (MAGALHÃES, 1981).

Dentre as plantas cultivadas, o sistema simbiótico *Rhizobium leguminosae* é o que mais benefícios diretos tem trazido ao homem, pois além de dispensar a aplicação de fertilizantes nitrogenados, constitui o meio mais econômico e promisor para a obtenção de alimentos ricos em proteínas. A importância do nitrogênio como precursor de proteínas e a alta demanda de alimentos associados à escassez mundial daquele nutriente, enfatizam a importância de melhor aproveitamento da fixação simbiótica. Como se sabe, atualmente o mundo vem enfrentando séria crise de energia resultante do aumento excessivo do preço do petróleo, matéria-prima principal para a obtenção de hidrogênio a ser utilizado na formação da amônia pes

la fixação química do  $N_2$ . Por isso, a fixação biológica do di-nitrogênio constitui uma das principais linhas de pesquisa com o objetivo de aumentar a retenção de nitrogênio no solo em formas orgânicas complexas, com a liberação lenta e contínua de nitratos pela nitrificação (FREIRE & VIDOR, 1981). No caso da soja, existem evidências de que a fixação pode suprir 70% ou mais da sua necessidade total de nitrogênio para produção em níveis satisfatórios (LOPES & GIARDINI, 1981).

Vários fatores podem limitar a fixação de nitrogênio em vários níveis de organização da planta, tais como os fatores ambientais: água, luz,  $O_2$  no solo, temperatura, pH do solo e elementos minerais (fosfato, cálcio, etc.) (LAWRENCE, 1980). Muitas leguminosas são sensíveis ao efeito da temperatura na nodulação e fixação de nitrogênio; particularmente no caso da soja (*Glycine max* (L) Merrill), a temperatura tem efeitos na raiz, crescimento da planta e nodulação, limitando assim a fixação de nitrogênio (ROUGHLEY, 1970; GIBSON, 1971; MINCHIN *et al.*, 1976; BALANDREAU & DURCEF, 1980). TRANG & GIDDENS (1980) verificaram que a fixação simbiótica de  $N_2$  em leguminosas depende essencialmente da planta hospedeira e da linhagem de *Rhizobium* associado, onde ambos estão sujeitos a variações genéticas e influências ambientais. A quantidade de nitrogênio fixada simbioticamente seria portanto variável de acordo com o crescimento e condições da planta. Embora o interesse primário do agricultor seja a simbiose da leguminosa com o *Rhizobium*, o estudo da fixação de  $N_2$  a nível molecular tem sido feito mais com bactérias fixadoras tipo *Azobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, etc., uma vez que as enzimas para todas as fontes são muito similares e acredita-se que as

enzimas do *Rhizobium* respondam aos controles do mesmo modo (LAWRENCE, 1980).

A resposta da planta de soja para o nitrogênio é confundida pela habilidade da planta em utilizar tanto  $\text{NO}_3^-$  como o  $\text{N}_2$ . O nitrato é considerado a fonte primária de nitrogênio disponível para o solo. A absorção do nitrato, e subsequente redução pela redutase de nitrato, é o caminho primário da utilização do nitrato do solo (HARPER & HAGMAN, 1972). A utilização do  $\text{N}_2$  através da relação simbiótica com o *Rhizobium japonicum* é o segundo caminho mais utilizado de entrada do nitrogênio em plantas de soja. O processo de fixação nessas plantas, normalmente, é iniciado 20 a 30 dias após o plantio (HARDY *et al.*, 1971).

A fixação biológica do nitrogênio é um processo que se caracteriza por uma alta demanda de energia, em geral superior a 12 moléculas de ATP por molécula de  $\text{N}_2$  reduzida (DIXON, 1975; YATES & EADY, 1980), bem como de elétrons resultantes da oxidação dos fotoassimilados da planta hospedeira (HARDY & HAVELKA, 1976). A disponibilidade de fotoassimilados nos nódulos é um fator imprescindível para que ocorra a fixação de  $\text{N}_2$  pelos sistemas simbióticos (QUISPEL, 1974; HARDY & HAVELKA, 1976). Consequentemente, pode haver um consumo pelos nódulos de até 30% dos fotossintatos produzidos pela planta e, se a simbiose não for eficiente, haverá redução do potencial de produção das leguminosas (SCHUBERT & RYLE, 1980).

Existem muitas evidências na literatura que demonstram uma relação estreita entre a atividade da nitrogenase e a fotossíntese, principalmente em estudos onde foram efetuadas manipulações da taxa de fotossíntese ou a translocação de fo-

tossintatos, ocorrendo mudanças paralelas na atividade da nitrogenase. Tratamentos que ocasionam decréscimo na fotossíntese causam diminuição da taxa de fixação de nitrogênio. LAWN & BRUN (1974) demonstraram tal relação em soja com o desfolhamento parcial das plantas. BETHLENFALVAY *et al.* (1979) verificaram também esse fenômeno após pulverizar as folhas com Bentazon, um inibidor da reação de Hill. Da mesma forma, quando a translocação de fotossintatos para os nódulos é impedida pelo anelamento (LAWN & BRUN, 1974), ou diminuída através de um estresse hídrico (SPRENT, 1972), há um decréscimo substancial na fixação de nitrogênio. LAWN & BRUN (1974) constataram um decréscimo superior a 50% na atividade da nitrogenase em soja, apenas duas horas após o anelamento. A redução parcial ou total do nível de luminosidade reduz o peso dos nódulos, a atividade da nitrogenase, a concentração de nitrogênio total da planta, teor de sacarose e nível de ATP nos nódulos (ROCHA *et al.*, 1970; CHING *et al.*, 1975; BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1977; ANTONIW & SPRENT, 1978). A retirada das folhas tem efeito semelhante ao da redução da luminosidade (MOUSTAFFA *et al.*, 1969; PANDEY, 1983; PATTERSON & LA RUE, 1983). Por outro lado, tratamentos que aumentam a fotossíntese promovem a fixação de nitrogênio. O cultivo de soja num ambiente mais rico em CO<sub>2</sub> ocasiona aumento substancial na fixação de nitrogênio (HARDY & HAVELKA, 1975); aumentos da intensidade luminosa também tem efeito semelhante (LAWN & BRUN, 1974; HARDY & HAVELKA, 1976). Queda na taxa de fotorrespiração através da diminuição da pressão parcial de oxigênio também favorece a fixação de nitrogênio em soja (QUEBEDEAUX *et al.*, 1975). Através da técnica de enxertia, STREETER (1974) conseguiu aumentar a fotossíntese total em plantas de soja, com o aumento da par



te aérea da planta enxertada, o que ocasionou aumento na atividade da enzima nitrogenase. HARDY *et al.* (1968) verificaram que em soja, há uma relação direta entre intensidade luminosa e a fixação de  $N_2$ . Para esses autores, a disponibilidade de fotoassimilados às plantas, atua indiretamente no aumento da atividade dos nódulos ao promoverem o seu crescimento em geral. Entretanto, WHEELER (1971), HAM *et al.*, (1976), CRALLE & HEICHEL (1981) sugerem em seus trabalhos que a atividade da enzima nitrogenase aumenta quando se eleva a razão "fonte-dreno", e que decresce quando esta razão é diminuída. WHEELER (1971) observou uma queda em torno de 50% na atividade dessa mesma enzima em *Alnus*, quando o fluxo de fotoassimilados foi interrompido pelo anelamento do caule. HAM *et al.*, (1976) também observaram queda na atividade da nitrogenase quando submeteram plantas de soja ao sombreamento ou ao desfolhamento. CRALLE & HEICHEL (1981), promoveram o desfolhamento em *Medicago sativa* e *Lotus corniculatus*, e obtiveram os mesmos resultados encontrados para soja com o desfolhamento. Entretanto, nesse caso, a queda na atividade ocorreu dois dias após o desfolhamento com subsequente recuperação 10 a 21 dias após, quando o crescimento vegetativo foi reiniciado. Aqueles autores observaram ainda, que a recuperação da atividade foi mais rápida nas plantas com menor número de folhas removidas.

A quantidade de  $N_2$  fixada pela simbiose com o *Rhizobium* é de interesse fundamentalmente prático no cultivo da soja, para o aumento da disponibilidade de nitrogênio na agricultura. Essa quantidade pode ser medida pela atividade da enzima nitrogenase através da técnica de redução de acetileno (HARDY *et al.*, 1968). Através da utilização dessa técnica,

foi verificado que a fixação de  $N_2$  é iniciada logo após a nodulação, geralmente em torno de 20 a 30 dias após o plantio. A atividade aumenta substancialmente durante o desenvolvimento da planta, atingindo seu ponto máximo durante a fase reprodutiva logo após a floração (THIBODEAU & JAWORSKI, 1975). Em seguida ocorre uma queda acentuada na atividade, chegando a zero por volta do final do ciclo da planta. Portanto, existem duas fases bem distintas na curva de atividade enzimática associadas ao desenvolvimento reprodutivo da soja, e de outras leguminosas; uma é o aumento da atividade logo após a floração, e a outra é a queda que vem a seguir.

Em muitas leguminosas agriculturalmente importantes, a taxa de fixação de nitrogênio aumenta marcadamente na fase próxima da floração, diminuindo rapidamente em seguida durante o período de crescimento da semente (PEAT *et al.*, 1981). Entretanto, a causa do aumento da fixação próximo do momento da floração não é conhecida em leguminosas de pastagens, apesar desse fenômeno ser generalizado; o mesmo foi constatado em ervilha (*Pisum sativum*), Cowpea (*Vigna unguiculata*), Soja (*Glycine max*), amendoim (*Arachis hypogea*), fava (*Vicia faba*), trevo (*Trifolium repens*) e *Medicago sativa*, (HARDY *et al.*, 1971; LAWN & BRUN, 1974; BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1975; MASTERSON & MURPHY, 1976; MINCHIN & SUMMERFIELD, 1978).

LAWRIE & WHEELER (1974); PEAT *et al.*, (1981) verificaram que alguns fatores associados com a presença de estruturas reprodutivas, particularmente o botão floral, pode promover a fixação de nitrogênio no início da fase reprodutiva, apesar do fato de que a semente, durante seu rápido crescimento, pode competir sucessivamente com os nódulos e raízes pe-

los fotossintatos, resultando na queda da taxa de fixação. O fato da fixação de nitrogênio diminuir quando as estruturas reprodutivas da planta são removidas, sugere que o estímulo da floração não é o responsável pelo aumento da fixação durante essa fase, pois se assim fosse, a remoção das partes reprodutivas teria apresentado pouco ou nenhum efeito. LAWRIE & WHEELER, (1974) observaram em ervilha que a remoção das flores causou a queda na atividade da enzima nitrogenase e induziu um crescimento vegetativo anormal. HARDY *et al.*, (1968) encontraram que a remoção dos frutos jovens em soja ocasionou a queda inicial da fixação acompanhada da parada no crescimento dos nódulos.

A quantidade de  $N_2$  fixada, medida através da atividade da nitrogenase, e a duração de cada fase sazonal pode variar com espécies de leguminosas, cultivar, linhagem de *Rhizobium* e condições ambientais. Por exemplo, a remoção de botões florais ou vagens durante o crescimento vegetativo causa redução do crescimento da parte aérea e da raiz proporcionalmente, induzindo um aumento específico no peso da folha e da área foliar também de forma proporcional. Esse fato pode ser devido à ausência de drenos reprodutivos para fotossintatos. Isso é visto como sendo causado provavelmente pelo atraso na elongação do caule em termos de comprimento de internós no número de nós, e produção de ramos. Possivelmente, hormônios vegetais estejam envolvidos em ambos fenômenos, o que pode explicar o rápido aumento na taxa de fixação de nitrogênio próximo da floração que estaria de acordo com as conclusões gerais de outros trabalhos com soja (BETHLENFALVAY *et al.*, 1978) e com outras espécies de leguminosas. (PATE, 1966; LAWRIE & WHEELER, 1974).

Vários autores (LAWN & BRUN, 1974; LAWRIE & WHEELER, 1974; THIBODEAU & JAWORSKI, 1975; GIBSON, 1977; BAIRD & WEBSTER, 1982), sugerem que a possível explicação para a queda da atividade dos nódulos no estágio reprodutivo estaria no suprimento de fotoassimilados aos mesmos, o que é limitado pela competição dos frutos e sementes em desenvolvimento. Essa hipótese baseia-se na existência de forte correlação que existe entre a disponibilidade de fotossintatos e a taxa de fixação de nitrogênio (discutida acima), ligada ao fato de que existe uma coincidência entre o preenchimento do grão e a queda da atividade da nitrogenase. Além do mais, a retirada dos frutos atrasou a queda da atividade dos nódulos como verificada por LAWN & BRUN, 1974; HAM *et al.*, 1976; BETHLENFALVAY *et al.*, 1978, o que representou uma evidência mais direta para a hipótese. Portanto, o desvio de fotoassimilados para os frutos pode estar de acordo com esses autores, quanto ao motivo principal para a queda na atividade da nitrogenase. MORRIS (1982), entretanto, sugere que a utilização de assimilados nas plantas é regulada por hormônios e propõe que a taxa de importação de assimilados em direção aos drenos é dependente da concentração de sacarose nesses tecidos, cujo controle é feito pela invertase. Os níveis dessa enzima, por sua vez, são controlados por hormônios, que no caso específico de *Phaseolus vulgaris* parece ser o ácido indol acético, sugerindo assim, que o efeito dos hormônios sobre a importação de assimilados pelos drenos pode ser mediado por essa enzima.

A literatura mostra que existem muitas evidências a favor e contra a hipótese de competição pelos fotossintatos. Por exemplo, manipulações visando alterações das fontes e dre

nos têm fornecido evidências a favor, enquanto fatores moduladores da atividade da nitrogenase têm contrariado a hipótese. A intensidade luminosa pode afetar tanto o crescimento quanto a fixação de nitrogênio em leguminosas, fato esse relacionado com o fornecimento de fotossintatos para os nódulos (GIBSON, 1971; HARDY & HAVELKA, 1975; BETHLENFALVAY *et al.*, 1977; LATIMORE *et al.*, 1977; WASHUA & MILLER, 1978). Por outro lado, há experimentos em que a fixação biológica de nitrogênio não foi prejudicada com a redução do nível de luminosidade (SPRENT & BRADFORD, 1976; WASHUA & MILLER, 1978; SCHWEITZER & HARPER, 1980) ou pela retirada parcial das folhas (CHU & ROBERTSON, 1974; TEIGEN & VORST, 1975; SHELDRAKE & NARAYANAN, 1976). Do mesmo modo a retirada das flores e vagens pode não levar necessariamente ao incremento na atividade da nitrogenase e N total das plantas (BRUN, 1976; NDUNGURU *et al.*, 1976; WILSON *et al.*, 1978; MALIK, 1983; RIGGLE *et al.*, 1984).

Como pode ser observado através da literatura acima citada, há evidências contraditórias quanto à hipótese de competição pelos fotossintatos entre frutos e nódulos, para explicar a queda na atividade da nitrogenase. Há grande interesse em se conhecer os mecanismos para essa queda, uma vez que pode ser um fator limitante na produção de grãos (MALIK, 1983). De fato, ABU-SHAKRA *et al.* (1978) demonstraram que mutantes de soja com senescência foliar atrasada (folhas ainda verdes quando os frutos atingiram a maturidade) apresentaram alta atividade da nitrogenase durante toda fase de enchimento dos grãos, sugerindo que tal característica poderia aumentar o rendimento da cultura.

A soja é uma planta que floresce em dias curtos

(KARL, 1969). O cultivar Santa Rosa utilizada nesse trabalho floresce aos 32 dias, após a exposição da planta a 4 ciclos de fotoperíodo de 9 horas durante a fase inicial do crescimento (MIRANDA & SODEK, 1982). A curta duração da indução evita confundir efeitos da floração com efeitos sobre a fotossíntese em diferentes tratamentos, onde um tratamento prolongado em dias curtos implica numa redução da capacidade fotossintética da planta

O objetivo desse trabalho foi averiguar se a queda da atividade da nitrogenase em soja está relacionada com uma competição pelos fotossintatos entre frutos e nódulos. Para essa averiguação foram comparadas atividades da enzima nitrogenase em plantas de diferentes idades quando induzidas a florescer.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Material vegetal e condições de cultivo

Para a realização desse trabalho foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max*(L.) Merrill) cv. Santa Rosa, fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). As sementes passaram por um exame de pureza, foram lavadas em água destilada durante 3 minutos; aquelas puras foram colocadas para germinar em vasos de plástico com capacidade de 3 litros, colocando-se 4 sementes por vaso. Como substrato foi utilizada vermiculita intensivamente lavada para evitar qualquer contaminação. Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento  $V_0$  (escala de FEHR *et al.*, 1971 - ver apêndice), foi feito o desbaste ficando uma planta em cada vaso. Para a obtenção de plantas noduladas foi feita a inoculação de cada planta, ainda no estágio  $V_0$ , com 2 ml de uma suspensão de *Rhizobium japonicum* estirpe SMS-463, fornecida pela Seção de Microbiologia do Solo do IAC. Após a inoculação iniciou-se o tratamento com solução nutritiva deficiente em nitrogênio, preparada como descrita a seguir:

#### MACRONUTRIENTES

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 1mM |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$  | 2mM |
| $\text{MgSO}_4$          | 2mM |
| $\text{CaSO}_4$          | 2mM |

#### MICRONUTRIENTES

|                                                   |           |
|---------------------------------------------------|-----------|
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                           | 2860 mg/l |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$         | 1810 mg/l |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$         | 220 mg/l  |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$         | 80 mg/l   |
| $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 20 mg/l   |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$         | 29,4 mg/l |
| + $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_3$                 | 33,2 mg/l |

As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com adição duas vezes por semana de 200 ml de solução nutritiva em cada vaso. A irrigação com água foi feita de acordo com a necessidade da planta.

Vários experimentos foram instalados para a realização desse trabalho, os quais constaram dos seguintes tratamentos: plantas induzidas a florescer nos estádios de desenvolvimento  $V_2$ ,  $V_5$  e  $V_8$  aplicando-se fotoperíodos curtos de 9 horas durante 4 dias. Dentro do grupo de plantas induzidas a florescer no estágio  $V_2$ , foram incluídos tratamentos para destacar os botões florais e para destacar 50% das folhas alternadamente. Outro tratamento foi destinado a manter as plantas em dias longos durante todo o seu ciclo. Além do controle da floração, a aplicação de fotoperíodos curtos leva a obtenção de plantas de pequeno porte, bastante uniformes. Após o período de indução as plantas foram utilizadas para as devidas avaliações.

Um controle fitossanitário foi efetuado a cada 15 dias com pulverizações utilizando as soluções de Decis (0,3 ml/l) e Ostation (0,5 ml/l).

Os três principais experimentos foram montados nas seguintes épocas: o primeiro no dia 10 de setembro de 1984, o segundo no dia 22 de fevereiro de 1985 e o terceiro no dia 30 de setembro de 1985. As condições climáticas registradas pelo IAC nessas épocas, estão representadas em tabelas no apêndice.



