

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

CUSTO ENERGÉTICO DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO  
EM SOJA INOCULADA COM ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum*  
COM DIFERENTES CAPACIDADES DE RECICLAR  $H_2$

ROSÂNGELA STRALIOTTO

SOB ORIENTAÇÃO DA DOUTORA:

MARIA CRISTINA PRATA NEVES

Tese submetida como requisito  
parcial para a obtenção do grau  
Mestre em Solos,  
Área de Concentração em  
Microbiologia do Solo.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

JULHO, 1990

CUSTO ENERGÉTICO DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO  
EM SOJA INOCULADA COM ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum* COM  
DIFERENTES CAPACIDADES DE RECICLAR  $H_2$ .

ROSÂNGELA STRALIOTTO.

Aprovado em: Dez / Julho / 1990

Dr<sup>ª</sup> Johanna Döbereiner

Dr. Robert Michael Boidey

Dr<sup>ª</sup> Maria Cristina Prata Neves

Johanna Döbereiner  
Robert Michael Boidey  
Maria Cristina Prata Neves

Dedico este trabalho  
aos meus pais,  
ao Pimentel,  
ao Vítor.

## AGRADECIMENTOS

- A DEUS;
- A Dra. Maria Cristina Prata Neves pela orientação e apoio durante todo o período da pesquisa;
- A Dra. Johanna Döbereiner pela oportunidade de trabalhar com fixação biológica de nitrogênio;
- A EMBRAPA/CNPBS pela oportunidade de realizar o trabalho;
- Ao Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar o curso;
- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos e amizade;
- A CAPES pelo auxílio financeiro;
- Ao Dr. Robert Michael Boddey pelo auxílio e sugestões nas análises de espectrometria de massa;
- Ao Dr. Segundo Urquiaga Caballero pelas sugestões na condução dos experimentos;
- A Assistente de Pesquisa Rojane Chapeta Peixoto, Virgínia e Eliane pelo incentivo e auxílio na condução dos experimentos;
- Ao Sr. Jorge, Mazinho, Moacyr, João Andrade, Cláudio,

Aldemir, Hélio, Luiz, Adilson Costa, Fernando, Roberto, Adilson Madeira, Wanderley Andrade, Jair, e demais funcionários do CNPBS que colaboraram para a realização deste trabalho;

- A Zilda, Dorimar e Margarida pela incansável colaboração nos trabalhos de biblioteca e pela normalização das referências bibliográficas;
- Ao Luciano Lourenço pelos trabalhos de digitação;
- Aos colegas pela amizade e incentivo;
- Aos amigos.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA .....	04
2.1 Custo energético teórico da fixação do nitrogênio molecular .....	05
2.1.1 Considerações termodinâmicas .....	05
2.1.2 Custo energético celular .....	09
2.1.3 Eficiência na utilização de energia para fixação de nitrogênio .....	15
2.1.3.1 Evolução de hidrogênio .....	16
2.1.3.2 Hidrogenases e a economia do nódulo .....	17
2.2 Métodos experimentais para avaliação do custo energético da fixação de nitrogênio.....	25
2.3 Variação diurna e ontogenética do custo energético da fixação de nitrogênio .....	46
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Experimento I .....	52
3.1.1 Condução do experimento .....	52
3.1.2 Coleta de dados .....	54
3.1.2.1 Evolução de H <sub>2</sub> .....	54
3.1.2.2 Atividade da nitrogenase .....	55
3.1.2.3 Cálculo da eficiência relativa .....	55
3.2 Experimento II .....	56
3.2.1 Condução do experimento .....	56
3.2.2 Sistema para preparação do gás <sup>15</sup> N <sub>2</sub> .....	57

3.2.2.1	Produção de $^{15}\text{N}_2$ .....	60
3.2.3	Sistema para incubação das plantas com $^{15}\text{N}_2$ .....	62
3.2.4	Medições de ARA e evolução de $\text{H}_2$ .....	63
3.2.5	Determinação da % de átomos de $^{15}\text{N}$ em excesso nas amostras gasosas provenientes do sistema de incubação .....	64
3.2.6	Cálculo do N fixado .....	65
3.3	Experimento III .....	66
3.3.1	Condução do experimento .....	67
3.3.2	Sistema de fluxo contínuo de gases para leitura da evolução de $\text{CO}_2$ e redução de acetileno .....	67
3.3.2.1	Preparação dos vasos .....	67
3.3.2.2	Sistema de fluxo contínuo de gases .....	68
3.3.2.3	Calibração do IRGA .....	70
3.3.2.4	Procedimento para leitura da evolução de $\text{CO}_2$ e redução de acetileno .....	72
3.3.2.5	Análises cromatográficas .....	73
3.3.2.6	Cálculo dos custos energéticos de ativi- dade da nitrogenase e de crescimento e manutenção de raízes e nódulos e da por- centagem da respiração acoplada a ativi- dade da nitrogenase .....	74
3.4	Experimento IV .....	76
3.4.1	Condução do experimento .....	76

3.4.2	Coleta de dados .....	76
4 -	RESULTADOS .....	78
4.1	Experimento I .....	78
4.2	Experimento II .....	81
4.3	Experimento III .....	86
4.4	Experimento IV .....	92
5 -	DISCUSSÃO .....	97
5.1	Variação nas atividades da nitrogenase, evo- lução de $H_2$ e $CO_2$ e eficiência relativa duran- te o ciclo reprodutivo da planta .....	97
5.2	Fator de conversão $C_2H_2:N_2$ .....	100
5.3	Custo energético de atividade da nitroge- nase .....	105
6 -	CONCLUSÕES .....	115
7 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	118



## LISTA DE TABELAS

1 - Energia de ligação entre os átomos envolvidos nas reações de redução do nitrogênio .....	06
2 - Passos hipotéticos da redução de nitrogênio pela nitrogenase e mudanças de entalpia associadas às reações .....	07
3 - Estequiometria das reações da nitrogenase .....	13
4 - Valores de custo energético da atividade da nitrogenase obtidos através de diferentes metodologias ....	27
5 - Variação na atividade de redução de acetileno, evolução de H <sub>2</sub> e eficiência relativa (ER) durante o ciclo reprodutivo da soja cv. Doko, inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	80
6 - Percentagem de átomos de <sup>15</sup> N em excesso presentes na fase gasosa no início e final do período de incubação de raízes noduladas de plantas intactas de soja .....	82
7 - Variação natural na AZ <sup>15</sup> N presentes nas plantas de soja usadas como controle, não expostas ao gás enriquecido .....	83
8 - Efeito de estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> com diferentes capacidades de reciclar H <sub>2</sub> no peso seco, ZN e N total e na incorporação de <sup>15</sup> N <sub>2</sub> em soja cv. Doko aos 30 DAE .....	84
9 - Atividade da nitrogenase avaliada pela atividade de	