## 2. Metodologia

### 2.1. Atividade da enzima nitrogenase, utilizando os sistemas de plantas intactas e raízes destacadas

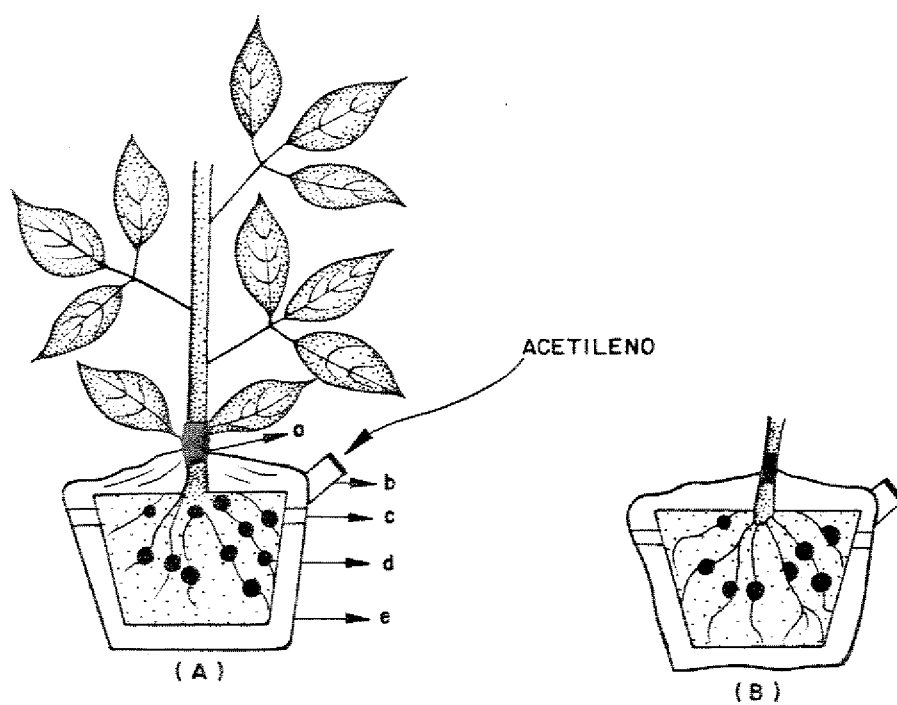
A enzima Nitrogenase, responsável pela redução do nitrogênio atmosférico à amônia, também cataliza a redução do acetileno a etileno. Para avaliar a fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de soja foi utilizada a técnica de redução de acetileno (HARDY *et al.*, 1968). Essa técnica é apoiada na hipótese de que a atividade da nitrogenase não é afetada pela alteração do substrato, ou pela alteração do produto final (HARDY *et al.*, 1968). Para o uso dessa metodologia foi exigido que o sistema fosse hermeticamente fechado, portanto, foram vedados os furos dos vasos (saída de água) com fita crepe, envolvidos em sacos de plástico transparente, protegidos em volta do caule com massa de modelar, e fechado com elâstico firmemente apertado próximo às folhas cotiledonares. Essa técnica foi utilizada para os dois sistemas, plantas intactas e raízes destacadas (Figura 1, A e B). As medidas para plantas intactas foram realizadas sempre com as mesmas plantas durante todo o desenvolvimento, enquanto que, para o sistema de raízes destacadas, foram utilizadas plantas novas a cada medida devido ao fato de que a parte aérea dessas era seccionada.

### 2.2. Medidas da redução de acetileno

As medidas de redução de acetileno foram iniciadas com a retirada de 80 ml de ar de cada vaso e injetado o mesmo volume do gás nos mesmos. Após um período de incubação de 10 minutos, foram iniciadas as medidas que se prolongaram por 2 horas.

FIGURA 01 - Ilustração dos sistemas utilizados para as medidas da redução de acetileno em plantas intactas de soja (A) e em raízes destacadas (B).

- a - massa de modelar;
- b - borracha para injetar acetileno;
- c - fita crepe;
- d - saco de polietileno;
- e - furos do vaso vedados com fita crepe.



Nos primeiros 30 minutos eram feitas medidas de 10 em 10 minutos, e, em seguida de 30 em 30 minutos até o tempo final (2 horas). As alíquotas analisadas eram de 0,5 ml retiradas da atmosfera do vaso com o auxílio de uma seringa de 1 ml através de uma borracha firmemente aderida no saco plástico (Figura 01), e injetadas no cromatógrafo a gás para a determinação do etileno produzido. Todas as medidas foram acompanhadas do padrão de etileno e acetileno. O cromatógrafo a gás utilizado foi da marca Varian, modelo 2240-D equipado com uma coluna de Poropak N, de 1m x 0,2 cm (d.i). O forno do aparelho foi mantido a 110°C, o injetor a 140°C e detector (tipo Ionização de chama) a 150°C. Os fluxos dos gases foram os seguintes: N<sub>2</sub> (gás de arraste), 40 ml/min.; H<sub>2</sub> 40 ml/min. e ar 1600 ml/min.. O tempo de retenção situou-se entre 35 a 40 segundos para a saída de etileno e de 50 a 55 segundos para a saída de acetileno. A saída dos dois compostos foi registrada em forma de picos num registrador ajustado para receber sinais na faixa de 0 a 1 mV.

#### 2.2.1. Cálculo da taxa da redução de acetileno

O pico registrado para acetileno foi utilizado como um padrão interno, uma vez que a concentração desse gás dentro do vaso diminuiu de forma insignificante durante a incubação (Tabela 01). Dessa forma, a quantidade de gás registrada pelo cromatógrafo, serviu para acusar eventuais vazamentos do vaso, além de verificar variações no volume exato da amostra injetada para análise no cromatógrafo, permitindo que os picos de etileno pudessem ser corrigidos para um volume fixo de injeção. A análise de uma quantidade padrão de etileno permitiu transformar os dados (altura dos picos) em  $\mu$ moles de acetileno reduzido através do cálculo, segundo GOMES (1982), como

TABELA 01 - Quantidade relativa de acetileno de plantas mantidas no próprio vaso de cultivos.

| Tempo de<br>exposição | Plantas<br>Intactas | Raízes<br>Destacadas |
|-----------------------|---------------------|----------------------|
| min.                  | % acetileno         | % acetileno          |
| 30                    | 100                 | 100                  |
| 60                    | 81,2                | 85,7                 |
| 90                    | 75                  | 114,2                |
| 120                   | 81,2                | 100                  |
| 150                   | 62,5                | 85,7                 |
| 180                   | 87,5                | 85,7                 |
| 210                   | 81,2                | 78,5                 |
| 240                   | 58,5                | 100                  |

mostrado a seguir:

$$Z = 11,15 \cdot \frac{X}{Y} \cdot \frac{\text{Vol. ensaio}}{0,5 \text{ ml (Vol.injetado)}} \cdot \frac{60}{T} \cdot \frac{1}{1000}$$

onde:

Z = valor do acetileno reduzido em  $\mu\text{moles.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$

X = altura do pico de etileno da amostra (corrigida conforme explicação acima).

Y = altura do pico de etileno padrão, sendo que, 0,5 ml de etileno padrão preparado a 500 ppm contém 11,15 nmoles.

T = tempo de incubação em minutos

### 3. Medidas de peso fresco

Em alguns experimentos realizados com sistema de raízes destacadas, foram feitas medidas da atividade enzimática acompanhadas das medidas do peso fresco da parte aérea, dos nódulos e do sistema radicular de cada planta. Os nódulos foram separados manualmente após a remoção do excesso de vermiculita do sistema radicular e lavados em água corrente para retirar a vermiculita aderida.

### 4. Análise estatística

Para comparar o efeito da floração na fixação de nitrogênio foram realizados diferentes tratamentos de indução (controle do fotoperíodo) em plantas de soja mantidas intactas. Os dados foram analisados através de análise da variância e quando o valor "F" foi significativo, os valores foram comparados entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (SNEDECOR, 1965). Foram determinados os valores da diferença mínima significativa (DMS) para alguns pontos da curva de a

tividade da enzima nitrogenase. Nos gráficos, a representação dos valores foi feita através de barras verticais ou separadamente em tabelas.

##### 5. Energia radiante

Os cálculos para energia radiante, foram feitos segundo OMETTO (1968), como mostrados a seguir:

Para PRIMAVERA-VERÃO

$$Q_1 = Q_0 \left( 0,25 + 0,5 \frac{n}{N} \right)$$

Para OUTONO-INVERNO

$$Q_1 = Q_0 \left( 0,28 + 0,51 \frac{n}{N} \right)$$

onde:

$Q_1$  = Radiação global em  $\text{cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$

$Q_0$  = Radiação no "topo" da atmosfera em  $\text{cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$

$n$  = Número real de horas de insolação

$N$  = Número possível de horas de insolação

Os valores de  $N$  e  $Q_0$  foram extraídos da Tabela 02 e o valor de  $Q_1$  foi corrigido para a estufa, considerando uma transparência de 68% determinada através do ~~radiômetro~~ <sup>radiômetro</sup> (VILLA NOVA, 1974).

TABELA 02 - Valores de N em horas e  $Q_0$  em  $\text{cal.cm}^2.\text{dia}^{-1}$  (15º dia do mês) para 22° Lat. Sul.  
(VILLA NOVA, 1974).

| MESES | J    | F    | M    | A    | M    | J    | J    | A    | S    | O    | N    | D    |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| N     | 13,4 | 12,8 | 12,2 | 11,6 | 11,1 | 10,8 | 10,9 | 11,3 | 12,0 | 12,6 | 13,2 | 13,5 |
| $Q_0$ | 991  | 932  | 826  | 702  | 590  | 543  | 572  | 661  | 791  | 897  | 968  | 991  |



### III - RESULTADOS

#### 1. Experimentos preliminares

Inicialmente vários experimentos foram montados com a finalidade de se verificar as condições apropriadas para o uso da técnica de redução de acetileno com o sistema de plantas intactas. Para o uso dessa técnica, era essencial que o sistema fosse hermeticamente fechado para evitar possíveis vazamentos do gás. O uso de raízes destacadas em frascos de vidro é uma técnica bastante conhecida e usada nas medidas de redução de acetileno, devido à facilidade de vedar o sistema com o uso de tampas de borracha. Entretanto, o uso do sistema de raízes destacadas nas medidas de redução de acetileno apresenta a desvantagem que a planta é destruída após a medição, enquanto que o uso do sistema intacto permite fazer medidas de avaliação da fixação de nitrogênio durante todo o ciclo da planta, sempre utilizando o mesmo material vegetal. O maior problema com o sistema intacto foi conseguir total vedação em torno do caule da planta; para tanto, o vaso foi envolvido em saco plástico e fechado em torno do caule com massa de modelar e elástico (ver descrição em material e métodos, página 14).

##### 1.1. Comparação entre o sistema intacto e destacado (vaso)

Para verificar a eficiência do sistema intacto, foi feita uma medida de redução de acetileno comparada com a medida feita com o sistema de raízes destacadas, montado no próprio vaso de cultivo, o que tornou desnecessária a manipulação com o sistema radicular. As taxas de redução de acetileno obti-

das dessas medidas foram  $58,4 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$  para plantas intactas e  $30,7 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$  para raízes destacadas. A maior atividade obtida no sistema intacto, já era uma indicação que não havia ocorrido problemas de vazamentos. Uma avaliação mais direta da ocorrência ou não de vazamento pode ser efetivada pelas variações no teor de acetileno no vaso, analisado junto com etileno no cromatógrafo a gás. Como foi observado na Tabela 01, a técnica de vedação dos sistemas aparentemente foi adequado, uma vez que a quantidade relativa de acetileno não caiu de maneira progressiva, ocorrendo apenas oscilações normais decorrentes da impossibilidade de injetar volumes constantes no cromatógrafo.

#### 1.2. Comparação entre os sistemas intacto e destacado (frasco)

No experimento anterior as comparações das medidas de redução de acetileno nos dois sistemas foram realizadas com plantas diferentes. Embora o sistema intacto tenha fornecido valores um pouco mais altos que o sistema destacado, essa diferença pode ser devida a variações entre plantas e não à técnica propriamente. O objetivo desse experimento foi averiguar tal fato, utilizando a mesma planta para os dois sistemas em dias diferentes sendo que, para destacado foi utilizado o tradicional frasco de vidro. Foram feitas quatro repetições para plantas intactas no vaso, e no dia seguinte, foram utilizadas essas mesmas plantas para medidas com o sistema de raízes destacadas. As medidas do sistema de plantas intactas foram realizadas no dia 15 de fevereiro de 1984 (temperatura média do ar de  $25,7^{\circ}\text{C}$ ) e no dia seguinte foram efetuadas as medidas do sistema de raízes destacadas (temperatura média do ar de

25,8°C). Como pôde ser observado, a temperatura não variou nos dois dias das medidas.

Os resultados de atividade enzimática desse experimento e as medidas de peso fresco e número de nódulos, estão apresentados na Tabela 03. As medidas realizadas nos frascos de vidro apresentaram resultados inferiores comparadas com as do sistema intacto. Isso sugeriu que o manuseio com o sistema radicular para acomodá-lo no interior do frasco foi de alguma forma prejudicial. Os resultados do próximo experimento confirmaram tal observação.

Quanto ao número e peso fresco dos nódulos, foi verificado que a variação desses parâmetros entre as 4 repetições em geral não acompanhou as atividades de redução de acetileno para nenhum dos sistemas. Em alguns casos foram verificados valores mais baixos de redução de acetileno, assim como do número de nódulos e do peso fresco dos mesmos (repetição C). As repetições A e D apresentaram valores de peso e número de nódulos, invertidos quando comparados com as medidas de atividades de redução de acetileno. A semelhança na sequência de valores para as quatro repetições quanto ao número e peso dos nódulos com as atividades de redução de acetileno sugeriu que esses parâmetros estão relacionados. Por outro lado, a sequência de valores de redução de acetileno para as quatro repetições do sistema intacto pareceu não corresponder com a sequência de valores do sistema destacado e, consequentemente, com nenhum dos parâmetros de peso e número de nódulos. Isso pode significar que as operações de manuseio mencionadas acima foram mais prejudiciais em algumas repetições do que em outras, alterando consequentemente a sequência de va

TABELA 03 - Medidas da redução de acetileno dos sistemas de plantas intactas e raízes destacadas. Número e peso fresco dos nódulos do sistema destacado.

| IDENTIFICAÇÃO<br>DAS REPETIÇÕES | PLANTAS INTACTAS<br>$\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$ | RAÍZES DESTACADAS<br>$\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$ | NÓDULOS<br>Nº | PESO FRESCO<br>DOS NÓDULOS<br>g |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------|
| A                               | 103,6                                                         | 59,7                                                           | 318           | 6,22                            |
| B                               | 113,6                                                         | 50,1                                                           | 265           | 5,74                            |
| C                               | 125,6                                                         | 42,9                                                           | 240           | 5,52                            |
| D                               | 165,4                                                         | 63,4                                                           | 280           | 5,75                            |
| Média                           | 127,0                                                         | 54                                                             | 275,7         | 5,80                            |

lores entre as repetições.

### 1.3. Comparação entre os sistemas destacado no vaso e destacado no frasco

Os principais objetivos desse experimento foram: verificar se a presença da vermiculita no sistema destacado no vaso impedia a difusão do gás acetileno até o sistema radicular e se o manuseio com o sistema radicular afetava a atividade dos nódulos conforme discutido acima. Foi feita também contagem dos nódulos.

Os resultados dessas medidas estão na Tabela 04. Como pode ser observado pela média dos valores, o sistema destacado no vaso apresentou atividade mais alta que o sistema destacado no frasco. O número de nódulos também foi ligeiramente mais alto para o sistema destacado no vaso embora essa diferença não tenha sido significativa, evidenciando assim que, a atividade mais baixa do sistema destacado no frasco aparentemente não foi devida à perda de nódulos. Entretanto, para efetuar a contagem dos nódulos o sistema radicular foi primeiramente manipulado para ser retirado o excesso de vermiculita, da mesma forma como foi preparado para ser colocado no frasco para as medidas de redução de acetileno com esse sistema, o que tornou possível a queda e perda de alguns nódulos junto com a vermiculita. Infelizmente, não foi possível constatar isso nesse experimento mas apenas que a manipulação do sistema radicular, foi de alguma forma prejudicial.

Quanto à difusão do gás acetileno através da vermiculita, esta ocorreu de forma normal, uma vez que as atividades não foram prejudicadas; pelo contrário, foram mais altas

TABELA 04 - Medidas da redução de acetileno e número de nódulos do sistema de raízes destacadas no vaso e no frasco.

| IDENTIFICAÇÃO<br>DAS REPETIÇÕES | SISTEMA DESTACADO                         |        | NÓDULOS |        |
|---------------------------------|-------------------------------------------|--------|---------|--------|
|                                 | VASO                                      | FRASCO | VASO    | FRASCO |
|                                 | $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$ |        | Nº      |        |
| A                               | 57,7                                      | 37,1   | 180     | 158    |
| B                               | 37,6                                      | 36,5   | 120     | 145    |
| C                               | 62,2                                      | 30,5   | 260     | 206    |
| Média                           | 52,5                                      | 34,7   | 188,6   | 169,6  |
| SE <sup>(1)</sup>               | 7,57                                      | 2,1    | 49,59   | 18,57  |

(1). Erro padrão

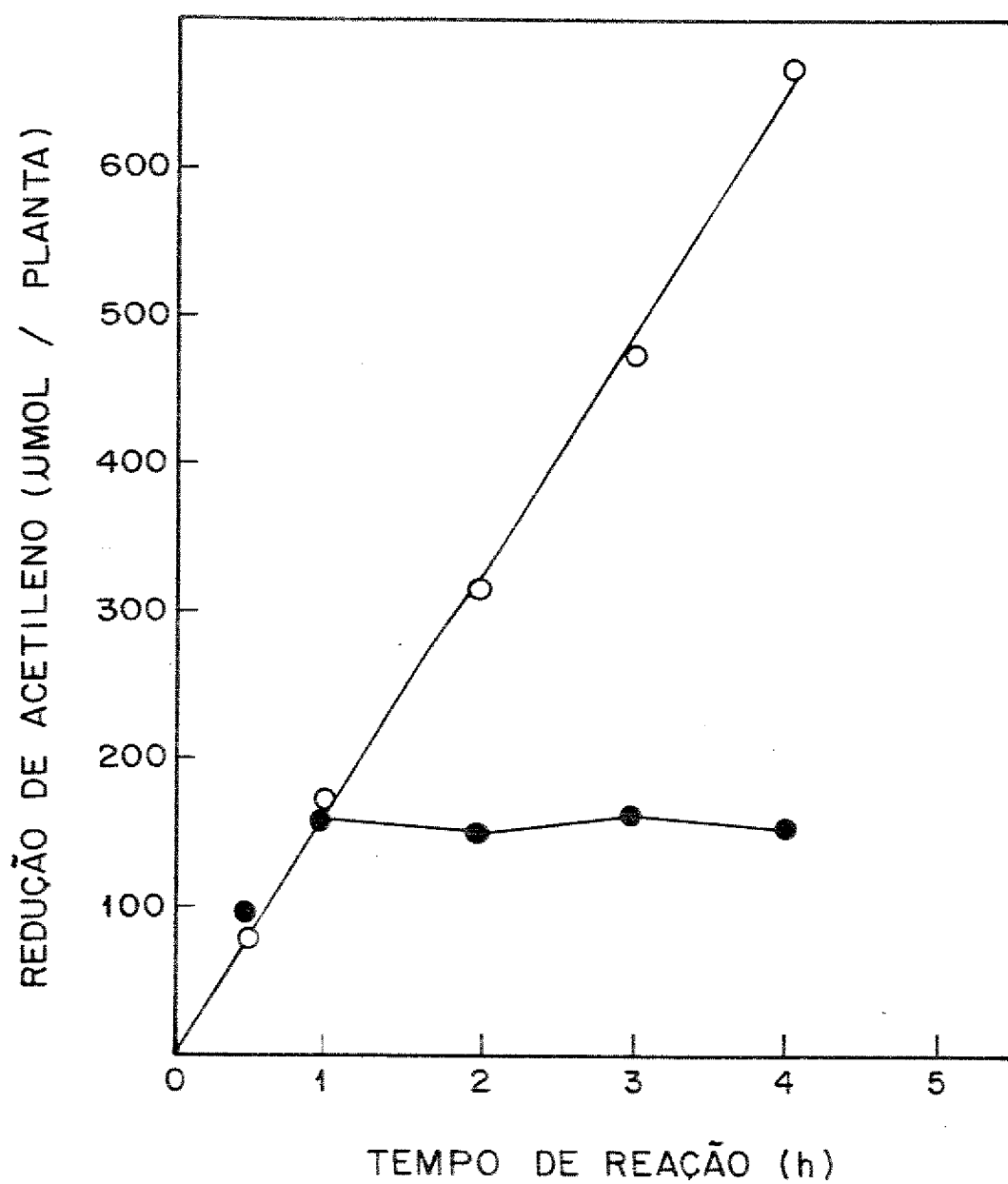
do que no sistema livre de vermiculita (frasco). Esses resultados mostraram que o uso do sistema de raízes destacadas no vaso foi o ideal às medidas de redução de acetileno, porque proporcionou atividades mais altas.

## 2. Tempo de reação

Dos experimentos preliminares descritos anteriormente, os sistemas de plantas intactas e raízes destacadas no vaso foram os que revelaram maior eficiência nas medidas de atividades dos nódulos, sendo por essa razão, escolhidos para as medidas de atividades dos experimentos subsequentes. Objetivando determinar a relação entre a formação de etileno e o tempo de incubação para esses sistemas, foram feitas medidas da redução de acetileno com cinco repetições para plantas intactas e quatro para raízes destacadas. Na Figura 02 onde estão representados os resultados dessas medidas, foi observado que em ambos os sistemas, as atividades foram semelhantes até 1 hora, e que no sistema de plantas intactas os valores continuaram aumentando linearmente até o final do tempo testado (4 horas). A semelhança entre as taxas da redução de acetileno na primeira hora para os dois sistemas está de acordo com os dados anteriores, em que foi verificada menor diferença entre os mesmos quando comparados com a diferença entre os sistemas destacado (no frasco) e intacto. Baseado nesses resultados, foi determinado o tempo de 2 horas para as medidas subsequentes de avaliação da fixação de nitrogênio para o sistema de plantas intactas e o tempo de 1 hora para o sistema de raízes destacadas.

FIGURA 02 - Redução de acetileno (formação de etileno), em relação ao tempo de incubação da enzima nitrogenase, nos sistemas de plantas intactas (O—O) e raízes destacadas (●—●).





### 3. Taxas da redução de acetileno com controle da floração

#### 3.1. Experimento 1

Nesse experimento foi feita uma avaliação da atividade dos nódulos (fixação de  $N_2$ ) durante todo o ciclo da planta. Foram utilizados os dois sistemas para as medidas dessa atividade; plantas intactas e raízes destacadas, com a finalidade de verificar o comportamento do sistema menos conhecido (plantas intactas) em várias fases de desenvolvimento, utilizando o sistema melhor conhecido (raízes destacadas) como ponto de referência. Todas as plantas desse experimento foram induzidas a florescer no estágio de desenvolvimento  $V_2$  (escala de FEHR *et al.*, 1971), e as medidas iniciadas após o período de indução. Na Figura 03 estão representados os resultados dessas medidas em que, cada ponto da curva é a média de 6 repetições para plantas intactas e de 4 repetições para raízes destacadas. Os estádios de desenvolvimento correspondentes estão indicados ao longo da curva. As medidas da redução de acetileno foram iniciadas no 35º dia após o plantio, nessa idade as plantas estavam no estágio de desenvolvimento  $V_3$  (2ª folha trifoliolada aberta) e a atividade dos nódulos ainda era baixa, aumentando em seguida até atingir a máxima aos 56 dias após o plantio, para os dois sistemas analisados; nessa fase, as plantas estavam no estágio de desenvolvimento  $R_3$  (vagens em expansão). Em seguida, foi observada a queda da atividade dos nódulos, sendo que de forma mais brusca para o sistema de raízes destacadas. Quando as plantas atingiram o estágio  $R_6$  (sementes totalmente preenchidas) a atividade já era baixa.

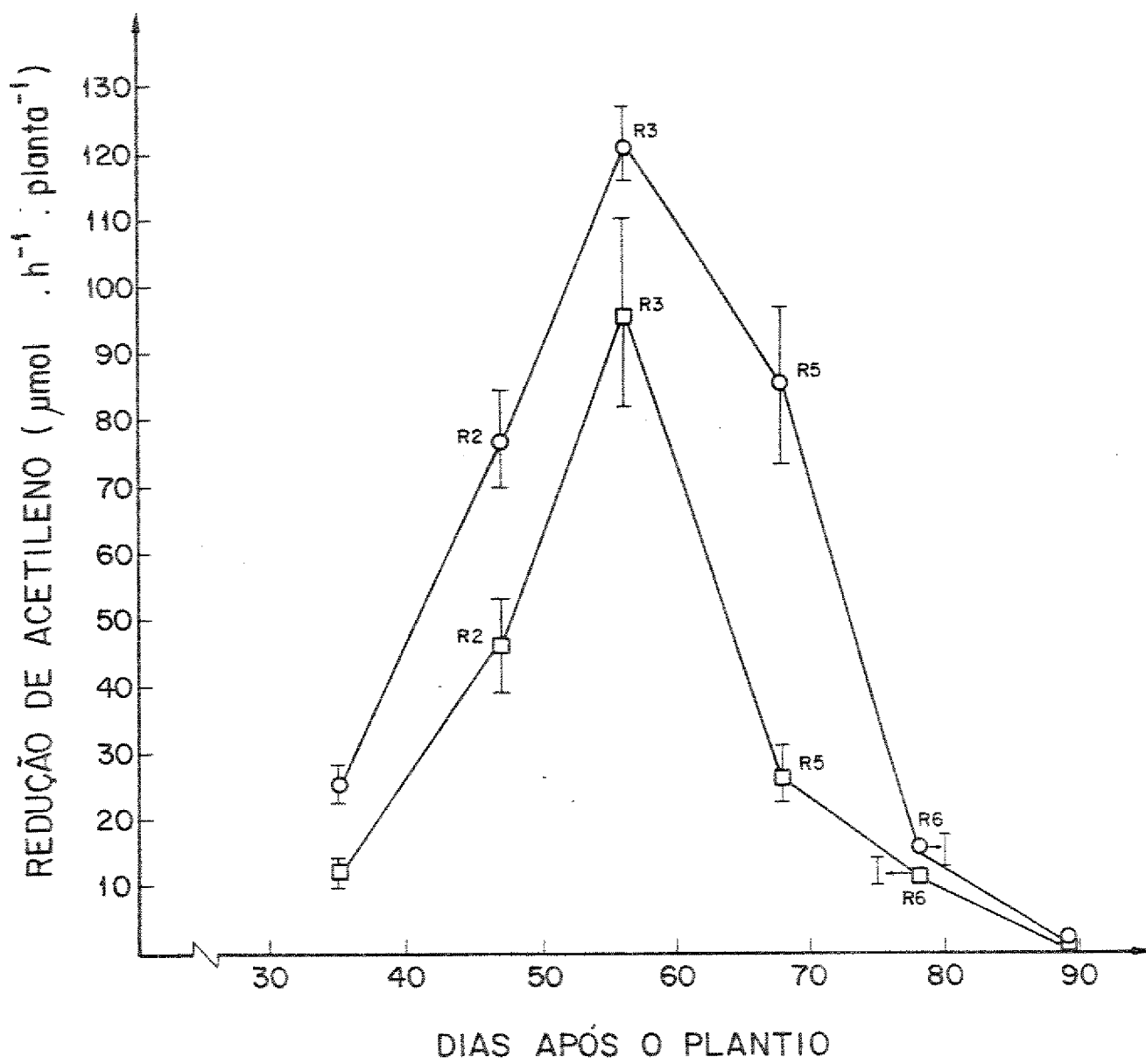
Analizando os dois sistemas de medição, foi observa

FIGURA 03 - Curva da redução de acetileno durante o ciclo da planta, comparando os sistemas de plantas intactas (O—O) e raízes destacadas (□—□). As medidas foram feitas entre 14/03/83 e 07/05/83 (temperatura média de 22,2°C e 7h/dia de insolação).

CV Intacto = 26,6

CV Destacado = 26,9

SE = erro padrão



do grande semelhança na forma das curvas obtidas, embora tenha sido registrado atividades ligeiramente maiores para o sistema de plantas intactas.

Uma vantagem do sistema intacto foi mostrada através da análise estatística dos dados em que as repetições desse sistema apresentaram a mesma variabilidade do sistema destacado (CVs iguais, Figura 03). As plantas foram selecionadas ao acaso para os dois sistemas; uma parte dessa variabilidade pode ser eliminada no caso do sistema intacto colocando as repetições em blocos; isto é possível porque a repetição "A" foi sempre a mesma para todas as idades medidas, ou seja, a mesma planta. Isto faz com que a variação entre repetições diminua (resíduo) e, conseqüentemente, o valor F para os tratamentos (idade) aumente. No presente caso, o valor F obtido para repetições em blocos foi 35,52 enquanto que o valor para os mesmos dados sem blocos foi 21,14 (Tabela 05). Dessa forma foi possível obter diferenças significativas para médias mais próximas com o sistema intacto.

### 3.1.1. Peso fresco e número de nódulos

Neste mesmo experimento foram realizadas medidas do peso fresco e do número de nódulos do sistema de raízes destacadas, objetivando averiguar possíveis envolvimento desses parâmetros na atividade dos nódulos. A Figura 04 mostra que o número de nódulos aparentemente variou pouco a partir dos 47 dias após o plantio (diferenças não significativas), coincidindo portanto com o pico de atividade dos mesmos. Ao contrário do número de nódulos, o peso fresco mostrou uma tendência a aumentar até 68 dias, apresentando uma pequena que

TABELA 05 - Análise da variância dos dados do sistema intacto representado na figura 03.

Repetição A: análise sem blocos

Repetição B: análise em blocos

A:

|                      | SQ    | GL | QM     | F      |
|----------------------|-------|----|--------|--------|
| Trat. <sup>(1)</sup> | 26319 | 3  | 8773,2 | 21,14* |
| Resíduo              | 8302  | 20 | 415,1  |        |
| Total                | 34621 | 23 |        |        |

B:

|                      | SQ    | GL | QM     | F      |
|----------------------|-------|----|--------|--------|
| Trat. <sup>(1)</sup> | 26319 | 3  | 8773,2 | 35,52* |
| Blocos (rep.)        | 4596  | 5  | 919,4  | 3,72   |
| Resíduo              | 3704  | 15 | 247,0  |        |
| Total                | 34621 | 23 |        |        |

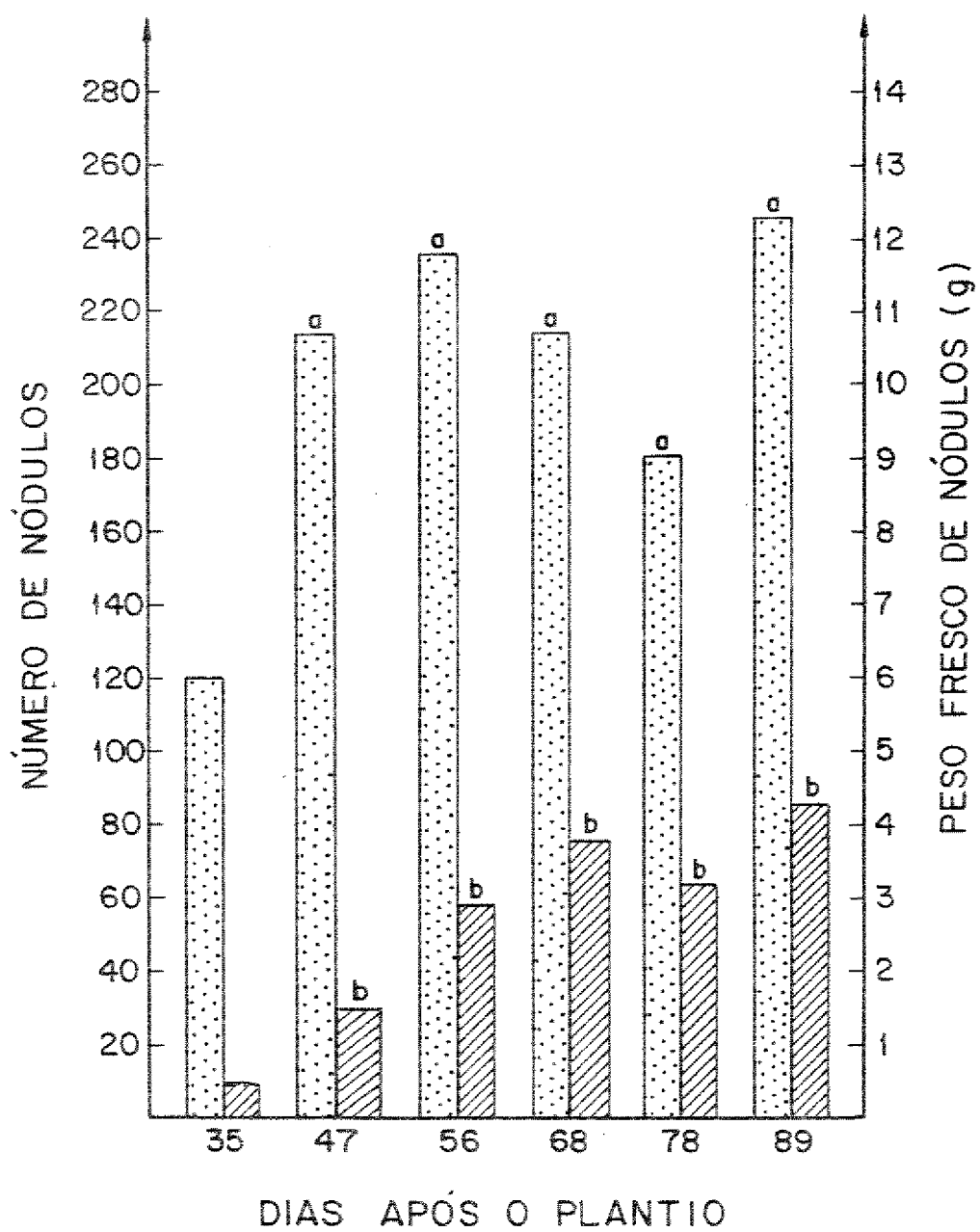
(<sup>1</sup>) Valores das 4 primeiras medidas realizadas com idades diferentes.

FIGURA 04 - Medidas do peso fresco (  ) e do número de nódulos (  ) do sistema de raízes destacadas.

a = comparação entre médias do número de nódulos

b = comparação entre médias do peso fresco dos nódulos

Tukey a 5%.



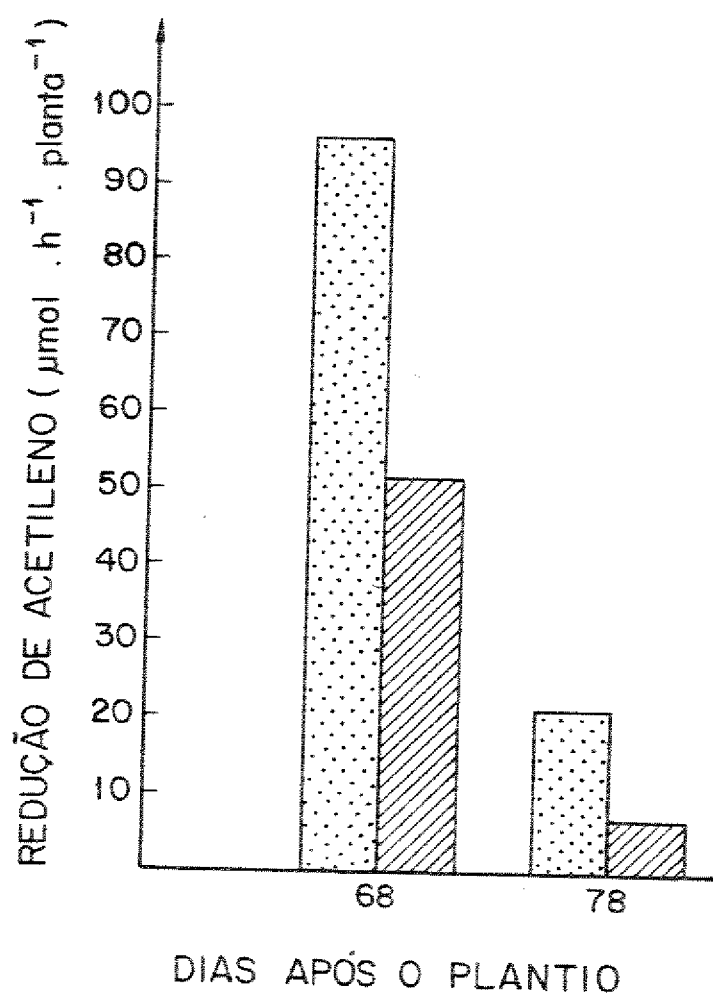


da aos 78 dias e mantendo a seguir peso constante até a medida final (89 dias após o plantio). Embora essas diferenças não tenham sido significativas, de qualquer forma o aumento inicial na redução de acetileno pode estar associado com variações da massa nodular. O aumento imediatamente anterior à atividade máxima e principalmente a subsequente queda, certamente não estão associadas a essas variações.

### 3.1.2. Comparação entre os sistemas intacto e destacado utilizando plantas do mesmo experimento

Em paralelo ao experimento descrito anteriormente, foram feitas outras medidas com plantas cultivadas nas mesmas condições e as medidas para os dois sistemas foram realizadas com as mesmas plantas. Primeiramente foi medida a taxa da redução de acetileno no sistema de plantas intactas, e no dia seguinte foi realizada a mesma medida utilizando as mesmas plantas com o sistema de raízes destacadas, juntamente com as medidas do peso fresco e do número de nódulos. Essas medidas foram feitas com plantas de 68 e 78 dias de idade, correspondentes às idades das duas medidas feitas no experimento descrito anteriormente (Figuras 03 e 04), realizado em paralelo. Os dados de redução de acetileno estão representados na Figura 05. Foi observado que no caso do sistema intacto, tanto aos 68 dias como aos 78, os níveis de atividades foram praticamente os mesmos observados na Figura 03 para as idades correspondentes, indicando assim, que as plantas são fisiologicamente iguais às usadas no experimento em paralelo (Figura 03). Esses resultados também indicaram que as mesmas plantas podem

FIGURA 05 - Medidas da redução de acetileno com os sistemas de plantas intactas (  ) e raízes destacadas (  ) utilizando a mesma planta.



ser usadas várias vezes para as medidas pelo sistema intacto (como observado no experimento anterior, Figura 03), sem nenhuma consequência prejudicial que venha refletir em valores baixos nas medidas subsequentes.