- redução de acetileno e pela incubação de raízes noduladas de plantas intactas em  $^{15}\text{N}_2$ , evolução de  $\text{H}_2$ , eficiência relativa (ER), razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  e razão  $\text{C}_2\text{H}_4/(3\text{N}_2+\text{H}_2)$  em soja cv. Doko inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* com diferentes capacidades de reciclar  $\text{H}_2$  ..... 85
- 10 - Peso seco de nódulos e parte aérea durante o estágio reprodutivo de soja cv. Doko inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes CB 1809, DF 383, SEMIA 587 e 29W ..... 88
- 11 - Valores do coeficientes da regressão - b (custo de atividade da nitrogenase), do intercepto do eixo y - a (custo de manutenção) e dos coeficientes de determinação -  $r^2$ , das retas que definem a relação entre a redução de acetileno e a respiração em raízes noduladas de soja cv. Doko, submetidas a  $p\text{O}_2$  decrescente em um sistema de fluxo contínuo de gases ..... 89
- 12 - Variação da percentagem da respiração das raízes acoplada a atividade da nitrogenase durante o estágio reprodutivo de soja cv. Doko inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes CB 1809, DF 383, SEMIA 587 e 29W ..... 92
- 13 - Coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre as taxas de evolução de  $\text{CO}_2$  e ARA de raízes noduladas de soja cv. Doko submetidas a  $p\text{O}_2$  decrescente em um sistema de fluxo contínuo de gases. Plantas inoculadas com

<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , estirpes CB 1809 e 29W	
avaliada durante um ciclo diurno .....	93

## LISTA DE FIGURAS

1 - Modelo esquemático do fornecimento de energia para fixação de nitrogênio em bactérias aeróbicas .....	12
2 - Evolução de CO <sub>2</sub> e ARA de raízes noduladas de trevo branco no sistema de fluxo contínuo de gases .....	43
3 - Correlação linear entre a produção de CO <sub>2</sub> e ARA em raízes noduladas de trevo branco, expostas a pO <sub>2</sub> decrescente .....	44
4 - Sistema utilizado para incubação das plantas em <sup>15</sup> N <sub>2</sub> .....	58
5 - Sistema utilizado para preparação do gás <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ....	59
6 - Sistema de fluxo contínuo de gases .....	69
7 - Sistema para calibração do IRGA .....	71
8 - Correlação linear entre a produção de CO <sub>2</sub> e C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> em raízes noduladas de soja inoculadas com a estirpe CB 1809, expostas a pO <sub>2</sub> decrescente .....	75
9 - Variação na ARA e evolução de CO <sub>2</sub> durante o ciclo reprodutivo de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809, 29W, DF 383 e SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	88
10 - Variação no custo energético da atividade da nitrogênase durante o ciclo reprodutivo da soja cv. Doko, inoculada com as diferentes estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	90
11 - Efeito da estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> no	

	custo energético da atividade da nitrogenase em soja cv. Doko .....	91
12 -	Variação no custo energético total de manutenção de raízes (r) e nódulos (n), durante o ciclo reprodutivo da soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809, 29W, DF 383 e SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	91
13 -	Variação diurna na ARA e evolução de CO <sub>2</sub> , medida no sistema de fluxo contínuo de gases em soja cv. Doko inoculada com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , estirpes CB 1809 e 29W .....	94
14 -	Variação diurna no custo energético da atividade da nitrogenase em soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ..	94
15 -	Variação diurna do custo energético total de manutenção de raízes e nódulos em soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	96
16 -	Variação diurna no custo energético da fixação de nitrogênio em soja cv. Doko, inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	110
17 -	Variação no custo energético da fixação de nitrogênio durante o ciclo reprodutivo de soja cv. Doko, inoculada com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , estirpes CB 1809, DF 383, SEMIA 587 e 29W .....	110
18 -	Efeito da estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> no custo energético da fixação de nitrogênio em soja	

cv. Doko ..... 113

## RESUMO

O custo energético de atividade da nitrogenase, de fixação de nitrogênio e de crescimento e manutenção de raízes e nódulos de soja (*Glucine max*), foi avaliado em raízes noduladas de plantas intactas, inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* apresentando diferentes capacidades de reciclar  $H_2$ , no período reprodutivo e durante um ciclo diurno. O custo respiratório de atividade da nitrogenase foi calculado diretamente e distinguido do custo de manutenção através de curvas de regressão entre a atividade da nitrogenase (ARA) e a evolução de  $CO_2$  de raízes noduladas expostas a  $pO_2$  decrescentes em um sistema de fluxo contínuo de gases. Os valores de custo energético de fixação de nitrogênio foram obtidos pela razão  $C_2H_2:N_2$  de cada estirpe, calculada pela razão entre a ARA e a incorporação  $^{15}N_2$ . Os custos energéticos de atividade da nitrogenase ( $\mu\text{moles } CO_2/\mu\text{moles } C_2H_2$ ) e de fixação de nitrogênio ( $\mu\text{moles } CO_2/\mu\text{moles } N_2$ ) variaram durante o ciclo reprodutivo para todas as estirpes testadas. No florescimento estes valores foram significativamente menores do que no período inicial de formação das vagens. No período de enchimento de grãos não foi observada correlação entre a ARA e a evolução de  $CO_2$ , de modo que neste período não foram calculados os valores dos custos respiratórios. Os custos de manutenção apresentaram maiores valores no florescimento, época de intenso crescimento dos nódulos. Não houve variação diurna no custo energético de atividade da nitrogenase e fixação de nitrogênio. O custo energético de fixação de nitrogênio foi menor para a estirpe com maior capacidade de reciclar  $H_2$  (eficiência relativa  $> 0,9$ ) tanto durante o ciclo diurno quanto durante o ciclo reprodutivo da planta, indicando um efeito da capacidade de reciclagem de  $H_2$  desta estirpe na economia de carbono do nódulo.