No sistema de raízes destacadas, a atividade observada foi o dobro em relação a obtida para a curva aos 68 dias, enquanto que, aos 78 dias a atividade foi maior para o sistema destacado da curva (Figura 03).

Quanto ao número e peso fresco dos nódulos (Figura 06), foi observado que não houve queda no número nem tampouco no peso dos mesmos nas plantas onde a atividade foi mais baixa (78 dias após o plantio). Da mesma forma como foi observado para a atividade dos nódulos, os dados do número e do peso fresco dos mesmos (Figura 06), foram semelhantes aos encontrados no experimento conduzido em paralelo (Figura 04), mostrando mais uma vez que a queda da atividade dos nódulos não está relacionada com a massa nodular.

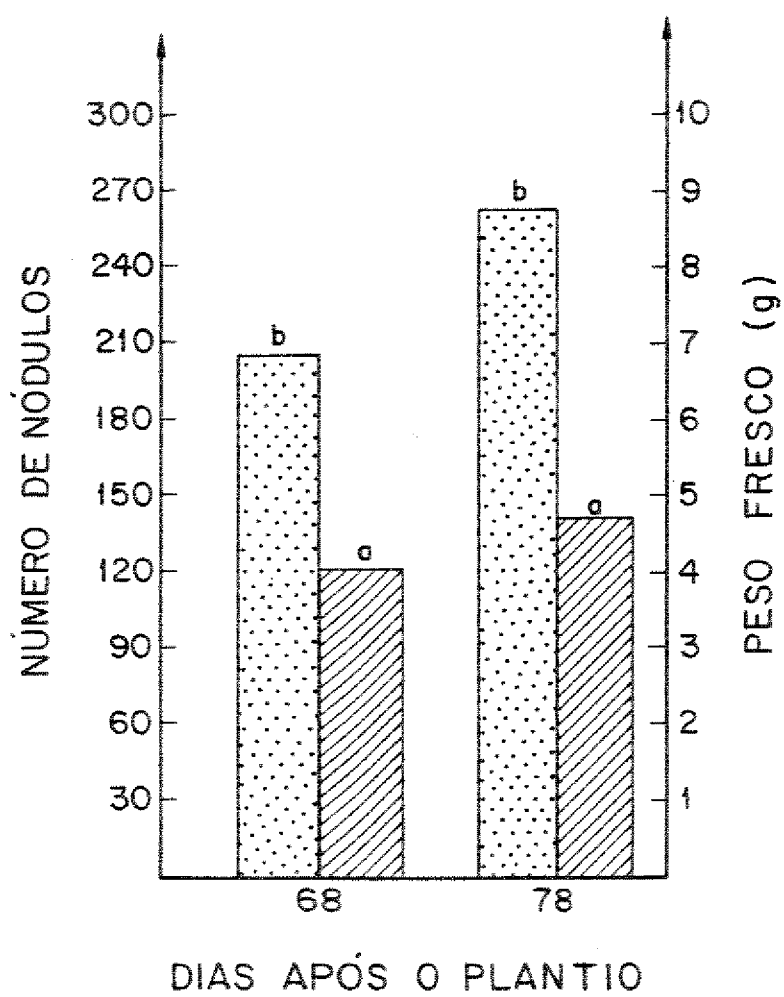
### 3.2. Experimento 02

Segundo já mencionado, diversos autores apresentam hipóteses que a atividade dos nódulos depende da época da floração da planta. Visando averiguar tais hipóteses, foram feitas medidas da redução de acetileno em plantas submetidas a um controle da floração. Os resultados dessas medidas mostraram que a queda da atividade dos nódulos ocorreu mesmo na fase de formação dos frutos. Por esta razão foi montado um outro experimento em que o controle da floração foi feito com plantas intactas em diferentes estádios de desenvolvimento. Os diferentes tratamentos desse experimento foram os seguintes: plan

FIGURA 06 - Medidas do peso fresco (  ) e do número de nódulos (  ) das plantas utilizadas nas medidas da redução de acetileno mostradas na figura 05.

a= comparação de médias entre número de nódulos  
b = comparação de médias entre peso fresco

Tukey a 5%



tas mantidas em dias longos durante todo o ciclo, plantas induzidas a florescer nos estádios de desenvolvimento  $V_2$ ,  $V_5$  e  $V_8$  (correspondentes a 1ª, 4ª e 7ª folhas trifolioladas totalmente abertas), plantas com flores removidas e plantas com 50% das folhas destacadas alternadamente (ambos com plantas induzidas em  $V_5$ ). As medidas de avaliação da redução de acetileno foram feitas semanalmente durante todo o ciclo da planta (tratamento  $V_2$  e  $V_5$ ), e após a floração para os demais tratamentos. Os resultados dos tratamentos  $V_2$  e  $V_5$  estão representados na Figura 07 e cada ponto da curva representa a média de 4 repetições. Analisando as curvas da redução de acetileno das plantas induzidas nos estádios  $V_2$  e  $V_5$  (Figura 07) foi observada nítida semelhança entre as duas curvas com relação a idade de formação do pico de atividade máxima e taxas de redução de acetileno. Embora os estádios de desenvolvimento tenham sido diferentes em função das diferentes épocas de floração das plantas, em nenhum dos dois casos a queda da atividade coincidiu com a fase de formação da semente. Como pode ser observado no tratamento  $V_2$ , a atividade dos nódulos continuou aumentando atingindo o pico máximo na fase de formação da vagem (56 dias após o plantio). Quando ocorreu maior acúmulo de material (enchimento dos grãos)  $R_5-R_6$ , a atividade dos nódulos já havia diminuído em mais da metade do máximo atingido, e a curva de atividade obtida para o tratamento  $V_2$  (Figura 07) foi bastante semelhante à da Figura 03 em termos de correspondência com o estágio de desenvolvimento reprodutivo. No tratamento  $V_5$  (Figura 07), as épocas do desenvolvimento reprodutivo atrasaram em relação ao  $V_2$  em função do atraso da época de indução. Foi observado que quando ocorreu a queda da ativi-

FIGURA 07 - Taxa da redução de acetileno de plantas de soja induzidas a florescer nos estádios de desenvolvimento  $V_2$  (●—●) e  $V_5$  (○—○).

$R_2$  = Floração

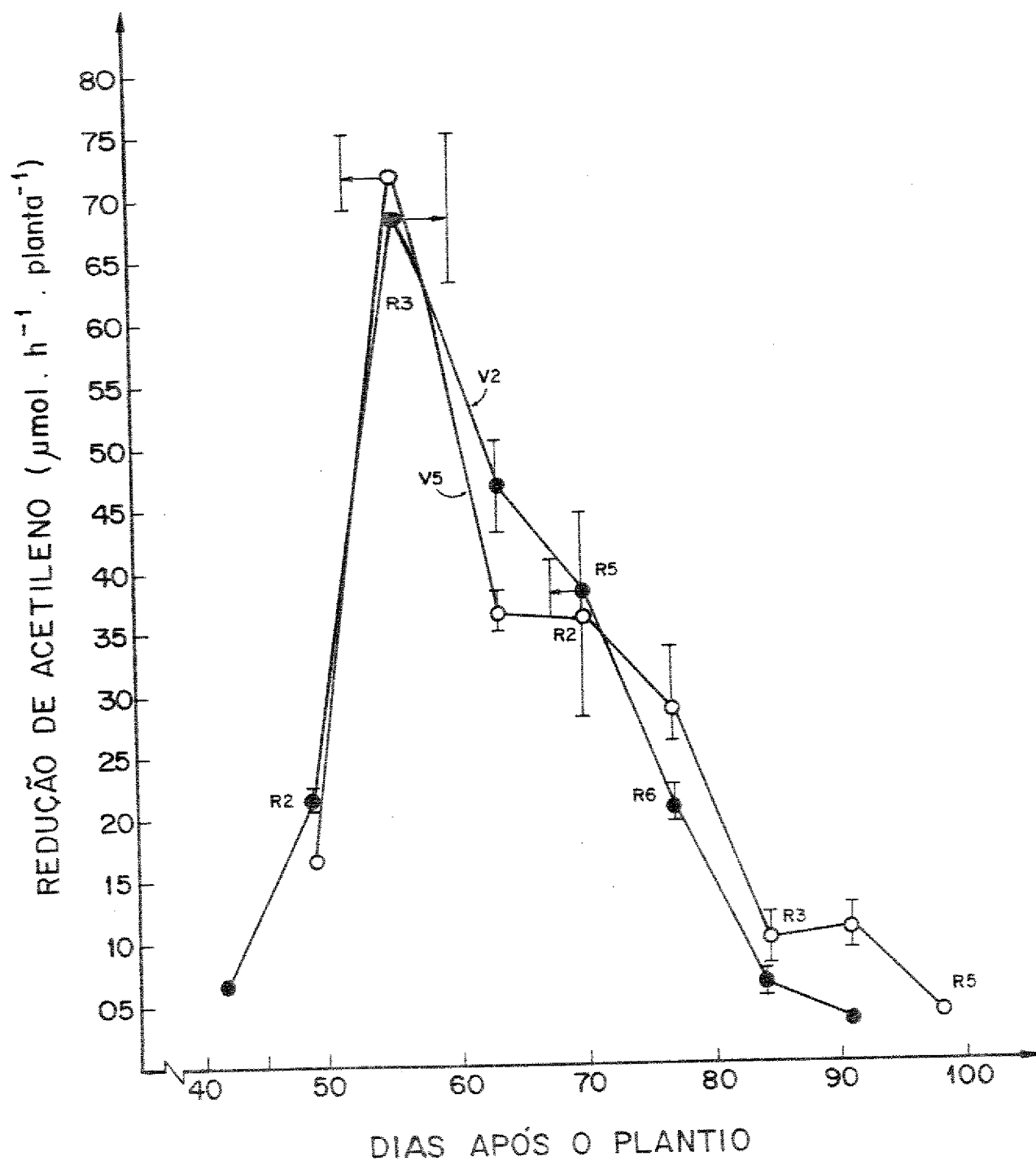
$R_5$  = Enchimento do grão

$R_3$  = Vagem em formação

$R_6$  = Grãos totalmente cheios

SE = erro padrão





de dos nódulos, as plantas ainda não haviam florescido (aproximadamente 64 dias após o plantio). Na fase reprodutiva correspondente ao enchimento dos grãos em que a capacidade de consumo do fruto é maior, a atividade dos nódulos já era praticamente zero.

Os dados climatológicos referentes ao período de 20 dias antes e 20 dias depois da atividade máxima da redução de acetileno estão mostrados em apêndice. A temperatura média foi de 25,4 e 22,3°C, e a energia radiante estimada (estufa) foi de 408,9 e 345,6 cal.cm<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>.

Os resultados dos demais tratamentos estão representados na Figura 08, juntamente com as curvas dos tratamentos V<sub>2</sub> e V<sub>5</sub>, para fins de comparação. Apesar das medidas de avaliação desses tratamentos terem sido feitas após a floração do tratamento V<sub>5</sub>, as atividades obtidas em todos os casos foram baixas, aparentemente correspondentes ao final de uma curva. Acredita-se que os picos de atividades máximas devam ter ocorrido na mesma época, ou próximo das observadas para os tratamentos V<sub>2</sub> e V<sub>5</sub>. Foram notados os baixos valores nos tratamentos de Dias Longos e flores removidas, ou sejam, nas plantas sem a presença de nenhum fruto, mostrando não terem nenhuma ligação com a queda da atividade dos nódulos e presença dos frutos. O tratamento com remoção de 50% das folhas, representando uma diminuição na capacidade de fornecer fotossintatos também não apresentou nenhuma diferença na atividade comparado com os demais. O tratamento V<sub>8</sub> onde a floração atrasou 94 dias e o tratamento de Dias Longos que representou uma diminuição no efeito dreno em função da ausência dos frutos, não tiveram influência na queda da atividade

FIGURA 08 - Taxas da redução de acetileno durante todo o ciclo de plantas induzidas a florescer em diferentes estádios de desenvolvimento:  $V_2$  (●—●);  $V_5$  (○—○);  $V_8$  (▲—▲); plantas com flores destacadas (△—△); plantas com 50% das folhas destacadas alternadamente (□—□) e plantas mantidas em DL (×—×).

$R_2$  = Floração

$R_3$  = Vagem em formação

$R_5$  = Enchimento dos grãos

$R_6$  = Grãos totalmente cheios.



dos nódulos.

### 3.3. Experimento 03

Com o objetivo de confirmar os resultados do experimento anterior e acrescentar dados da quantidade e do peso dos nódulos, foi montado um outro experimento com os tratamentos de indução dos estádios de desenvolvimento  $V_2$  e  $V_5$ . Devido ao fato da quantificação dos nódulos durante o ciclo da planta implicar na destruição da mesma, foi aproveitado o sistema radicular destacado para medir novamente redução de acetileno antes da contagem dos mesmos. Portanto, nesse experimento foi possível novamente comparar os dois sistemas (intacto e destacado) em função das atividades dos nódulos.

Os resultados desse experimento com o sistema intacto estão representados na figura 09, dos dois juntos (intacto e destacado) e na Figura 10. No tratamento  $V_2$  os estádios de desenvolvimento e a idade em que os nódulos apresentaram seus picos de atividade máxima não foram tão diferentes daqueles apresentados na Figura 07. A atividade máxima ocorreu aos 59 dias ( $V_2$ ), e os frutos estavam no estágio de desenvolvimento  $R_5$  (enchimento do grão), mas a taxa da redução de acetileno observada nesse caso (Figura 09, estágio  $V_2$ ) foi menor que a metade observada no experimento anterior (Figura 07). No tratamento  $V_5$  (Figura 09), os resultados foram diferentes do anterior (Figura 07) tanto quanto aos estádios de desenvolvimento com relação às atividades máximas, como quanto às taxas da redução de acetileno. Os nódulos atingiram pico de atividade máxima aos 74 dias correspondentes à fase de enchimento do grão ( $R_5$ ) como no tratamento  $V_2$ . Portanto, mesmo ocorrendo em

FIGURA 09 - Taxa da redução de acetileno durante o ciclo de plantas induzidas a florescer nos estádios de desenvolvimento  $V_2$  (O—O) e  $V_5$  (□—□) sistema intacto.

CV ( $V_2$ ) = 24,47

CV ( $V_5$ ) = 20,15

SE = erro padrão

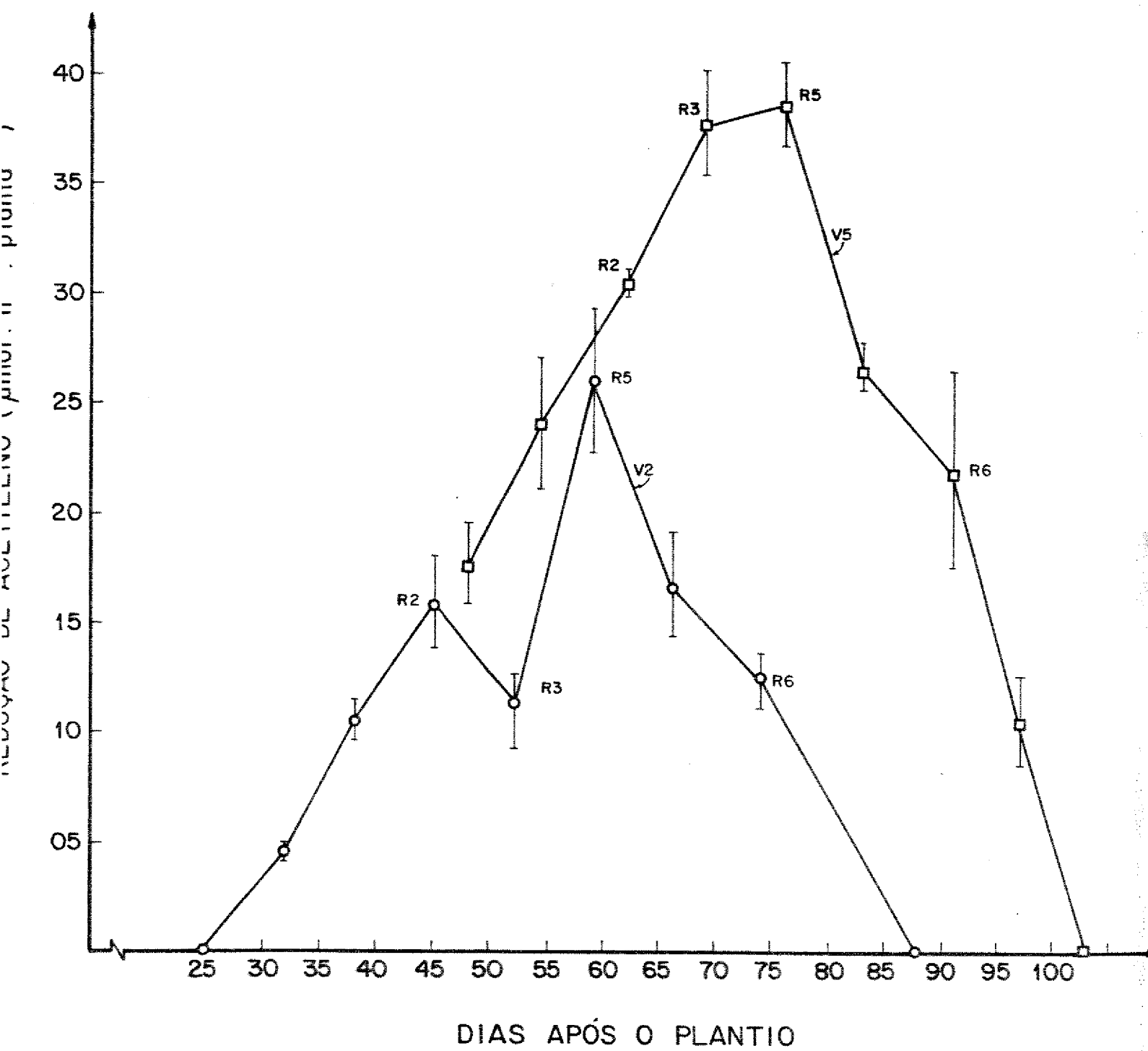
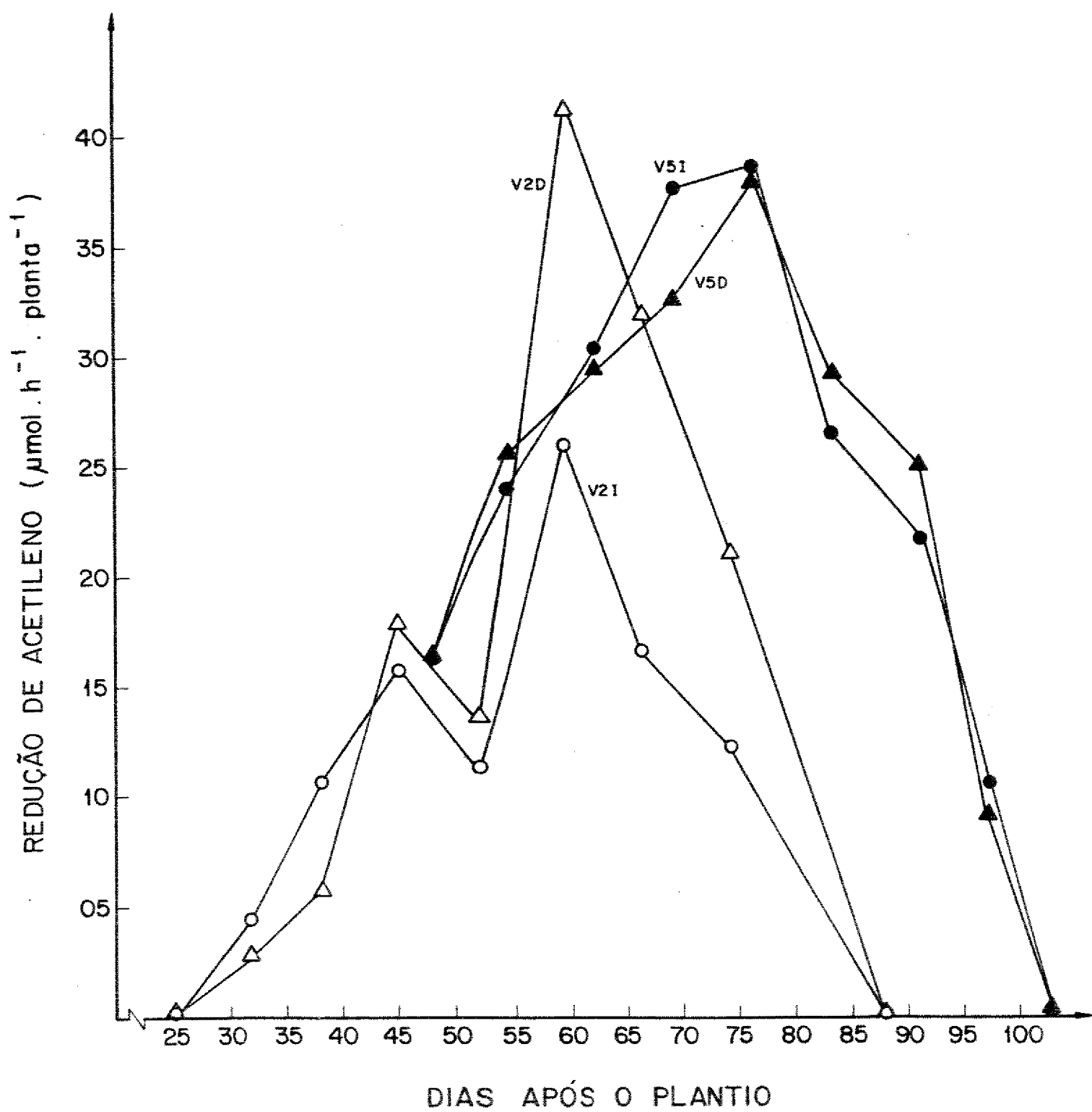


FIGURA 10 - Taxas da redução de acetileno durante o ciclo de plantas induzidas nos estádios de desenvolvimento  $V_2$  (O—O) e  $V_5$  (●—●) de plantas intactas e  $V_2$  (Δ—Δ) e  $V_5$  (▲—▲) de raízes destacadas.





idades diferentes, a queda da atividade dos nódulos nesse experimento foi relacionada com a formação dos frutos contrariando desse modo, a conclusão do experimento anterior.

Em relação aos dados obtidos do sistema de raízes destacadas (Figura 10), esses estavam de acordo com os obtidos para o sistema intacto conforme verificado em experimento anterior (Figura 03). Nesse caso (Figura 10), os valores absolutos obtidos com o sistema destacado foram praticamente iguais aos valores correspondentes ao sistema intacto na maioria dos casos, sendo mais alto para alguns pontos isolados.

Os dados climatológicos do período entre a floração do tratamento  $V_2$  até um ponto intermediário entre os dois picos de atividade da redução de acetileno (46 a 65 dias) foram: temperatura média de  $21,7^{\circ}\text{C}$  e energia radiante estimada (estufa) de  $227,4 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ . Para o período seguinte de 66 a 85 dias, esses valores foram  $19,3^{\circ}\text{C}$  e energia radiante estimada (estufa) de  $265,3 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ . As médias mais baixas com relação ao experimento anterior foram reflexos da estação mais fria do ano, além de uma energia radiante mais baixa. (ver apêndice).

### 3.3.1. Pesos frescos e número de nódulos

A quantificação dos nódulos e respectivos pesos frescos, foram realizadas no sistema de raízes destacadas juntamente com as medidas de pesos frescos da parte aérea e do sistema radicular (sem os nódulos) de cada planta. O objetivo principal dessas medidas foi averiguar se a atividade dos nódulos era dependente desses parâmetros.

a) Pesos frescos da parte aérea e da raiz

As medidas de peso fresco da parte aérea das plantas foram feitas após o seccionamento das mesmas, enquanto que do sistema radicular foram feitas após as medidas da redução de acetileno. Os resultados do tratamento  $V_2$  estão representados na Figura 11 e do tratamento  $V_5$  na Figura 12. Cada ponto das figuras representa a média dos pesos de quatro plantas expressos em gramas. Foi observado no tratamento  $V_2$  um aumento contínuo do peso fresco tanto da parte aérea como da raiz, que coincidentemente foi semelhante ao aumento encontrado para as medidas de atividade da redução de acetileno até quando atingiram o pico de atividade máxima (60 a 70 dias após o plantio). Em seguida, as mudanças no peso para as duas partes foram bem mais discretas. A parte aérea manteve peso constante e a raiz apresentou pequena queda a partir dos 78 dias.

O tratamento  $V_5$  (Figura 12) apresentou pesos frescos da parte aérea e da raiz praticamente iguais até aos 68 dias acompanhando a taxa da redução de acetileno. A partir daí o peso da parte aérea foi aumentando até atingir o pico máximo aos 92 dias; nessa idade a atividade dos nódulos havia diminuído. A raiz a partir dos 68 dias manteve peso praticamente constante, podendo ser observado diferenças de pesos entre a raiz e a parte aérea desses tratamentos. Comparando os tratamentos  $V_2$  e  $V_5$  (Figuras 11 e 12), foi observado pequena diferença no peso fresco do sistema radicular (em torno de 35 g) e maior diferença no peso da parte aérea. Essa diferença foi decorrente do maior desenvolvimento vegetativo das plantas do tratamento  $V_5$  provavelmente em consequência da flo

FIGURA 11 - Variações do peso fresco da raiz (O--O) e da parte aérea (●—●) durante o ciclo de plantas induzidas no estágio de desenvolvimento  $V_2$ .

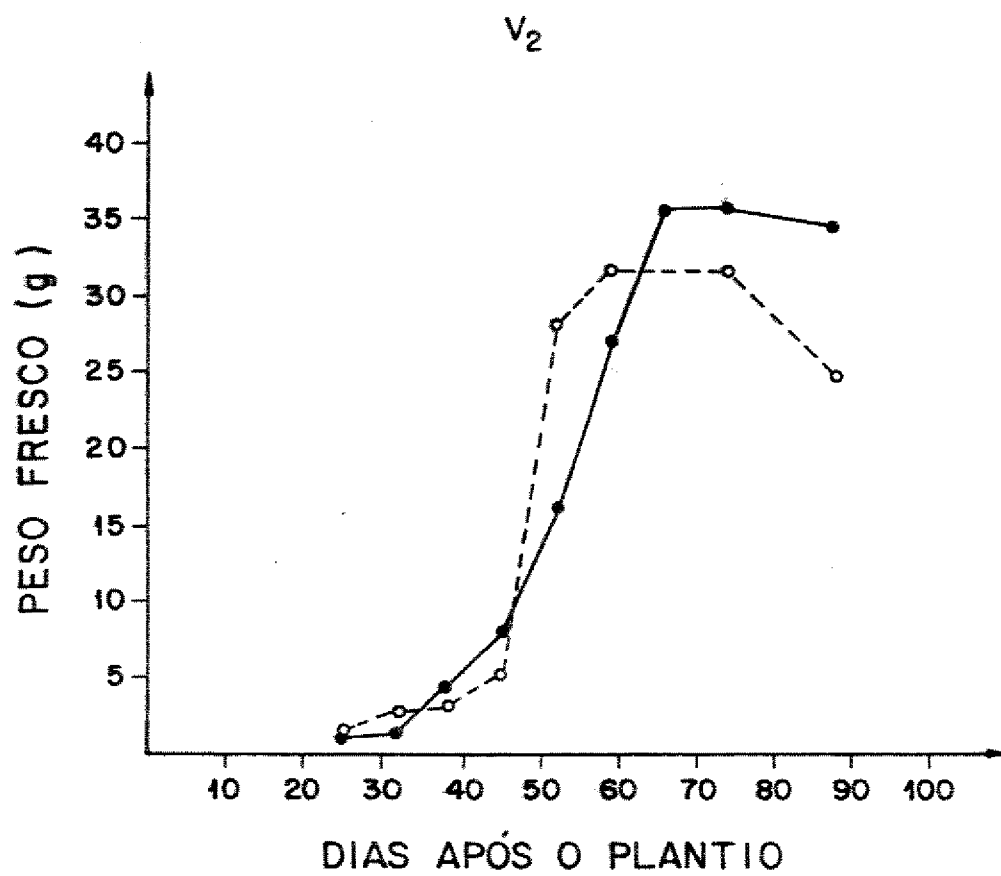
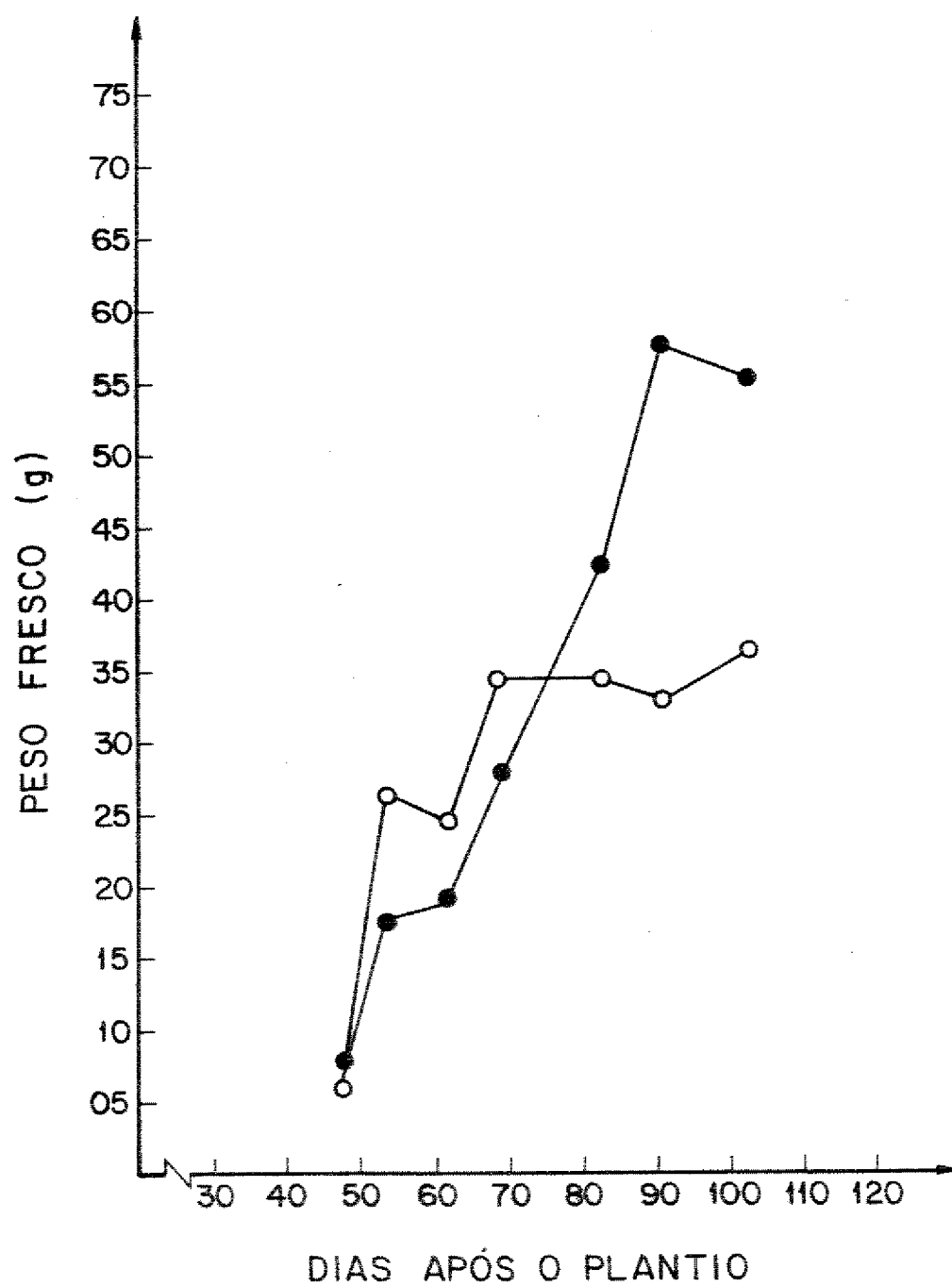


FIGURA 12 - Variações do peso fresco da raiz (O—O) e parte aérea (●—●), durante o ciclo de plantas induzidas no estágio V<sub>5</sub>.



ração mais tardia.

b) Número e peso fresco das vagens:

As medidas de número e peso fresco das vagens dos dois tratamentos  $V_2$  e  $V_5$ , estão representadas nas Figuras 13 e 14. O tratamento  $V_5$  apresentou maior número de vagens, certamente em função do maior crescimento vegetativo dessas plantas que em decorrência desse maior número de vagens, o peso fresco também foi mais alto para esse tratamento, embora tenha sido evidenciado que no final do ciclo das plantas o peso médio por vagem foi igual em ambos os tratamentos. Nesse experimento, o peso das vagens permitiu uma avaliação mais objetiva quanto à fase de desenvolvimento com maior acúmulo de material dos frutos. Portanto, foi observado que os frutos alcançaram metade do peso máximo entre 59 e 66 dias para o tratamento  $V_2$ , e antes dos 83 dias para o tratamento  $V_5$ , ou seja, no estágio  $R_5$  avaliado visualmente nos outros experimentos. Esses estádios do desenvolvimento reprodutivo correspondem a pontos bastante próximos dos picos de atividade em ambos os casos.

c) Número e peso fresco dos nódulos

Os resultados das medidas do peso fresco e do número de nódulos dos tratamentos  $V_2$  e  $V_5$  estão representados nas Figuras 15 e 16. Nos dois casos foi observado pequeno aumento em número e peso dos nódulos até próximo da floração. Na floração, ou logo após, foi verificado um aumento rápido no número dos nódulos seguido de uma aparente variação até o final da fase reprodutiva; nessa fase, foi também observado os aumentos máximos no peso dos nódulos.



FIGURA 13 - Medidas do peso fresco (  ) e do número de va  
gens (  ) de plantas com raízes destacadas no  
estádio de desenvolvimento  $V_2$ .

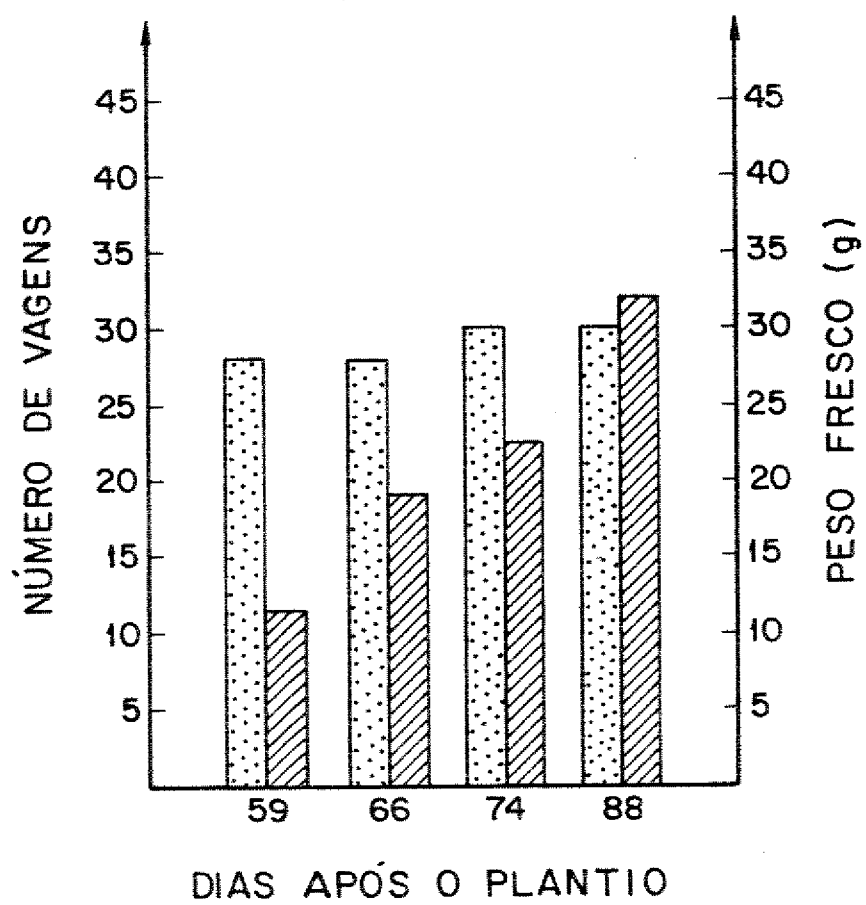


FIGURA 14 - Medidas do peso fresco (  ) e do número de va  
gens (  ) de plantas com raízes destacadas no  
estádio de desenvolvimento  $V_5$ .