## SUMMARY

The respiratory costs of nitrogenase activity, nitrogen fixation and of growth and maintenance of roots and nodules were evaluated in nodulated roots of soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strains with different abilities of recycling  $H_2$ , in the reproductive stage and during a diurnal cycle. The energetic costs were determined directly and distinguished from growth and maintenance costs of roots and nodules, using the linear regression of respiration on nitrogenase activity. Nodulated roots of intact plants were exposed to decreasing  $pO_2$  levels in an open flow-through gas system. To obtain absolute carbon costs for  $N_2$ -fixation from the regression line values, the ratio of  $C_2H_2:N_2$  was obtained by comparing  $C_2H_2$  reduction and  $^{15}N_2$  incorporation for each strain. Respiratory costs of nitrogenase activity ( $\mu\text{moles } CO_2/\mu\text{moles } C_2H_2$ ) and nitrogen fixation ( $\mu\text{moles } CO_2/\mu\text{moles } N_2$ ) varied with plant age for all strains tested. At flowering the values were significantly lower than at early pod fill. At late pod fill, no correlation was observed between  $C_2H_2$  reduction and  $CO_2$  evolution. The growth and maintenance costs also varied with higher values observed at flowering, period of intense nodule growth. No diurnal variation in the respiratory costs of nitrogenase activity or nitrogen fixation was observed. The energetic costs of nitrogen fixation ( $\mu\text{moles } CO_2/\mu\text{moles } ^{15}N_2$ ) were lower for the HUP<sup>+</sup> strain (CB 1809) for all harvests, indicating a possible effect of hydrogen recycling ability of the strain on the carbon economy of the nodule.



## 1 INTRODUÇÃO:

Uma quantidade considerável de energia é gasta na síntese de amônia a partir do nitrogênio molecular, seja no processo da fixação biológica ou no processo industrial. No processo industrial, a energia utilizada para esta reação provém de combustível fóssil, não renovável. No processo biológico, a energia solar coletada através da fotossíntese supre as necessidades energéticas da reação. Considerando-se o caso das plantas leguminosas em sua associação com bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, cerca de 10 a 30% do total líquido de carbono assimilado pela planta pode ser consumido pela reação durante os períodos de maior demanda para nitrogênio (Schubert &

Ryle, 1980). Tendo em vista a importância econômica e ecológica da utilização destas simbioses, esforços tem sido feitos visando conhecer os mecanismos que conduzem a uma maior eficiência energética da fixação biológica nestes sistemas.

Termodinamicamente, a redução de nitrogênio a amônia é uma reação exotérmica e conseqüentemente deveria ocorrer espontaneamente. No entanto, tanto no processo industrial como no biológico, são requeridos catalizadores adequados e uma grande quantidade de energia para romper a barreira da energia de ativação da reação (Salsac et al., 1984). No processo biológico o catalizador é a nitrogenase, enzima que além de reduzir o nitrogênio, simultaneamente reduz prótons a  $H_2$ , tendo como fonte de energia a hidrólise de ATP (Winter & Burris, 1976). A produção de  $H_2$  representa portanto uma perda de energia no processo, porém algumas bactérias, possuem a capacidade de reciclar o  $H_2$  produzido durante a fixação de nitrogênio, através de um sistema de hidrogenases (Dixon, 1972 e Ruiz-Argueso et al., 1978 ; Schubert & Ryle, 1980), tornando a reação energeticamente mais eficiente (Salminen & Nelson, 1984).

O custo energético da fixação de nitrogênio tem sido estimado experimentalmente por muitos autores, aplicando várias técnicas que relacionam o gasto de carbono para fixação de nitrogênio. Os valores obtidos, representando geralmente a soma dos custos de crescimento e manutenção de

raízes noduladas, fixação de nitrogênio e assimilação de amônia, variam de 0,4 a 20,0g carbono/g de nitrogênio fixado (Phillips, 1980).

Vários fatores ambientais ou intrínsecos da simbiose podem afetar o custo energético da fixação de nitrogênio. Estirpes que evoluem  $H_2$  ( $hup^-$ ) e as que não evoluem ( $hup^+$ ), podem apresentar diferenças na utilização de carboidratos e na assimilação de nitrogênio nos nódulos. Variações diurnas na alocação de carbono e energia para os nódulos podem provocar flutuações diferenciadas no custo energético da fixação de nitrogênio para estas estirpes, considerando ainda que fatores ambientais afetam a taxa de alocação de elétrons para o  $H_2$  e a reciclagem deste (Rainbird et al., 1983b). Além disso, foram observados efeitos de diferentes estirpes de *Rhizobium* no custo respiratório relacionado à reação da fixação de nitrogênio durante o ciclo reprodutivo da planta (Neves, et al., 1981).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o custo energético da atividade da nitrogenase e da fixação de nitrogênio, bem como da manutenção de raízes e nódulos de soja (*Glycine max*) inoculada com estirpes possuindo diferentes capacidades de reciclar  $H_2$ , durante o período reprodutivo e um ciclo diurno.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A fixação do nitrogênio atmosférico é um processo dispendioso tanto a nível industrial quanto a nível biológico. Há evidências de que a fixação de nitrogênio nos bacteróides é frequentemente limitada pelo suprimento de fotossintatos da planta hospedeira (Lawrie & Wheeler, 1973, 1975a; Hardy & Havelka, 1975, 1976; Pate, 1977 e Ryle *et al.*, 1988). No entanto, atualmente acredita-se que, em condições normais, a atividade do nódulo não se encontra limitada por fotossintatos mas pelo  $O_2$ , devido a atuação, no interior do nódulo, de uma barreira à difusão de  $O_2$  (Sheehy *et al.*, 1987). De qualquer modo, a maximização da eficiência dos sistemas simbióticos em utilizar os fotossintatos produzidos pela planta hospedeira é de primordial importância para o

aumento da produtividade das leguminosas. Infelizmente, a quantificação da eficiência na utilização de energia (eficiência energética) da fixação biológica em um sistema tão complexo como os nódulos é difícil, uma vez que envolve uma larga gama de processos da simbiose ainda não totalmente esclarecidos. Diversos aspectos físico-químicos, bioquímicos e fisiológicos tem sido estudados nos últimos anos visando conhecer um pouco mais da economia relacionada ao processo da fixação biológica de nitrogênio.

## 2.1 Custo energético teórico da fixação do nitrogênio molecular:

### 2.1.1 Considerações termodinâmicas:

De acordo com Gutschick (1978), a reação da fixação de nitrogênio pode ser escrita da seguinte forma:



Os átomos da molécula de nitrogênio ( $\text{N} \equiv \text{N}$ ) são ligados por uma tripla ligação a qual é a mais forte ligação covalente conhecida entre dois átomos (Tabela 1). A quebra

destas ligações requer um alto consumo de energia, conferindo grande estabilidade à molécula. Apesar disso, a síntese de amônia a partir do nitrogênio molecular e  $H_2$  é uma reação exergônica (Tabela 2), uma vez que mais energia é liberada pela formação de seis ligações N - H do que é consumido pela quebra da tripla ligação da molécula de nitrogênio e das ligações entre as três moléculas de  $H_2$  (Salsac et al., 1984).