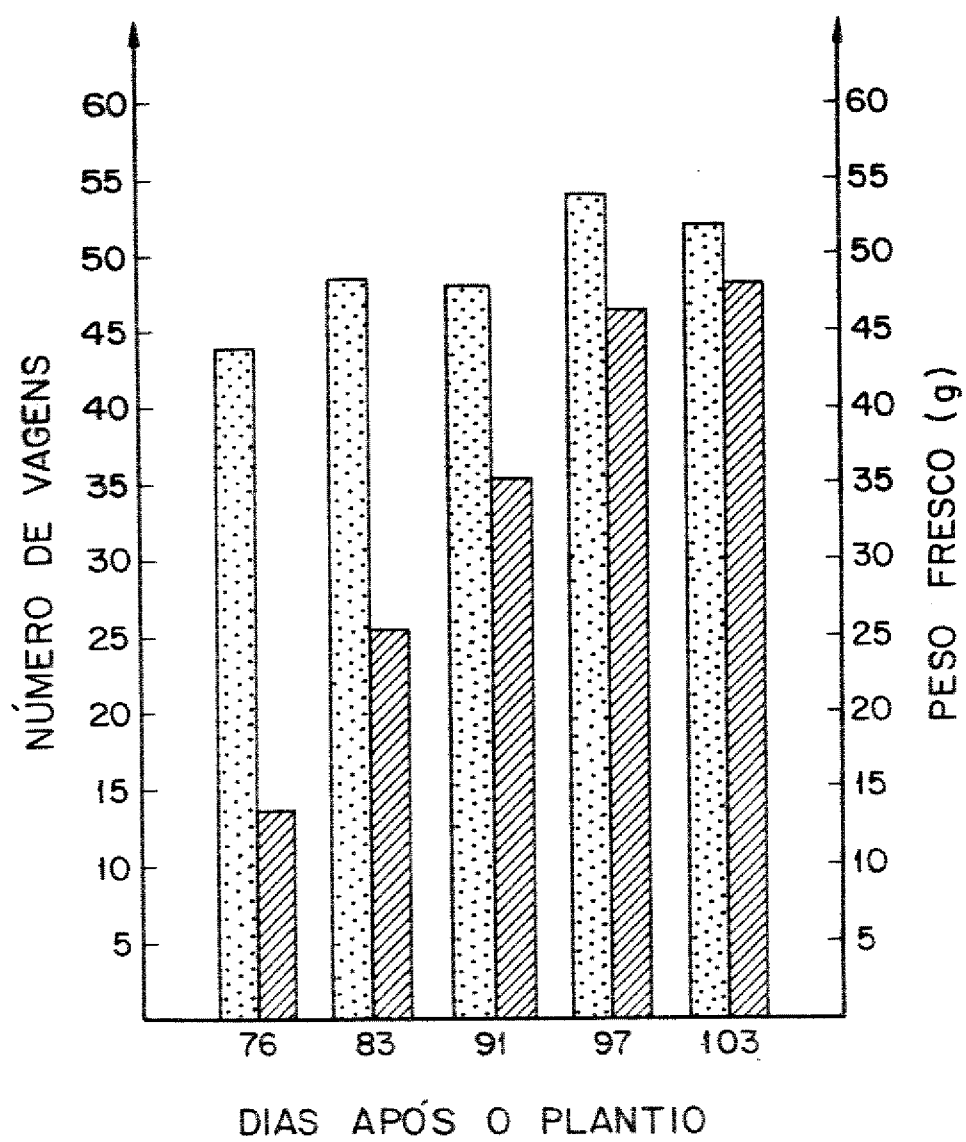


FIGURA 15 - Medidas do peso fresco (  ) e do número de nódulos (  ) durante todo o ciclo de plantas induzidas no estágio  $V_2$ . Floração aos 45 dias.

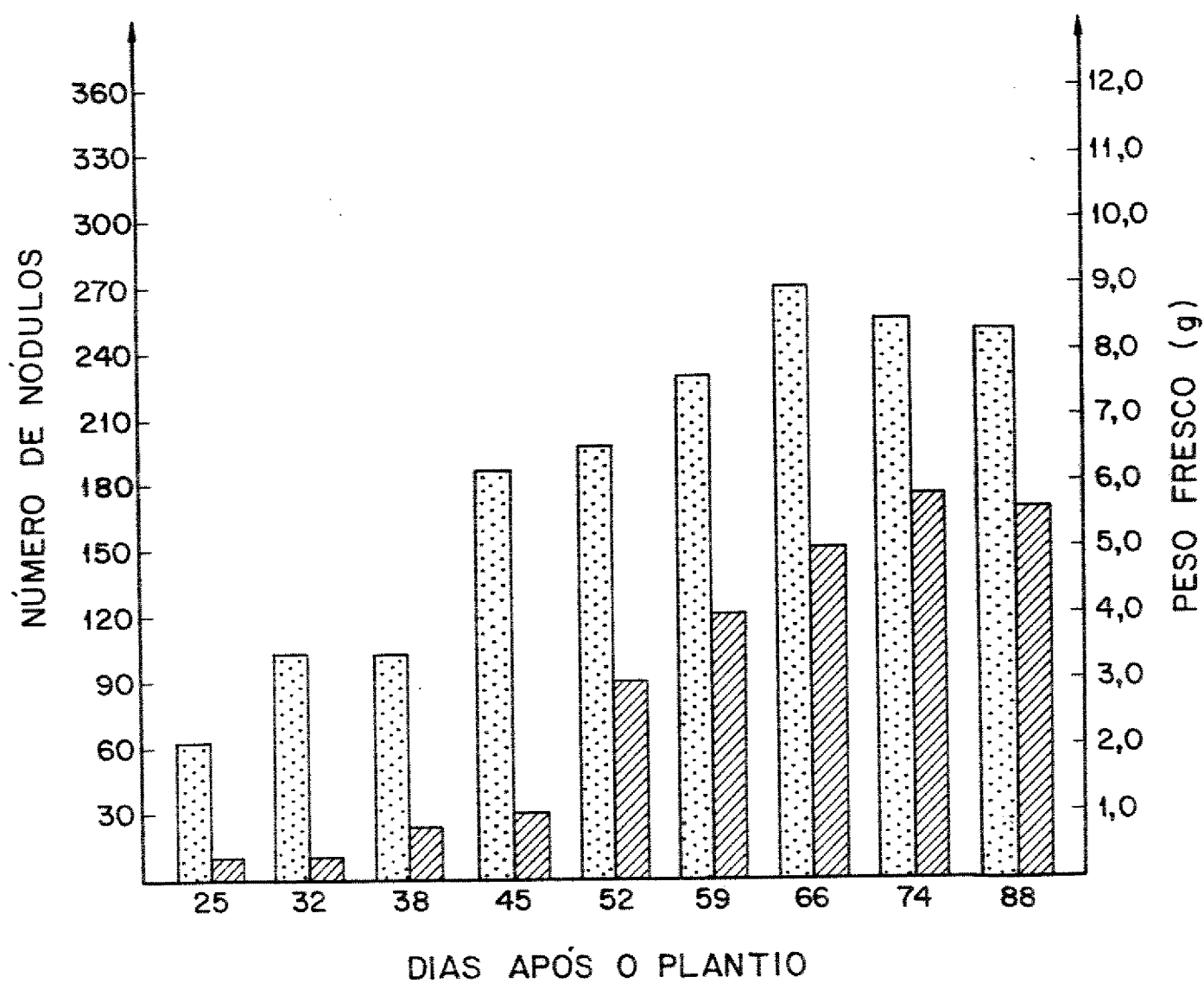
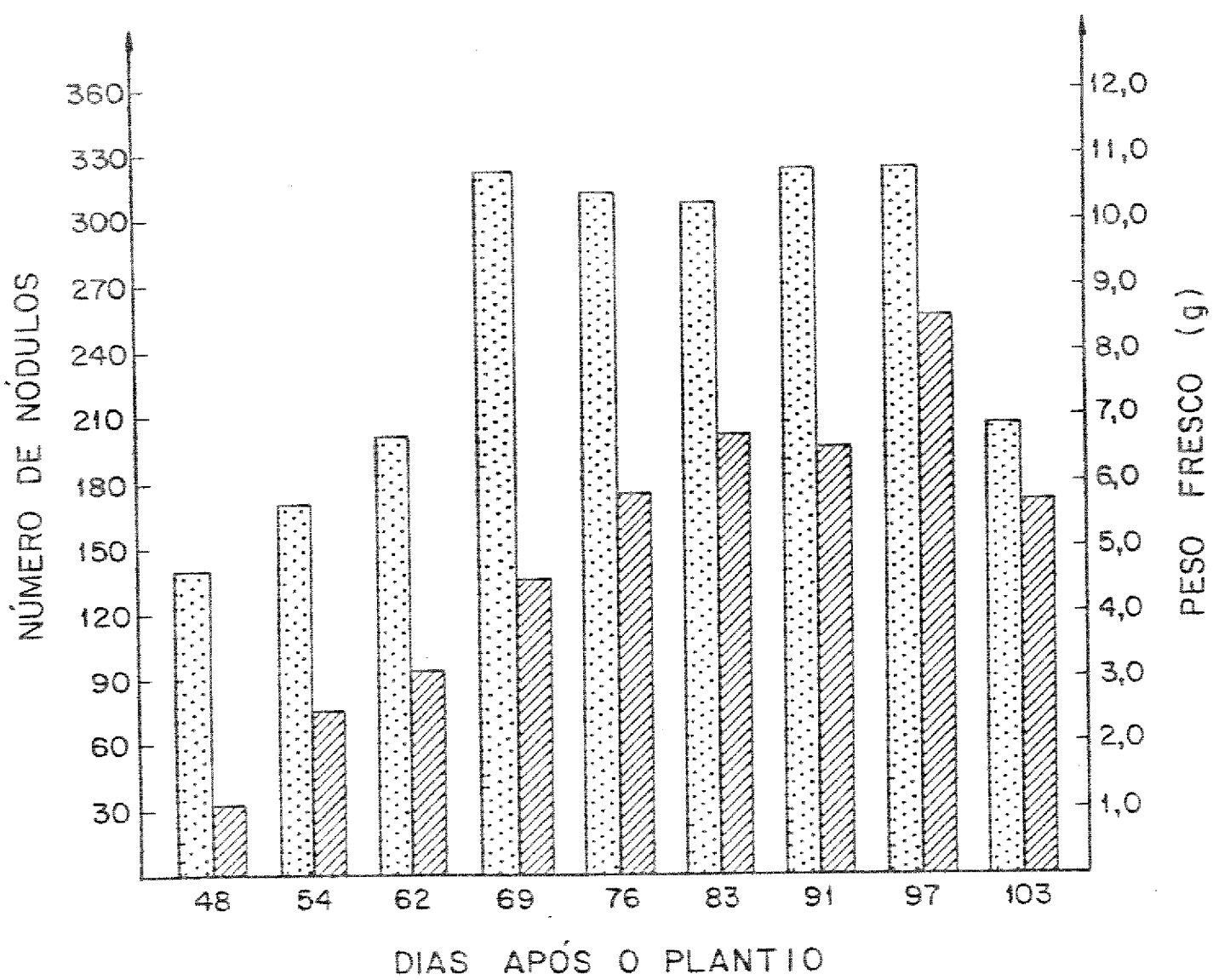


FIGURA 16 - Medidas do peso fresco (  ) e do número de nódulos (  ) durante todo o ciclo de plantas induzidas no estágio  $V_5$ . Floração aos 62 dias.

"





De modo geral, o número e o peso dos nódulos foram maiores para o tratamento  $V_5$ , embora os dois tratamentos tenham atingido pesos máximos próximos dos 59 dias, idade em que foi detectada maior taxa da redução de acetileno para o tratamento  $V_2$  e 76 dias para o tratamento  $V_5$ , permanecendo em seguida mais ou menos constante. O número médio de nódulos para o tratamento  $V_2$  foi de 256 e para o  $V_5$  foi 306, embora essa diferença não tenha sido significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Quanto ao peso fresco dos nódulos, o valor para  $V_2$  foi de 5,49 g, enquanto que para  $V_5$  foi de 6,38 g, diferença essa não significativa. Esses resultados mostraram que durante a queda acentuada da atividade dos nódulos não houve nenhuma indicação de que esses tivessem iniciado o processo de degeneração ou senescência, pelo menos em termos de perda de peso, embora aparentemente o fenômeno da degeneração tenha sido observado principalmente nos nódulos próximos da superfície do vaso.

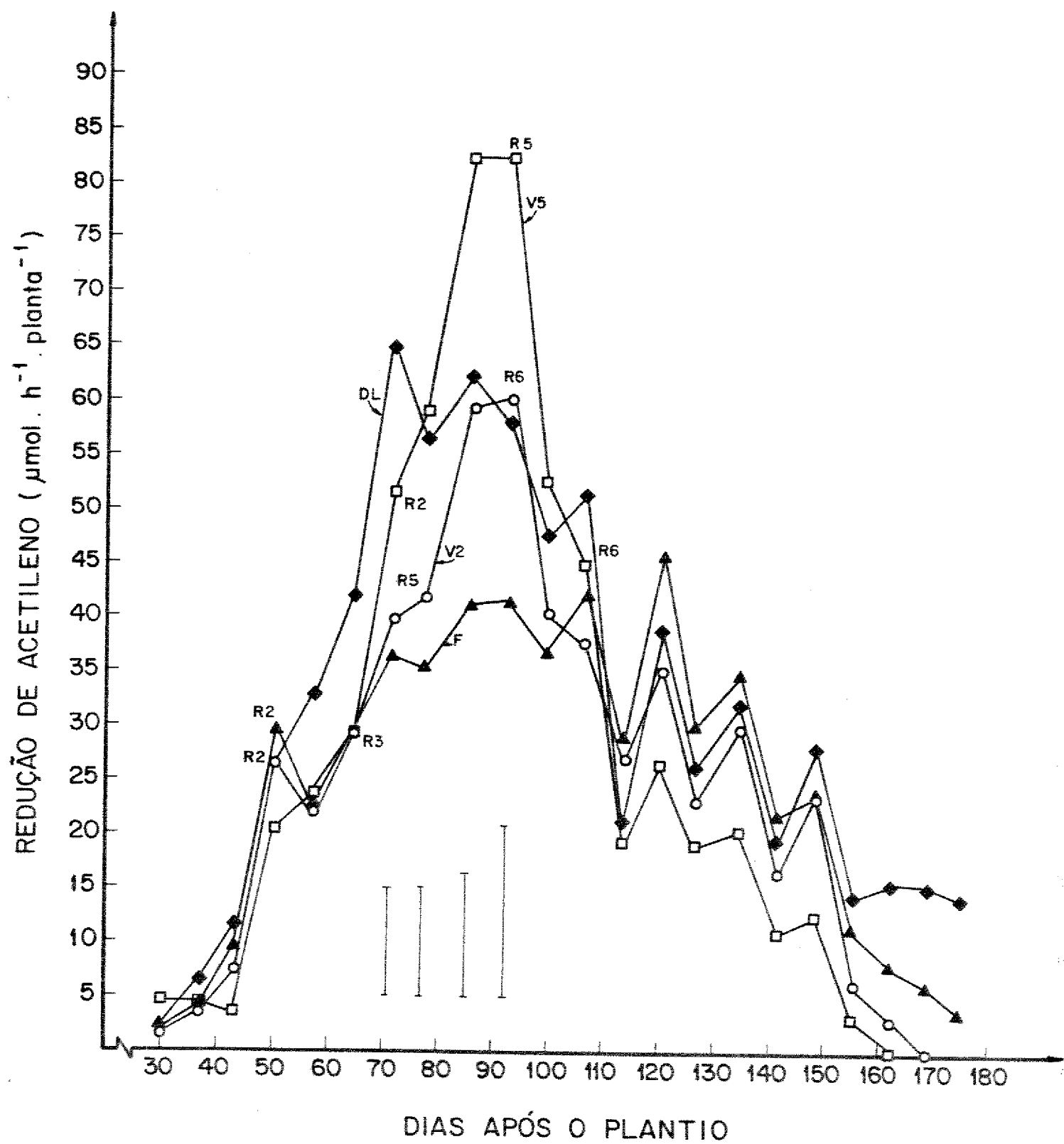
#### 3.4. Experimento 04

Os resultados das medidas de fixação de nitrogênio dos dois experimentos anteriores (com controle da floração), foram conflitantes. Visando melhores esclarecimentos com relação a esses resultados foi montado um outro experimento no qual foram utilizadas plantas intactas com controle da floração para quatro tratamentos: plantas induzidas a florescer nos estádios de desenvolvimento  $V_2$  e  $V_5$ , plantas mantidas em Dias Longos (estado vegetativo) durante todo o ciclo, e plantas com flores removidas (induzidas no estágio  $V_2$ ).

As medidas da redução de acetileno foram iniciadas 30 dias após o plantio para todos os tratamentos logo após a indução das plantas do tratamento  $V_2$ . Os resultados dessas medidas estão representados na Figura 17. Como pode ser observado, a atividade inicial foi igual para todos os tratamentos até 50 dias após o plantio; a partir dessa idade os resultados variaram em atividade embora tenham acompanhado o mesmo padrão de curva para todos os tratamentos quanto ao pico e queda das atividades. O tratamento  $V_5$  foi o que apresentou maior atividade ( $82,5 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$ ) entre 80 e 90 dias após o plantio nesse período, as plantas estavam no estágio  $R_3$  (Formação da vagem). O tratamento sem flores (-F), foi o que apresentou menor atividade comparado com os demais tratamentos; metade da atividade encontrada para o tratamento  $V_5$  ( $42,5 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$ ). Os tratamentos  $V_2$  e Dias Longos apresentaram atividades semelhantes:  $60$  e  $65 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{planta}^{-1}$  respectivamente. Quando as plantas dos tratamentos  $V_2$  e  $V_5$  atingiram o pico de atividade máxima entre 80 e 90 dias após o plantio, as plantas do tratamento  $V_2$  estavam no estágio de desenvolvimento  $R_6$  (enchimento do grão), e as do tratamento  $V_5$  estavam no estágio  $R_5$ . A queda da atividade dos nódulos ocorreu praticamente ao mesmo tempo para todos os tratamentos, 99 dias após o plantio, independente dos estádios de desenvolvimento das plantas como pode ser observado nos tratamentos  $V_2$  e  $V_5$ . Nesse experimento, os dados foram concordantes com os dados do primeiro experimento de controle da floração (Figura 07). A partir dos 110 dias, as atividades apresentaram oscilações idênticas para todos os tratamentos (discutido adiante) até as últimas medidas aos 175 dias após o plantio.

FIGURA 17 - Taxa da redução de acetileno no sistema de plantas intactas com 4 tratamentos: indução nos estádios de desenvolvimento  $V_2$  (O—O);  $V_5$  (□—□); plantas com flores removidas -F (▲—▲) e plantas em dias longos durante todo o ciclo DL (◆—◆).

SE = erro padrão



As medidas desse experimento (Figura 17) foram realizadas nos períodos entre 30 e 175 dias após o plantio. Os dados climatológicos para o período de maior atividade dos nódulos estão apresentados em apêndice. No período de 30 dias que antecedeu a atividade máxima (60 a 90 dias) a temperatura média foi de  $24,2^{\circ}\text{C}$  e energia radiante estimada (estufa) de  $377,4 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ . No período entre 90 a 120 dias, esses valores foram  $24,9^{\circ}\text{C}$  e a energia radiante estimada (estufa) foi  $363,9 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ .

#### IV - DISCUSSÃO

Durante a realização desse trabalho, as medidas da redução de acetileno foram realizadas de preferência, com o sistema de plantas intactas, isso porque foi partido do pressuposto que sendo um método não destrutivo, as mesmas plantas poderiam ser usadas para medir as variações em atividades durante todo o seu ciclo. Para verificar se havia alguma diferença na variabilidade das repetições entre os sistemas intacto e destacado foi calculado o CV para os dois casos; como pôde ser observado na Figura 03, não houve diferenças, o que era esperado uma vez que em ambos os casos as plantas foram coletadas ao acaso. No sistema de plantas intactas, foi possível fazer uma análise da variância colocando as repetições em blocos, uma vez que foram usadas as mesmas plantas durante todo o experimento. Nesse caso (Tabela 05) foi observado que o valor de F aumentou substancialmente; isso ocorreu devido ao fato que, por exemplo, naquela repetição em que a atividade foi mais alta na primeira idade, essa permaneceu mais alta em todas as demais idades. É evidente que no caso do sistema destacado, não foi possível fazer esse tipo de análise uma vez que, em cada medida foram sempre utilizadas plantas diferentes pelo fato do método ser destrutivo.