TABELA 1: Energia de ligação entre os átomos envolvidos nas reações de redução do nitrogênio (adaptado de Salsac et al., 1984).

---

Energia de ligação	
	Kcal.mol <sup>-1</sup>
N = N	+226
- N = N -	+100
N - N	+38
H - H	+104
= N - H	+53

---

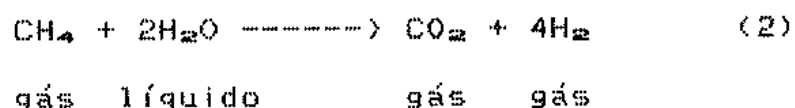
TABELA 2: Passos hipotéticos da redução de nitrogênio pela nitrogenase e mudanças de entalpia associadas às reações (Stiefel, 1977).

$\text{N} \equiv \text{N} \xrightarrow[2\text{H}^+]{2\text{e}^-} \text{H} - \text{N} \equiv \text{N} - \text{H} \xrightarrow[2\text{H}^+]{2\text{e}^-} \text{N} = \text{N} \xrightarrow[2\text{H}^+]{2\text{e}^-} 2 \text{N} - \text{H}$		
Reações	$\Delta H^\circ$ Kcal.mol <sup>-1</sup>	$\Delta G^\circ$ Kcal.mol <sup>-1</sup>
$\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$	-22	-8
$\text{N}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{H}_2$	+36,0	+51
$\text{N}_2\text{H}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4$	-13,3	-13,0
$\text{N}_2\text{H}_4 + \text{H}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$	-44,7	-46,0

As considerações termodinâmicas acima só podem ser adequadamente aplicadas a sistemas livres de células nos quais as concentrações dos reagentes e produtos são conhecidas. Utilizando estas reações, Bergersen (1971) calculou em cerca de 85 Kcal.mol NH<sub>4</sub><sup>+-1</sup>, o dispêndio energético da nitrogenase, valor que, em condições biológicas corresponde a 6 moles de ATP.mol NH<sub>4</sub><sup>+-1</sup>.

Como a oxidação da glicose libera 750 Kcal/mol (Gutsckick, 1978) e considerando uma perfeita transferência de energia, cerca de 0,11 moles de glicose devem ser oxidados na produção de 1 mol de amônia, ou seja, 0,4 g de

carbono(C).g de nitrogênio(N) fixado<sup>-1</sup>. Na realidade, como veremos a seguir (Item 2.1.3.1), devido a perda de ATP e de poder redutor na produção de H<sub>2</sub> pela nitrogenase, o consumo teórico está em torno de 3,52 g C.g N<sup>-1</sup> Gutschick (1978), o que dá uma eficiência de transferência de energia de 16%. Utilizando estes dados termodinâmicos teóricos, é possível comparar a eficiência da transferência de energia em sistemas biológicos e no processo industrial. No processo industrial, se houvesse eficiência perfeita na transferência de energia, 0,415 moles de CH<sub>4</sub> (Equação 2) seriam gastos para produção de 1 mol de NH<sub>3</sub>. São gastos entretanto, 0,776 moles de CH<sub>4</sub>, o que dá uma eficiência em torno de 53% (Gutschick, 1978). O processo comercial mais utilizado para produção de amônia (Haber-Bosch) utiliza H<sub>2</sub> como redutor para o nitrogênio (Stiefel, 1977). A maioria das sínteses usa metano para fornecer energia, em forma de calor, e poder redutor através da reação a seguir (Gutschick, 1978):



A oxidação do metano libera -196 Kcal.mol<sup>-1</sup> permitindo a ocorrência da reação (1). Segundo Bergersen (1971) e Sweeney (1976), a produção industrial de amônia a partir de hidrocarbonetos e nitrogênio requer de 163-180 Kcal.mol NH<sub>3</sub><sup>-1</sup>. De qualquer modo estes valores representam o



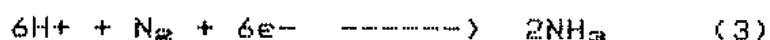
dobro do requerido nos sistemas biológicos, sem considerar os dispêndios no transporte, estocagem e aplicação do fertilizante (Hardy & Havelka, 1975). Além disso, o fertilizante aplicado é perdido através da desnitrificação, por lixiviação e escoamento superficial. Deste modo, as plantas aproveitam no máximo 50% do fertilizante aplicado (Hardy & Havelka, 1975) e em solos arenosos valores de apenas 5-10% tem sido registrados (Duque et al., 1985). Gutschick (1978) estimou em menos de 22% a eficiência líquida na transferência de energia no processo industrial, portanto apenas um pouco melhor que os 16% da fixação biológica, ainda sem levar em conta o dispêndio de energia pela planta para reduzir novamente o nitrogênio, uma vez que, no solo, ele é quase totalmente oxidado a nitrato antes de ser absorvido pelas raízes.

#### 2.1.2 Custo energético celular

Os dados termodinâmicos vistos no item anterior foram calculados para condições de reação bem diferentes das condições biológicas. A medição do custo energético da fixação de nitrogênio dos bacteróides é difícil de ser avaliada, uma vez que, no interior do nódulo existem, além das células infectadas e dos bacteróides, células da planta não infectadas e células de *Rhizobium* não diferenciadas. Além disso simultaneamente à assimilação de  $\text{NH}_4^+$  está ocorrendo a

utilização de compostos de carbono pelos bacteróides (Phillips, 1980). Devido a estas dificuldades, os valores citados neste subítem consideram apenas a redução de nitrogênio a  $\text{NH}_4^+$  e os problemas da evolução de  $\text{H}_2$ , utilizando valores obtidos através do crescimento de bactérias fixando nitrogênio "in vitro".