Embora o sistema com plantas intactas tenha sido usado em outros laboratórios (LAWRIE & WHEELER, 1974; PEAT *et al.*, 1981; IMSANDE & RALSTON, 1982; MALIK, 1983; PFEIFFER *et al.*, 1983), as características do mesmo variam muito e o sistema aqui utilizado, não é igual a nenhum outro; uma das principais diferenças está no uso da vermiculita como substra

to, sem circulação forçada de gases pelo sistema radicular, ficando portanto dependente da difusão. Em função dessas diferentes características, procurou-se sempre que possível, comparar o sistema intacto com o sistema de raízes destacadas também utilizado nesse trabalho. Entretanto a atividade registrada com o sistema intacto não foi inferior ao sistema de raízes destacadas livres de vermiculita (Tabela 03); pelo contrário, as atividades frequentemente foram um pouco mais altas para o sistema de plantas intactas, sugerindo que a presença da vermiculita não foi fator limitante na difusão do gás até atingir o sistema radicular.

A técnica da redução de acetileno é apoiada na hipótese que a atividade da nitrogenase não é afetada por substratos não fisiológicos como o acetileno, e nem pelo produto etileno (HARDY *et al.*, 1968; MAGUE & BURRIS, 1979). Por esse motivo é uma técnica atualmente bastante utilizada para avaliar a fixação de nitrogênio em função de sua alta sensibilidade e facilidade de uso. Apesar dessas vantagens, a técnica vem sendo questionada por MINCHIN *et al.* (1983); esses autores encontraram que raízes noduladas e nódulos destacados de várias espécies de leguminosas testadas, inclusive a soja, a atividade da enzima nitrogenase mostrou uma queda acentuada na presença de acetileno com simultânea redução da respiração; a redução ocorreu dentro de poucos minutos de exposição ao acetileno e continuou por 30 a 60 minutos. O uso de outros métodos demonstraram que a atividade inicial antes da queda, representa a taxa real de atividade da nitrogenase. Nesse trabalho, todas as medidas foram realizadas com o uso dessa técnica, embora sem possibilidade de utilização do equipamento

que permite realizar medidas de minuto em minuto da formação de etileno. Procurou-se então, avaliar o problema sempre fazendo medidas de 10 em 10 minutos durante os primeiros 30 minutos. Nesses intervalos não se verificou queda significativa da atividade sugerindo com isso que o problema com o acetileno não deve ter sido muito sério para cultivar Santa Rosa. A Figura 02, mostrou esses resultados, e foi observado que ambos os sistemas foram lineares durante a primeira hora. MINCHIN *et al.* (1983) também verificaram que em alguns cultivares da mesma espécie, inclusive soja, o acetileno não ocasionou queda na atividade da nitrogenase.

Uma outra diferença que foi observada nos dois sistemas foi que a atividade da nitrogenase no sistema intacto manteve-se linear durante pelo menos 4 horas, enquanto que no sistema destacado foi linear apenas durante a primeira hora, sendo que em seguida, não se verificou mais atividade da enzima. Talvez essa diferença no comportamento da curva para o sistema destacado tenha ocorrido em consequência da ausência da parte aérea causando interrupção do fluxo de fotoassimilados para os nódulos. Caso a ocorrência fosse devida a algum efeito relacionado com a presença do acetileno, resultados semelhantes seriam esperados para o sistema intacto. Com esses resultados ficou evidenciado que os nódulos precisam de cabodratos para suas atividades. Evidências nesse mesmo sentido foram obtidas por LAWN & BRUN (1974) quando constataram que o anelamento impede ou diminui a translocação de fotossintatos para os nódulos, causando um decréscimo superior a 50% na atividade da nitrogenase em soja em apenas duas horas após o anelamento. Da mesma forma, o estresse hídrico causou decrésci-



mo substancial na fixação de  $N_2$  no mesmo intervalo de tempo, como foi também verificado por SPRENT (1972).

Os primeiros trabalhos sobre as variações na atividade de nitrogenase durante o ciclo da soja encontraram um máximo logo após a floração, seguida por uma queda acentuada durante a fase de enchimento do grão (KLUCAS, 1974; LAWN & BRUN, 1974; THIBODEAU & JAWOSKY, 1975; WILSON *et al.*, 1978). Para explicar a queda da atividade foi aventada a hipótese de que os frutos desviam uma parcela dos fotossintatos para o seu próprio dreno, conseqüentemente, prejudicando a atividade dos nódulos. Essa "competição" entre os frutos e nódulos pelos fotossintatos foi inicialmente uma tese bastante aceita para explicar a queda na atividade da nitrogenase (HARDY *et al.*, 1971; KLUCAS, 1974; LAWN & BRUN, 1974; HUANG *et al.*, 1975; HAM *et al.*, 1976; SLOGER *et al.*, 1976; BETHLENFALVAY *et al.*, 1978; BETHLENFALVAY *et al.*, 1979; DUKE *et al.*, 1979; PEAT *et al.*, 1981; GARY & BRUN, 1982; RIGGLE *et al.*, 1984). Em primeiro lugar, a atividade da nitrogenase é altamente dependente de fotossintatos para fornecer a energia necessária para o seu funcionamento. Evidências a esse respeito são abundantes na literatura, por exemplo, manipulações da fotossíntese como a redução do nível de luminosidade (ROCHA *et al.*, 1970; LAWN & BRUN, 1974; CHING *et al.*, 1975; BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1977; MEDERSKI & STREETER, 1977; FINN, 1978; ANTONIW & SPRENT, 1978; FINN & BRUN, 1980; SCHWEITZER & HARPER, 1980; FARNHAM *et al.*, 1986), retirada das folhas (MOUSTAFFA *et al.*, 1969; LAWN & BRUN, 1974; BETHLENFALVAY *et al.*, 1978; THIMANN & SATLER, 1979; WITTENBACH, 1982; PANDEY, 1983; PATTERSON & LARUE, 1983; CRAFTS-BRANDER *et al.*, 1984) e outros trata-

mentos que alteram a taxa fotossintética (SCHREVER, 1959; HARDY & HAVELKA, 1973; HARDY & HAVELKA, 1975; QUEBEDEAUX *et al.*, 1975; HAVELKA & HARDY, 1976). Em outros trabalhos a remoção das flores e dos frutos aumentaram a atividade da nitrogenase (LAWN & BRUN, 1974; HAM *et al.*, 1976; MEDERSKI & STREETER, 1977; BETHLENFALVAY *et al.*, 1978).

Por outro lado, estudos mais recentes (muitos realizados após o início desse trabalho), têm contestado a hipótese de competição entre frutos e nódulos. Em primeiro lugar, uma redução drástica do número de frutos nem sempre influencia a queda da nitrogenase (WILSON, 1978; MALIK, 1983; RIGGLE *et al.*, 1984), redução do nível de luminosidade (SPRENT & BRADFORD, 1976; WASHUA & MILLER, 1978; SCHWEITZER & HARPER, 1980) ou a retirada parcial das folhas (CHU & ROBERTSON, 1974; TEIFEN & VORST, 1975; SHELDRAKE & NARAYANAN, 1976). Do mesmo modo, a retirada das flores e vagens podem não levar necessariamente a um incremento na atividade da nitrogenase e no número total das plantas (BRUN, 1976; NDUNGURU *et al.*, 1976; WILSON *et al.*, 1978; MALIK, 1983; RIGGLE *et al.*, 1984).

As evidências obtidas nesse trabalho apoiam a idéia mais recente de que o desvio de fotoassimilados pelos frutos não é o suficiente para explicar a queda na atividade da nitrogenase. Essa afirmação baseou-se no fato que, em dois experimentos (Figuras 07 e 17) a queda da atividade ocorreu simultaneamente para plantas induzidas a florescer em idades diferentes. Entretanto, outras evidências aqui obtidas, apresentaram resultados conflitantes, o que levou a não descartar totalmente a hipótese de competição em certas condições. Isso decorreu do fato que em um experimento (Figura 09), foi en

contrada uma estreita relação entre a queda da atividade da nitrogenase e a fase de enchimento dos grãos para plantas induzidas a florescer em duas idades diferentes. Nos outros experimentos (Figuras 07 e 17), a queda da atividade da nitrogenase foi independente da época da floração, formação da vagem e enchimento do grão, mesmo nos tratamentos de dias longos e flores removidas (Figura 17) onde não houve presença de estruturas reprodutivas. O pico de atividade máxima e o início da queda ocorreram com a mesma idade para todos os tratamentos independentes das fases vegetativas ou reprodutivas.

Para explicar os resultados conflitantes, aparentemente a única diferença notada entre os experimentos foi com referência as condições climáticas na época em que esses foram conduzidos. Os experimentos nos quais a presença dos frutos não teve nenhum efeito sobre a atividade da nitrogenase foram conduzidos no verão, nos meses de outubro a fevereiro (Figuras 07 e 17) época normal de cultivo da soja. Por outro lado, no experimento onde se verificou o efeito dos frutos sobre a atividade da enzima, foi conduzido fora de época nos meses de março a maio (Figura 09). Pelos dados climatológicos, os experimentos conduzidos no verão tiveram condições mais favoráveis em termos de luz e temperatura do que o experimento conduzido no outono (ver apêndice - Tabelas 01, 02 e 03). Pode-se inferir desses dados que a capacidade fotossintética das plantas cultivadas no outono foi mais baixa. Outros dados da literatura mostraram efeitos inconsistentes dos frutos na queda da nitrogenase. Por exemplo PATTERSON & LARUE (1983) observaram que em plantas de soja quando cultivadas em câmaras, os frutos influenciam na queda da atividade da nitrogenase e

quando cultivadas no campo, os frutos pouco influenciam. SCHWEITZER & HARPER (1980) observaram que, quando aumentaram a intensidade luminosa em plantas de soja induzidas a florescer, a floração ocorreu em duas idades diferentes e que a queda da atividade da nitrogenase independeu da presença dos frutos. Nas plantas controle (intensidade luminosa normal), a queda da atividade foi dependente da presença dos frutos. Nessos dois trabalhos citados a manutenção dos frutos teve efeito positivo sobre a atividade da nitrogenase quando as condições luminosas foram menos favoráveis. Chegou-se portanto a conclusão que o desvio de fotoassimilados pelos frutos aparentemente pode afetar a atividade da nitrogenase, mas esse efeito não se manifesta quando a capacidade fotossintética é maior.

Um outro fator relacionado com a fotossíntese e provavelmente também com a queda da atividade da nitrogenase é a relação fonte-dreno, uma vez que as folhas também são órgãos que participam ativamente da fixação de nitrogênio através da fotossíntese. Portanto, a remoção das folhas pode afetar sensivelmente a atividade da nitrogenase, uma vez que as folhas e caules tornam-se órgãos armazenadores quando as vagens são removidas (WITTENBACH, 1982; CRAFTS-BRANDER *et al.*, 1984).

Além da presença dos frutos ter sido frequentemente associada com a queda da nitrogenase, as fases iniciais de desenvolvimento reprodutivo também pareceram estar relacionadas com o aumento final da nitrogenase imediatamente anterior à atividade máxima. PEAT *et al.* (1981) observaram que em muitas leguminosas existe um aumento significativo na atividade da nitrogenase associado com a fase imediatamente após a floração

e evidenciaram que existe algum fator associado com a presença de estruturas reprodutivas, principalmente com as gemas florais estimulando a atividade da enzima. Esse fator não deve ser o mesmo que é responsável pela floração, uma vez que a remoção das flores anulou o efeito estimulatório sobre a enzima, os dados aqui apresentados estão de acordo com PEAT *et al.* (1981). Em vários experimentos foi observado um aumento acentuado na atividade da nitrogenase logo após a floração (Figuras 03, 07 e 17) a não ser no caso em que as plantas floresceram após a queda daquela atividade (Figura 07, tratamento V<sub>5</sub>). Na Figura 17, foi constatado que a remoção das flores praticamente eliminou esse aumento, de forma que a atividade máxima foi menor nesse tratamento do que nas plantas com a presença dos frutos.

Entretanto, as plantas mantidas em estado vegetativo (Dias Longos) também apresentaram atividade da nitrogenase mais alta do que as plantas sem frutos. PEAT *et al.* (1981), também observaram o mesmo resultado porém a explicação dada foi que a condição de Dias Longos proporcionou mais luz para a fotossíntese que por sua vez estimulou mais a atividade da nitrogenase.

No trabalho aqui realizado, essa explicação é inaceitável, uma vez que o período de maior intensidade luminosa para o tratamento de Dias Longos não envolveu luz fotossinteticamente ativa. Por outro lado, o cultivar Santa Rosa tem crescimento do tipo determinado e, conseqüentemente, as plantas induzidas a florescer param de crescer enquanto que, as de Dias Longos continuam crescendo. Esse crescimento extra por parte das plantas vegetativas, implica numa maior área fotos-

sintética o que poderia sustentar um aumento maior na atividade da nitrogenase. Além disso, o maior crescimento da parte aérea implica num maior consumo dos produtos de fixação de  $N_2$  para sustentar esse crescimento. RIGGLE *et al.* (1984) sugeriram que a remoção dos produtos da fixação de  $N_2$  pode ser um fator importante para assegurar atividades altas da nitrogenase. Tal fenômeno pode também explicar as atividades mais baixas da nitrogenase nas plantas com frutos removidos (Figura 17). PEAT *et al.* (1981) argumentaram que o efeito benéfico das estruturas reprodutivas sobre a atividade da nitrogenase pode ser mais hormonal do que um efeito dreno. Como pôde ser constatado, mais evidências são necessárias para solucionar a argumentação.

Em conclusão, o efeito mais claro do desenvolvimento reprodutivo sobre a atividade da nitrogenase foi o estímulo dado pelas estruturas reprodutivas mais jovens. Os dados também sugerem que a queda na atividade da nitrogenase em soja não ocorre em princípio, em função de um desvio de fotossintatos pelos frutos a não ser quando a relação fonte-dreno esteja mais baixa.

## V - CONCLUSÕES

As principais conclusões tiradas desse trabalho foram as seguintes:

- Plantas com flores removidas, apresentaram metade da atividade quando comparadas às plantas com frutos, mostrando que a presença do fruto jovem de alguma forma contribui positivamente para a atividade dos nódulos. Portanto, a presença destas estruturas é importante no processo de fixação de nitrogênio.

- As plantas com 50% de folhas removidas, apresentaram atividades mais baixas, semelhantes as das plantas sem flores.

- Os nódulos atingiram peso e quantidade máxima na mesma época, de modo geral, correspondentes aos picos de atividades da enzima nitrogenase.

- Medidas de peso fresco e número de nódulos não foram parâmetros adequados de avaliação da fixação de nitrogênio, pelo menos quando ocorra variações na taxa de fixação em função de algum efeito fisiológico.

- A queda da atividade dos nódulos, provavelmente ocorreu em consequência de uma idade limite para os mesmos, independente da idade da planta.

- A competição entre frutos e nódulos por fotossintatos em plantas de soja não foi o principal fator responsável pela queda na atividade da nitrogenase, embora possa ser em certas condições menos favoráveis.

## VI - RESUMO

O principal objetivo desse trabalho foi obter informações sobre a relação entre o desenvolvimento reprodutivo e a atividade dos nódulos. Com essa finalidade, foram utilizadas plantas de soja noduladas induzidas a florescer em idades diferentes. As plantas foram cultivadas em vermiculita, adubadas com solução nutritiva deficiente de nitrogênio e mantidas em casa de vegetação. O controle da floração foi feito nos estádios de desenvolvimento  $V_2$ ,  $V_5$  e  $V_8$ . Foram também realizados tratamentos com flores removidas e plantas mantidas em estado vegetativo (DL) durante todo o seu ciclo.

As medidas de avaliação da fixação de nitrogênio foram realizadas com o sistema de plantas intactas o qual permitiu usar as mesmas plantas durante todo o seu desenvolvimento. Quando essas medidas exigiam a quantificação e o peso fresco dos nódulos, era utilizado o sistema de raízes destacadas. O seccionamento da parte aérea foi feito somente antes de iniciar as medidas.

Os sistemas de plantas intactas e de raízes destacadas apresentaram atividades semelhantes da enzima nitrogenase, demonstrando que ambos os métodos são plenamente confiáveis; a vantagem do sistema intacto está em poder utilizar as mesmas plantas durante todo o experimento. Dos experimentos realizados nesse trabalho, dois foram conduzidos no verão, cujas plantas induzidas nos estádios  $V_2$  e  $V_5$  apresentaram curvas de atividades semelhantes, independentes da fase de desenvolvimento reprodutivo. Esse fato foi também confirmado pelos resultados dos tratamentos sem frutos e plantas mantidas em estado ve



getativo, os quais não modificaram a forma da curva.

Em outro experimento conduzido no outono, as plantas com os mesmos tratamentos ( $V_2$  e  $V_5$ ) apresentaram picos de atividades em idades diferentes, correspondentes à fase de desenvolvimento reprodutivo, ou seja de preenchimento do grão. Dessa forma, nas condições desse experimento, foi obtida uma clara relação entre a presença dos frutos e a queda da atividade da enzima nitrogenase. O comportamento diferente das plantas nesse experimento comparado com os demais foi atribuído às condições menos favoráveis de luz e temperatura.

Desses resultados ficou evidenciado que a competição entre frutos e nódulos por fatores sintáticos em plantas de soja, não é o principal fator responsável pela queda na atividade da nitrogenase, embora possa ser em certas condições menos favoráveis.

## VII - SUMMARY

The main objective of this study was to obtain information on the relationship between reproductive development and nodule activity. For this purpose, we used nodulated soybeans induced to flower at different ages. The plants were grown in vermiculite with a nutrient solution deficient in nitrogen, and maintained in a greenhouse. Flower induction was carried out at the  $V_2$ ,  $V_5$  and  $V_8$  stages of development. Other treatments included the removal of flowers and the maintenance of plants in the vegetative state by growing them under long-day conditions.

Measurements of nitrogen fixation were made with an intact plant system, which allows the use of the same plants throughout the growth cycle. When these measurements required the simultaneous quantification of nodule number and weight, a detached root system was used, where the shoot was sectioned immediately before the measurements.

The intact and detached root systems gave similar activities for nitrogenase, showing that one system is just as reliable as the other. One advantage of the intact system is the possibility of using the same plants throughout the growth cycle.

Of the experiments set up, two were carried out in the summer, where plants induced in the  $V_2$  and  $V_5$  stages produced activity curves with similar profiles and these for independent of the stage of reproductive development. This conclusion was confirmed by the data of the other treatments where fruits were removed and plants maintained vegetative under long

days, since such treatments did not modify the nitrogenase activity curves.

In another experiment, carried out in the autumn, plants induced at  $V_2$  and  $V_5$  produced peaks of activity at different ages corresponding to the reproductive phase, or specifically to the pod-filling stage. Therefore, under the conditions of this experiment at least, a clear relationship was obtained between the presence of fruits and the fall in nitrogenase activity. The different behaviour of the plants in this experiment compared with the others may be due to the less favorable conditions of light and temperature.

The main conclusion reached was that the competition between the fruits and nodules for photosynthates in soybeans is not the main reason for the fall in nitrogenase activity, although it could be in less favorable conditions.