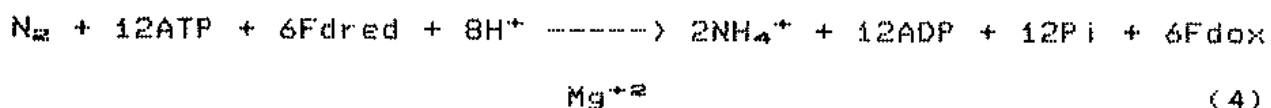
Nos sistemas biológicos a energia é provida pela hidrólise do ATP. Os estudos estequiométricos da utilização de ATP pela nitrogenase mostram que a quantidade de ATP hidrolisado é proporcional ao número de elétrons transferidos da nitrogenase-reductase para a nitrogenase (Bergersen, 1971). Sendo assim, a utilização de ATP é expressa em termos de pares de elétrons transferidos entre os dois componentes da enzima. Winter & Burris (1968) calcularam um gasto de 4 a 4,6 moléculas de ATP para cada  $2e^-$  transferidos, o que de acordo com a reação abaixo, dá um valor de 6 a 6,9 moléculas de ATP por íon  $\text{NH}_4^+$  formado:



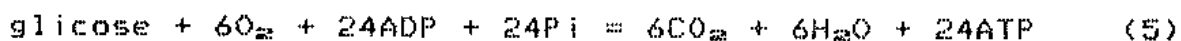
Sob condições ideais, um valor mínimo de 4 moléculas de ATP são hidrolisadas por par de elétrons transferidos ao substrato, energia que também pode ser fornecida pela oxidação de 2 moléculas de ferredoxina. Deste modo, admitindo-se que os elétrons sejam supridos pela

ferrodoxina, a reação da redução de nitrogênio poderia ser escrita da seguinte forma (Salsac, 1984):

nitrogenase



O ATP para esta reação é fornecido através da cadeia respiratória que ocorre nos bacteróides (Figura 1) (Bergersen, 1969). Se assumimos uma taxa P/O de 2 e glicose como substrato, podemos considerar que a oxidação da glicose libere 24 ATP. mol<sup>-1</sup> (Bergersen, 1971):



Por estes cálculos, a combustão de 0,5 mol de glicose, forneceria em forma de ATP, energia suficiente para produzir 2 moles de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Como mais 0,25 moles de glicose são necessários para geração de poder redutor, o equivalente a 0,75 moles de glicose seriam consumidos na reação (4) (Schubert & Ryle, 1980).

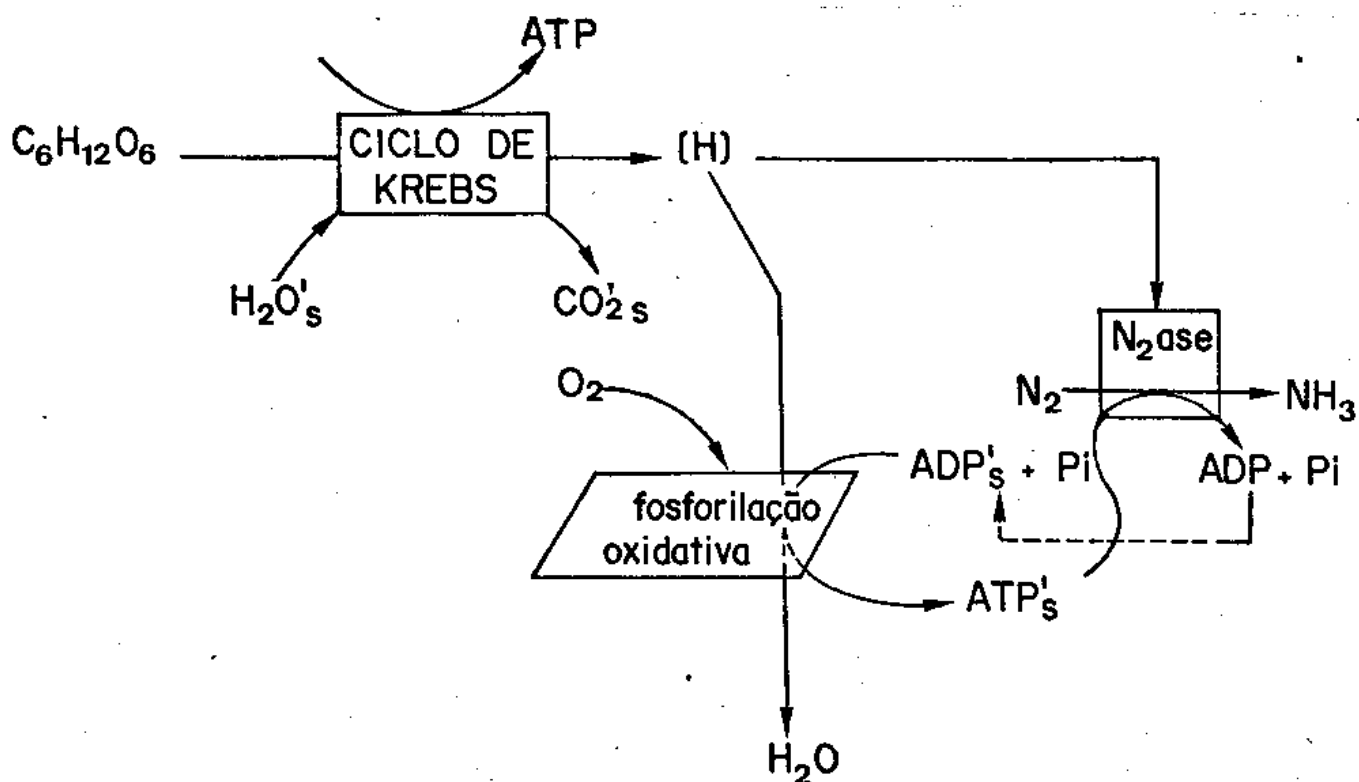
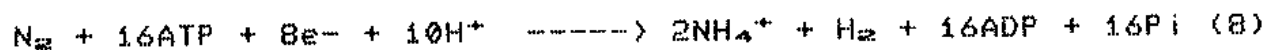
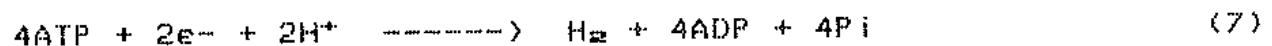
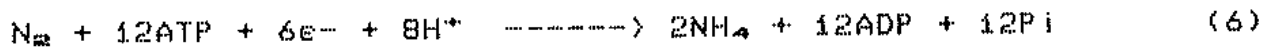


FIGURA 1: Modelo esquemático do fornecimento de energia para fixação de nitrogênio em bactérias aeróbicas (Gutschick, 1978).

No entanto, a nitrogenase também reduz prótons a  $H_2$ . A evolução de  $H_2$  é parte integrante da ação da nitrogenase, e algumas análises tem demonstrado que esta redução paralela pode usar de 25 a 50% dos elétrons destinados ao nitrogênio (Orme-Johnson et al., 1977, Schubert & Ryle, 1980; Evans et al., 1980), consumindo ATP e provocando perdas de energia (Schubert & Evans, 1976, 1977). Considerando-se um desvio mínimo teórico de 25% dos elétrons para o  $H_2$  (Dixon, 1976), a equação da redução do nitrogênio

passa a ser escrita conforme Tabela 3, porém a relação exata entre a redução de prótons e nitrogênio pela nitrogenase pode variar de acordo com diversos fatores (ítem 2.1.3.1).

TABELA 3: Estequiometria das reações da nitrogenase (Phillips, 1980)



Na reação (8) são necessários quatro redutores, drenados da foforilação oxidativa onde poderiam produzir de 1 a 3 ATP. Assumindo-se uma taxa de  $\text{P}/2\text{e}^-$  de 3, então o custo mínimo teórico para a reação (8) é de 28 ATP equivalentes. Salsac (1984), calculou em 32 moléculas de ATP o gasto mínimo, utilizando 8 moléculas de ferredoxina como fornecedoras de elétrons. Cada molécula de ferredoxina na cadeia transportadora de elétrons forneceria 4 Mg-ATP.

Em termos de gastos de carbono por nitrogênio fixado, vários cálculos são citados em literatura, no entanto ainda não está esclarecido como ocorre o fluxo de energia dos carboidratos para a nitrogenase, pois muitas vias metabólicas estão presentes no nódulo, tanto nas células infectadas

quanto no citosol das células da planta hospedeira (Stowers, 1985). Enzimas para a atuação das vias Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e das pentose-fosfato (PP) assim como para metabolismo anaeróbico estão presentes nas células infectadas da hospedeira (Stowers, 1985). Vários substratos de carbono podem ser utilizados pelo bacteróide, tais como succinato ou outros ácidos orgânicos e aminoácidos (Evans et al., 1987 e Long, 1989). Uma teoria interessante é proposta por Kahn et al. (1985) onde o fluxo de nutrientes entre a planta e o bacteróide se dá através do transporte de compostos nitrogenados através das membranas que separam a citosol da célula hospedeira do bacteróide. No bacteróide, o composto nitrogenado é catabolizado produzindo amônia ou um aminoácido e energia biossintética para a fixação de nitrogênio. A amônia restante é devolvida a planta. Por esta teoria o nódulo realiza uma "troca" com a planta e ao fornecer amônia recebe esqueletos de carbono na forma, por exemplo de glutamato. Mais recentemente, Kohl et al. (1989) propuseram que o glutamato pode ser suprido diretamente ao bacteróide ou produzido pela oxidação de prolina. O glutamato, por desaminação, pode fornecer oxoglutarato o qual pode entrar no ciclo de Krebs fornecendo energia para a atividade da nitrogenase.

Para efeito de cálculo, se a oxidação da glucose ocorrer via EMP, seguida pelo ciclo de Krebs, gerando cerca de 38 ATP.mol glucose<sup>-1</sup>, serão gastos no mínimo 1,8g C.g N

fixado<sup>-1</sup> (Neves, 1982). Segundo dados de Bergersen (1971) e Phillips (1980) o gasto mínimo teórico seria de 2,57g C.g N<sup>-1</sup>, calculado com base em uma relação P/O = 2. Estas estimativas estão sujeitas a modificações a medida que sejam obtidos dados precisos da relação P/O em bacteróides.

Salsac (1984) calculou o custo energético total em 4,5 a 6,6g C.g<sup>-1</sup>, utilizando diferentes valores de eficiência relativa de alocação de elétrons entre nitrogenase e o H<sub>2</sub>, e diferentes taxas P/O. Nestes cálculos estão incluídos os gastos energéticos para assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e transporte de asparagina e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

### 2.1.3 Eficiência na utilização de energia para fixação de nitrogênio.

Vários fatores determinam a eficiência da utilização de energia na fixação biológica de nitrogênio, considerando que a energia nos nódulos não é somente utilizada para redução de nitrogênio, mas também para evolução de H<sub>2</sub> (Evans et al., 1980), para assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no citoplasma celular dos nódulos (Mifflin & Lea, 1976) e para crescimento e manutenção dos tecidos nodulares e do bacteróide (Rawsthorne et al., 1980).

### 2.1.3.1 Evolução de hidrogênio

Vários autores (Dixon, 1972; Schubert & Evans, 1976; Gibson, 1976 e Schubert & Ryle, 1980) tem sugerido que a evolução de  $H_2$  catalizada pela nitrogenase é uma via importante de perda de energia durante o processo de redução de nitrogênio "in vitro".

A evolução de  $H_2$  dependente de ATP foi detectada em nódulos destacados de soja pela primeira vez por Hoch et al. (1957). Logo foi estabelecida uma relação entre a fixação de nitrogênio e a evolução de  $H_2$  (Bulen et al., 1965; Bulen & Le Comte, 1966), demonstrando que a nitrogenase catalisa uma reação dependente de ATP e de poder redutor, na qual cerca de 75% do fluxo de elétrons é transferido para o nitrogênio e o restante para  $H^+$  formando  $H_2$ . Aproximadamente 4 a 5 moles de ATP são utilizados por par de elétrons transferidos ao  $H_2$  (Winter & Burris, 1976; Yates, 1980). Vários fatores podem afetar a alocação de elétrons para  $H^+$  ou nitrogênio (Simpson, 1987), no entanto a evolução de  $H_2$  pela nitrogenase é obrigatória e, mesmo em  $pN_2$  infinitas, a taxa de moles de  $H_2$  evoluído para moles de  $N_2$  fixado permanece próxima de 1:1, mantendo o desvio de aproximadamente 25% do fluxo de elétrons da nitrogenase para  $H^+$  (Simpson & Burris, 1984). Entre os fatores que interferem na distribuição de elétrons aos substratos da nitrogenase, é importante destacar o suprimento de ATP e redutores e a razão entre os 2 componentes da



nitrogenase (a dinitrogenase reductase e a dinitrogenase) (Yates, 1988). Além de fatores intrínsecos da própria bactéria, ou seja, nas espécies que possuem uma vanado-nitrogenase, a transferência de elétrons para o  $H^+$  é de 50% (Leigh, 1990). Sendo assim, concentrações ótimas de ATP e redutores e uma alta taxa de dinitrogenase reductase em relação à dinitrogenase contribuem para uma alocação máxima de elétrons para o nitrogênio (Evans et al., 1982).