## VII - BIBLIOGRAFIA

- ANTONIOW, I. I. & SPRENT, J. I., 1978. Growth and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L., at two irradiances. Ann. Bot. 43: 399-410.
- ABU-SHAKRA, S. S.; DONALD A. P.; RAY C. H., 1978. Nitrogen fixation and delayed leaf senescence in soybeans. Science, 199: 973-975.
- BAIRD, L. M. & WEBSTER, B. D., 1982. Morphogenesis of effective and ineffective root nodules in *Phaseolus vulgaris*. Bot. Gaz., 143: 41-61.
- BALANDREAU, J. & DUCERF, P. 1980. In (WE NEWTON, WH ORME-JOHNSON, eds.), Nitrogen Fixation, vol. II. Academic Press, New York, pp. 229-242.
- BETHLENFALVAY, G. J. & PHILLIPS, D. A. 1977. Effect of light intensity on the efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. Plant Physiol., 60: 871-878.
- BETHLENFALVAY, G. J.; NORRIS, R. J.; PHILLIPS, D. A. 1979. Effect of Bentazon, a Hill reaction inhibitor, on symbiotic nitrogen-fixing capacity and apparent photosynthesis. Plant Physiol. 63: 213-215.
- BETHLENFALVAY, G. J.; ABU-SHAKRA, S. S.; FISHBECK, L.; PHILLIPS, D. A. 1978. The effect of source-sink manipulation on nitrogen fixation in peas. Physiol. Plant. 43: 31-34.

- BONETTI, L. P., 1981. A Distribuição da Soja no Mundo. Em: A Soja no Brasil. Cap.I (ed.) Seção de Divulgação do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas pp. 01-05.
- BRUN, W. A., 1976. The relation of  $N_2$  fixation on photosynthesis. In: Hill, L. D., (ed.) World Soybean Research. S.1. Interstate, Danville, Illinois. pp. 135-143
- CHU, A. C. P. & ROBERTSON, A. G. 1974. The effects of shading and defoliation on nodulation and nitrogen fixation by white clover. Plant Soil, 41: 509-519.
- CRALLE, T. H. & HEICHEL, G. H., 1981. Nitrogen fixation and vegetative regrowth of alfafa and birds foot trefoil after successive harvests or floral debudding. Plant. Physiol., 67: 898-905.
- CRAFTS-BRANDNER, S. J.; BELOW, F. E.; HARPER, J. E., HAGEMAN, R. H., 1984. Effects of pod removal on metabolism and senescence of nodulating and non-nodulating soybean isolines. Plant Physiol., 75: 318-322.
- CHING, T. M.; HEDTKEI, S.; RUSSEL, S. A.; EVANS, H. J. 1975. Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-Grown Plants. Plant Physiol., 55; 769-798.
- DIXON, R. O. D., 1975. Relationship between nitrogenase systems and ATP-yelding processes. In: W.D.P. STEWART (ed.), Nitrogen Fixation in Free-Living Microorganisms. Cambridge University Press, Cambridge pp. 421-435.
- DUKE, S. H.; SCHRADER, L. E.; HENSON, C. A.; SERVAITES, J.C.; VEGELZANG, R. D.; PENDLETON, J. W., 1979. Low root temperature effects on soybean nitrogen metabolism and photosynthesis. Plant Physiol. 63: 956-962.

- FARNHAM, M. W.; GROSS, H. D.; CAPPY, J. J., 1986. Effect of light level on dinitrogen fixation and carbohydrate distribution in Virginia peanuts. Crop Science, 26: 311-316.
- FEHR, W. R., CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T. & PENNINGTON, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans *Glycine max* (L.) Merrill. Crop. Sci. 11: 929-931.
- FINN, G. A., 1978. Factors influencing the interactions among photosynthesis, translocation, and nitrogen fixation in soy beans. (*Glycine max* (L.) Merrill. I. MS Thesis, University of Minnesota, St. Paul.
- FINN, G. A. & BRUN, W. A., 1980. Water stress effects on CO<sub>2</sub> assimilation photosynthate partitioning stomatal resistance, and nodule activity in soybean. Crop. Sci. 20: 431-434.
- FREIRE, J. R. J. & VIDOR, C., 1981. Estudos no estado do Rio Grande do Sul. Em: A Soja no Brasil, Cap. IX (ed.) Seção de Divulgação do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas. pp. 417-425.
- GARY, A. F. & BRUN, W. A., 1982. Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on growth, nonstructural carbohydrate content, and root nodule activity in soybean. Plant Physiol., 69: 327-331.
- GIBSON, A. H., 1971. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and N fixation by legumes, In: T. A. Lie and E. G. Mulder (ed.) Biological N Fixation in Natural and Agricultural Habitats. Plant and Soil Special Volume, pp. 139-152.

- GIBSON, A. H., 1977. Agronomy and ecology. In: (ed.) R. W. Hardy and A. H. Gibson. A Treatise on Dinitrogen Fixation. Wiley Interscience, New York, p. 527.
- GOMES, M. A. F., 1982. Metabolismo de ureídos e asparagina durante a ontogenia do fruto de plantas de soja noduladas. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, p. 33.
- HAM, G. E.; LAWN, R. J.; BRUN, W. A., 1976. Influence of inoculation, nitrogen fertilizers and photosynthetic source sink manipulations of field-grown soybeans. In: P. S. Nutman (ed.) Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 239-253.
- HARDY, R. W.; BURNS, R. C.; HERVERT, R. R.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K., 1971. Biological Nitrogen Fixation: A Key to world Protein. Plant and Soil Special Volume, pp. 561-590.
- HARDY, R. W. F. & HAVELKA, U. D., 1973. Symbiotic  $N_2$  fixation; multifold enhancement by  $CO_2$  enrichment of field-grown soybeans. Plant Physiol., 48: 35-38. Suplemento.
- HARDY, R. W. F. & HAVELKA, U. D., 1975. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In: P. S. Nutman (ed.) Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 421-439.
- HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C., 1968. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: Laboratory and field evaluated. Plant Physiol., 43: 185-207.

- HARPER, J. E. & HAGEMAN, R. H., 1972. Canopy and seasonal Profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max.* L. Merrill)<sup>1</sup>. Plant Physiol. 49: 146-154.
- HAVELKA, U. D. & HARDY, R. W. F., 1976. N<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) fixation growth and yield response of field-grown peanuts (*Arachis hypogea* L.) When grown under ambient and 1500 ppm CO<sub>2</sub> in the foliar canopy. Agron. Abstr., p. 72.
- HUANG, C. Y.; BOYER, J. S.; VANDER, H. N., 1975. Limitation of acetylene reduction (nitrogen fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials. Plant Physiol. 56: 228-232.
- IMSANDE, J. & RALSTON, E. J. 1982. Dinitrogen fixation in male-sterile soybeans. Plant Physiol. 69: 745-746.
- KARL, C. H., 1969. *Glycine max.* (L.) Merrill. In: Evans, L. T., Cap.3 (ed) The Induction of Flowering Cornell University press pp.62-89
- KASTER, M. & BONATO, E. R., 1981. Evolução da cultura da soja no Brasil. Em: A Soja no Brasil. Cap.III (ed.) Seção de Divulgação do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas pp. 58-59.
- KLUCAS, R. V., 1974. Studies on soybean nodule senescence. Plant Physiol. 54: 612-616.
- LATIMORE, M. J.; GIDDENS, J.; ASHLEY, D. A., 1977. Effect of ammonium and nitrate N upon photosynthate supply and N fixation by soybeans. Crop. Sci. 17: 399-404.
- LAWN, R. J. & BRUN, W. A., 1974. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans, I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. Crop. Sci. 14: 11-16.



- LAWRENCE, C. D., 1980. Limiting factors in nitrogen fixation. Plant Physiol. 11: 41-44.
- LAWRIE, A. C. & WHEELER, C. T., 1974. The effects of flowering and fruit formation on the supply of photosynthetic assimilates to the nodules of *Pisum sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen. New Phytol. 73: 1119-1127.
- LOPES, E. S. & GIARDINI, A. R., 1981. Estudos no estado de São Paulo. Em: A Soja no Brasil, Cap.IX (ed.) Seção de Divulgação do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas. pp. 425-436.
- MAGALHÃES, A. C., 1981. Metabolismo do Nitrogênio no crescimento da planta. Em: A Soja no Brasil, Cap.IV (ed.) Seção de Divulgação do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas pp. 149-152.
- MAGUE, T. H. & BURRIS, R. H., 1972. Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. New Phytol., 71: 272-286.
- MALIK, N. S. A., 1983. Grafting experiments on the nature of the decline in  $N_2$  fixation during fruit development in soybeans. Physiol. Plant., 57: 561-564.
- MASTERSON, C. L. & MURPHY, P. M., 1976. Application of the acetylene reduction technique to the study of nitrogen fixation by white clover in the field. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. (Ed.) P. S. Nutman, Cambridge University Press, London, p. 585.
- MEDERSKI, J.J. & STREETER, J.G., 1977. Continuous, automated acetylene reduction assays using intact plants. Plant Physiol., 59: 1076-1081.
- MINCHIN, F. R. & SUMMERFIELD, R. J., 1978. Potential yield improvement in cowpea (*Vigna unguiculata*: The role of nitrogen nutrition. Ann. Appl. Biol. 88: 468-473.

- MINCHIN, F. R.; HUXLEY, P. A.; SUMMERFIELD, R.J., 1976. Effect of root temperature on growth and seed yield in cowpea (*Vigna unguiculata*). Exp. Agric. 12: 279-288.
- MINCHIN, F. R.; WITLY, J. F.; SHEEHY, J. E.; MULLER, M., 1983. A major error in the acetylene reduction assay: Decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. J. Exp. Bot., 34: 641-649.
- MIRANDA, M. P. & SODEK, L. 1982. Controle da floração de soja (cv. Santa Rosa) como meio de obter plantas de tamanho determinado em qualquer época do ano. XXXIV S.B.P.C., Campinas - resumo 1.1 - p. 10.
- MORRIS, D. A., 1982. Hormonal regulation of sink invertase activity. Implications for the control of assimilate partitioning. In: WAREING, P. F. (ed.) Plant Growth Substances. Academic Press, London, p.p. 659-668.
- MOUSTAFFA, E.; BALL, R.; FIELD, T. R. O., 1969. The use of acetylene reduction to study the effect of nitrogen fertilizer and defoliation on nitrogen fixation by field-grown white clover. J. Agric. Res., 12: 691-696.
- NDUNGURU, B. J.; SUMMERFIELD, R. J.; STEWART, K. A., 1976. Effects of source-sink manipulation on seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). I. Depodding. Trop. Agric. 55:
- OMETTO, J. L., 1968. Estudos das relações entre radiação global, radiação líquida e insolação. Tese de Doutorado, ESALQ-USP, Piracicaba, p. 64.

- PANDEY, R. K., 1983. Influence of defoliation on seed yield in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in a subtropical environment. Field Crops. Res., 7: 249-256.
- PATE, J. S., 1966. Photosynthesizing leaves and nodulated roots as donors of carbon to protein of the shoot of the field pea (*Pisum arvense* L.). Ann. Bot., 30: 93-109.
- PATTERSON, T. G. & LARUE, T. A., 1983. Nitrogen fixation ( $C_2H_2$ ) and ureide content of soybeans; environmental effects and source-sink manipulations. Crop. Sci., 23: 819-824.
- PEAT, J. R.; MINCHIN, F. R.; JEFFCOAT, B.; SUMMERFIELD, R. J., 1981. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soya bean. Ann. Bot., 48: 177-182.
- PFEIFFER, N. E.; MALIK, N. S. A.; FRED, W. W., 1983. Reversible dark-induced senescence of soybean root nodules. Plant Physiol. 71: 393-399.
- QUEBEDEAUX, B; HAVELKA, U. D.; LIVAR, K. L.; HARDY, R. W. F., 1975. Effect of altered  $pO_2$  in the aerial part of soybean on symbiotic  $N_2$  fixation. Plant Physiol., 56: 761-764.
- QUISPEL, A. 1974. Prerequisites for biological nitrogen in root nodule symbioses. In: A. Quispel (ed.). The Biology of Nitrogen Fixation. North Holland Publishing Co. Amsterdam, pp.719-745.
- RIGGLE, B. D.; WIEBOLD, W. J.; KENWORTHY, W. J., 1984. Effect of photosynthate source-sink manipulation on dinitrogen fixation of male-fertile and male-sterile soybean isolines. Crop. Sci., 24: 05-08.

- ROCHA, H. M.; ALVIM, P. T.; DOBEREINER, J. 1970. Influência da intensidade da radiação solar sobre o crescimento e a fixação simbiótica do nitrogênio pela soja. Turrialba, 20 (3): 293-298.
- ROUGHLEY, R. J., 1970. The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and N-fixing efficiency of the root nodules of *Thiobolium subterraneum*. Ann. Bot., 34: 631-646.
- SCHREVER, D. A. van. 1959. Effects of added sugars and nitrogen on nodulation of legumes. Plant Soil, 11: 93-112.
- SCHUBERT, K. R. & RYLE, G. J. A. 1980. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated leguminous. In: SUMMERFIELD R. J. & BUNTING, A. H., (ed.) Advances in Legume Science. H.M.S.O., London, p.p. 85-86.
- SCHWEITZER, L. E. & HARPER, J. E., 1980. Effect of light dark and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybean. Plant Physiol., 65: 01-06.
- SHELDRAKE, A. R. & NARAYANAN, A., 1976. Report: Pulse Physiology, s.2., ICRISAT, pt. 1: 43-56.
- SLOGER, C.; BEZDICEK, D. MILBERG, R.; BOONKERD, N., 1976. Seasonal and diurnal variations in  $N_2$  ( $C_2H_2$ ) fixing activity in field soybeans. In: P. S. Nutman, Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants, Cambridge University Press, London p. 584.
- STREETER, J. G., 1974. Growth of two soybean shoots on a single root. J. Exp. Bot., 25: 189-198.

- SPRENT, J. I. & BRADFORD, A. M., 1976. Nitrogen fixation in field beans (*Vicia faba*) as affected by population density, shading and its relationship with soil moisture. J. Agric. Sci., 88: 303-313.
- SPRENT, J. I., 1972. The effects of water stress on nitrogen fixing roots nodules: Effect on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max*. New Phytol., 71: 603-611.
- SNEDECOR, G. W., 1965. Statiscal methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, U. S. A. p. 534.
- TEIGEN, J. B. & VORST, J. J., 1975. Soybean response to stand reduction and defoliation. Agron. J., 67: 813-816.
- THIBODEAU, P. S. & JAWORSKI, E. G., 1975. Paterns of nitrogen utilization in the soybean. Planta (Berl.) 127: 133-147.
- THIMANN, K. V. & SATLER, S. O., 1979. Relation between leaf senescence and stomatal closure: Senescence in light. Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A., 76: 2295-2298.
- TRANG, K. M. & GIDDENS, J. <sup>1979</sup> Shading and Temperature effect on soybeans, Agron. Journal, 72 - pp 305-308.
- VILLA NOVA, N. A. 1974. O balanço de energia terrestre. Apostila de Física e Meteorologia. Departamento de Física e Meteorologia, ESALQ-USP. Piracicaba, pp. 125-148.
- WASHUA, T. A. T. & MILLER, D. A., 1978. Effects of shading on the N<sub>2</sub>-fixation, yield and plant composition of field grown soybeans. Agron. J., 70: 387-392.
- WHEELER, C. T., 1971. The causation of diurnal changes in nitrogen fixation in the nodules of *alnus glutinosa*. New Phytol., 70: 487-495.

WILSON, R. F.; BURTON, J. W.; BUCK, J. A.; BRIM, C. A.,  
1978. Studies on genetic male sterile soybean. I. Distribution of plant carbohydrate and nitrogen development. Plant Physiol., 61: 838-884.

WITTENBACH, V. A., 1982. Effect of pod removal on leaf senescence in soybeans. Plant Physiol., 70: 1544-1548.

YATES, M. G. & EADY, R. R., 1980. The physiology and regulation of nitrogen fixation. In: SUBRA RAO (ed.). Recent advances in Biological Nitrogen Fixation. Arnold, London, pp. 88-120.

## IX - APÊNDICE

TABELA 01 - Dados climatológicos dos dias das medidas da re  
dução de acetileno referente a figura 07.

| PERÍODO | TEMPERATURA |      |       | ENERGIA<br>RADIANTE<br>(estufa)         | UMIDADE<br>RELATIVA |
|---------|-------------|------|-------|-----------------------------------------|---------------------|
|         | MÁX.        | MIN. | MÉDIA |                                         |                     |
| dias    | °C          |      |       | Cal.cm <sup>-2</sup> .dia <sup>-1</sup> | %                   |
| 40 a 60 | 31,8        | 19,0 | 25,4  | 408,9                                   | 60,5                |
| 61 a 80 | 27,5        | 17,1 | 22,3  | 345,6                                   | 72,4                |



TABELA 02 - Dados climatológicos dos dias das medidas da re  
dução de acetileno referentes à Figura 09.

| PERÍODOS | TEMPERATURAS |      |       | ENERGIA<br>RADIANTE<br>(Estufa)         | UMIDADE<br>RELATIVA |
|----------|--------------|------|-------|-----------------------------------------|---------------------|
|          | MAX.         | MIN. | MÉDIA |                                         |                     |
| dias     | °C           | °C   | °C    | cal.cm <sup>-2</sup> .dia <sup>-1</sup> | %                   |
| 46 a 65  | 26,8         | 17,2 | 21,7  | 227,4                                   | 76,7                |
| 66 a 85  | 25,3         | 13,3 | 19,3  | 265,3                                   | 73,0                |

TABELA 03 - Dados climatológicos dos dias das medidas da redução de acetileno referentes à Figura 17.

| PERÍODO  | TEMPERATURAS |      |       | ENERGIA<br>RADIANTE<br>(estufa)         | UMIDADE<br>RELATIVA |
|----------|--------------|------|-------|-----------------------------------------|---------------------|
|          | MAX.         | MIN. | MÉDIA |                                         |                     |
| dias     | °C           | °C   | °C    | cal.cm <sup>-2</sup> .dia <sup>-1</sup> | %                   |
| 60 a 90  | 30,1         | 18,4 | 24,2  | 377,4                                   | 63,3                |
| 90 a 120 | 30,3         | 19,4 | 24,9  | 363,9                                   | 67,8                |

TABELA 04

Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de soja *Glycine max.* (L.) Merrill segundo FEHR *et al.* (1971).

| Estádios       | Descrição                                                                 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| V <sub>0</sub> | cotilédones abertos                                                       |
| V <sub>1</sub> | folha primária "aberta"                                                   |
| V <sub>2</sub> | 1ª folha trifoliolada "aberta"                                            |
| V <sub>3</sub> | 2ª folha trifoliolada "aberta"                                            |
| V <sub>4</sub> | 3ª folha trifoliolada "aberta"                                            |
| .              | .                                                                         |
| .              | .                                                                         |
| .              | .                                                                         |
| V <sub>n</sub> | n folha trifoliolada "aberta"                                             |
| R <sub>1</sub> | Uma flor aberta                                                           |
| R <sub>2</sub> | Flor aberta no nó imediatamente abaixo do nó mais alto com folha "aberta" |
| R <sub>3</sub> | Vagem de 0,5 cm num dos 4 nós mais altos com folhas "abertas"             |
| R <sub>4</sub> | Vagem de 2 cm num dos 4 nós mais altos com folhas "abertas"               |
| R <sub>5</sub> | Início do desenvolvimento das sementes                                    |
| R <sub>6</sub> | Sementes de tamanho máximo (ainda verdes).                                |
| R <sub>7</sub> | Vagens amarelescendo: 50% das folhas amarelas (~ maturidade fisiológica)  |
| R <sub>8</sub> | 95% das vagens marrons (~ maturidade para fins de colheita)               |