Diversos fatores ambientais podem interferir na alocação de elétrons para a nitrogenase, tais como, mudanças de temperatura (Rainbird et al., 1983b) e de  $pO_2$  no ambiente do nódulo (Walker et al., 1981; Drevon et al., 1982). As variações na alocação de elétrons constituem um problema importante relacionado com a eficiência da fixação de nitrogênio em organismos intactos, uma vez que condições de limitação de fotossintatos ou de baixo suprimento energético podem reduzir o fluxo de elétrons através da nitrogenase "in vitro", conseqüentemente aumentando a evolução de  $H_2$  em relação a formação de  $NH_3$  ou seja, diminuindo a eficiência do processo da fixação de nitrogênio.

#### 2.1.3.2 Hidrogenases e a economia do nódulo

As perdas de  $H_2$  durante a fixação de nitrogênio para diversos organismos fixadores variam consideravelmente (Evans et al., 1981) e o principal fator determinante destas

perdas é a operação de um sistema de reciclagem de  $H_2$  catalizado pela hidrogenase. A maioria dos organismos fixadores de vida livre e as cianobactérias reciclam através desta via grande parte do  $H_2$  produzido durante a fixação de nitrogênio. As hidrogenases presentes nos bacteróides de *Rhizobium* catalizam uma reação de oxidação irreversível do  $H_2$  (Ruiz-Argüeso et al., 1979b; Emerich et al., 1980), ao contrário de hidrogenases presentes em outros microorganismos os quais catalizam esta reação de forma reversível (Drevon e Salsac, 1984).

Nos bacteróides, o complexo enzimático da hidrogenase está localizado na membrana celular, podendo transferir elétrons do  $H_2$  para uma série de carreadores de elétrons da cadeia respiratória, gerando ATP e tendo o  $O_2$  como acceptor final de elétrons (Eisbrenner & Evans, 1983). Em algumas estirpes de *Rhizobium* HUP<sup>+</sup> a capacidade de oxidação do  $H_2$  é até 10 vezes maior do que a capacidade de evolução de  $H_2$  (Ruiz-Argüeso, 1979b). Este aparente excesso pode ser vantajoso quando ocorrem condições desfavoráveis à simbiose levando a uma maior alocação de elétrons ao  $H^+$  (Evans et al., 1982). No caso de *Rhizobium*, a maioria das estirpes testadas não possuem hidrogenase efetiva (Nelson & Child, 1981; Ruiz-Argüeso et al., 1978; Evans et al., 1981), e a média das perdas de  $H_2$  nos nódulos de leguminosas inoculadas com estirpes HUP<sup>-</sup> (que não possuem hidrogenase) é equivalente a 32% do fluxo de elétrons da nitrogenase, comparado com a

média de 3,8% de perdas quando inoculadas com estirpes HUP<sup>+</sup> (Evans et al., 1981).

A primeira evidência da ocorrência de hidrogenase na simbiose *Rhizobium* - leguminosas foi obtida por Phels e Wilson em 1941 (citados por Drevon & Salsac, 1984) em nódulos de ervilha. Este trabalho foi confirmado posteriormente pelos estudos de Dixon (1967, 1972). Testes de inoculação cruzada entre estirpes HUP<sup>+</sup> e HUP<sup>-</sup> de *Bradyrhizobium japonicum* em cultivares de soja com "background" genético distinto, demonstraram que a síntese da hidrogenase é codificada pelo genoma do microssimbionte (Carter et al., 1978; Camack & Yates, 1986). No entanto, a hospedeira pode influenciar a indução da hidrogenase dentro do nódulo (Dixon, 1972; Gibson et al., 1981; Lopez et al., 1983; Bedmar et al., 1983; Hungria & Neves, 1987).

Dixon (1972) levantou uma série de hipóteses sobre a função da hidrogenase nos nódulos de leguminosas: (a) evitar o acúmulo de concentrações inibitórias de H<sub>2</sub> nos nódulos; (b) agir como um mecanismo respiratório protegendo a nitrogenase contra a inativação por O<sub>2</sub> e (c) conservar parte da energia perdida pela evolução de H<sub>2</sub>.

Dixon et al. (1981) verificaram que a quantidade de espaços intercelulares nos nódulos de leguminosas é muito limitado e que, além disso, não há conexão através de fase gasosa entre o interior e o exterior do nódulo, devido a presença de uma camada de células sem espaços intercelulares,

obrigando os gases a se difundirem através da fase líquida. Baseado nestas observações, é possível que ocorra inibição da fixação de nitrogênio causada por concentrações elevadas de  $H_2$  no nódulo, apesar deste ser um gás muito leve. Dixon & Blunden (1983) obtiveram dados experimentais que dão suporte a esta idéia, no entanto atualmente esta teoria é questionada (Evans et al., 1987) pois sob condições atmosféricas normais, a concentração de  $H_2$  no nódulo é aproximadamente 3% da concentração de nitrogênio (Sheehy et al., 1987).

A função da hidrogenase de utilizar excesso de oxigênio de modo a manter o ambiente anaeróbico no sítio da nitrogenase foi demonstrada tanto em organismos fixadores de vida livre (Walker & Yates, 1978) quanto em bacteróides de *Bradyrhizobium japonicum* (Ruiz-Argueso, 1979 a, Emerich et al., 1979). No entanto a pressão de oxigênio no interior dos nódulos "in vivo" é mantida a níveis baixos pela presença da leghemoglobina, da barreira à difusão de  $O_2$  e pela intensa respiração dos bacteróides (Drevon e Salsac, 1984). Nestas condições, um consumo suplementar de oxigênio pode não se constituir numa proteção útil como seria no caso de bactérias fixadoras de vida livre e bacteróides "in vitro" (Salsac et al., 1984), podendo até ser constituir numa desvantagem (Drevon & Salsac, 1984; Evans et al., 1987; Yates, 1988).

Uma vez que a produção de  $H_2$  pelos nódulos é a maior perda no balanço energético da fixação biológica de nitrogênio, as estirpes que são capazes de promover a

oxidação do  $H_2$  juntamente com a formação de ATP deveriam economizar parte da energia e poder redutor gastos pela nitrogenase através da transferência de elétrons diretamente para a enzima (Salminen & Nelson, 1984) ou então para a cadeia respiratória, produzindo ATP (Walker & Yates, 1978; Dixon, 1978), levando a uma maior produção de matéria seca pela planta (Schubert & Ryle, 1980; Salsac et al., 1984).

Teoricamente, a taxa da fixação de nitrogênio em uma estirpe que reoxida todo  $H_2$  evoluído via nitrogenase pode ser aumentada de 10 a 15%, assumindo que cerca de 1/3 do fluxo de elétrons seja alocado para redução de prótons e que apenas 1/3 desta energia seja conservada pela oxidação do  $H_2$  (Schubert & Ryle, 1980).

Drevon et al. (1982) usando duas estirpes isogênicas de *Bradyrhizobium japonicum* que diferiam apenas na expressão do gen "HUP", verificou que houve um decréscimo de 5,3% na quantidade de  $CO_2$  evoluído por mol de  $C_2H_2$  reduzido. Isso corresponde a uma economia de cerca de 0,54 umoles de glucose que poderiam gerar de 13 a 19 umoles de ATP na cadeia respiratória. No entanto, os cálculos da quantidade de ATP gerada pela reciclagem do  $H_2$  (com base no  $H_2$  evoluído pela estirpe HUP<sup>-</sup>) corresponderam a apenas 35 a 45% da energia que poderia ser gerada pela oxidação da glucose economizada (Salsac et al., 1984), ou seja, apenas 2 moles de ATP por mol de  $H_2$  oxidado foram produzidas pela estirpe HUP<sup>+</sup>. Neste experimento não houve efeito da reciclagem de  $H_2$  na taxa da

fixação de nitrogênio, provavelmente devido a uma deficiência na respiração dos bacteróides, levando à competição entre NADH e  $H_2$  na cadeia respiratória e a menor eficiência deste como gerador de ATP (Salsac et al., 1984). Uma indicação de que esta deficiência foi na respiração e não na disponibilidade de fotossintatos foi o aumento na taxa da fixação de nitrogênio quando os nódulos foram expostos a  $pO_2$  mais elevadas (Drevon et al., 1982). Explicação similar foi dada por Sorensen & Wyndaele (1986) para uma diminuição observada na produção de ervilha inoculada com estirpes HUP<sup>+</sup> comparadas com as HUP<sup>-</sup>. No entanto é sabido que estirpes de *R. leguminosarum* produzem nódulos com baixa atividade da hidrogenase o que torna difícil a verificação dos efeitos da atividade desta enzima em termos de produção da planta (Truelsen & Wyndaele, 1984).

Outros trabalhos verificaram que a oxidação do  $H_2$  está associada a uma diminuição na taxa de evolução de  $CO_2$ , resultante da diminuição na taxa de oxidação de substratos de carbono (Emerich et al., 1980; Arima, 1981; Rainbird et al., 1983c), podendo reduzir significativamente o custo respiratório da fixação em comparação com plantas inoculadas com estirpes HUP<sup>-</sup> (Layzell et al., 1979).

A magnitude dos efeitos benéficos da reciclagem de  $H_2$  nos nódulos de leguminosas foram estudados em vários experimentos conforme revisões de Evans et al. (1982), Einsbrenner & Evans (1983) e Yates (1988). Em muitos estudos

foram comparadas estirpes HUP<sup>+</sup> e HUP<sup>-</sup> como inoculantes de leguminosas mostrando aumento de produção e maior acúmulo de nitrogênio na planta inoculada com estirpes HUP<sup>+</sup> (Schubert et al., 1978; Albrecht et al., 1979; Lepo et al., 1981; Zablotowicz et al., 1980; Neves et al., 1985; Carter et al., 1978; De Jong et al., 1982), e também foi observado, um aumento médio de 8,9% no teor de proteína do grão da soja (Hanus et al., 1981).

Teoricamente, a utilização de mutantes HUP<sup>-</sup> e revertantes HUP<sup>+</sup> como inoculantes é a melhor forma de avaliação das vantagens da reciclagem de H<sub>2</sub> sobre a fixação de nitrogênio e o crescimento das plantas, uma vez que evitam o problema da interferência de outras diferenças genéticas além da hidrogenase na performance da simbiose (Eisbrenner & Evans, 1983). Hungria et al. (1989), trabalhando com uma mutante HUP<sup>-</sup> (PJ17) e uma revertante HUP<sup>+</sup> (PJ17-1), encontraram valores significativamente maiores em termos de eficiência nodular (N<sub>2</sub> fixado.g nódulo<sup>-1</sup>), taxa de transporte de N-ureido, incorporação de N em várias partes da planta e índice de colheita para a revertante HUP<sup>+</sup>. No entanto, mesmo assim existem controvérsias sobre os efeitos da hidrogenase no desenvolvimento das plantas. Drevon et al. (1987), utilizando estas mesmas mutantes pontuais de *Bradyrhizobium japonicum*, observaram efeito negativo da revertante HUP<sup>+</sup> em relação a mutante HUP<sup>-</sup> na produção de matéria seca da soja. Este resultado foi atribuído pelos autores a limitação de O<sub>2</sub>

para a respiração do bacteróide devido ao cultivo hidropônico. Isto pode ser explicado devido a diminuição na disponibilidade de  $O_2$  na revertante HUP<sup>+</sup> devido a oxidação do  $H_2$ . Resultados similares ou sem efeito significativo foram revisados por Eisbrenner & Evans (1983) e recentemente observados também por Cunningham et al. (1985) e Kimou & Drevon (1989).

Estes dados controversos podem ser devidos a complexidade do sistema, sujeito a interferência de fatores ambientais, o que torna difícil o controle das variáveis envolvidas.

O conceito de "eficiência relativa" (ER) foi definido por Schubert & Evans (1976) como:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído no ar}}{\text{taxa de redução de } C_2H_2}$$

Esta expressão considera que sob concentrações saturantes de  $C_2H_2$  (10% V/V) todo o fluxo de elétrons é destinado a nitrogenase para redução de  $C_2H_2$  a  $C_2H_4$ .

Na ausência da hidrogenase, a quantidade de  $H_2$  evoluído é igual àquela produzida pela nitrogenase e a ER medirá a proporção de elétrons perdidos na evolução de  $H_2$  sobre o total de elétrons destinados a nitrogenase. Por outro



lado, na presença da hidrogenase, uma parte ou o total do  $H_2$  formado é reciclado fornecendo valores de ER próximos de 1.

Como já discutido, pelo menos um mol de  $H_2$  é produzido por mol de nitrogênio reduzido. De acordo com a definição de Schubert & Evans (1976) esta taxa corresponde a uma eficiência relativa de 0,75. Logo é importante investigar condições nas quais a eficiência relativa fique pelo menos próxima deste valor, uma vez que para a média das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* este valor gira em torno de 0,60. Deve ser levado em conta também que a eficiência relativa, para a mesma estirpe de *Rhizobium* varia com a cultura, durante o ciclo da planta e com as condições ambientais (Salsac et al., 1984; Hungria & Neves, 1986; Neves & Hungria, 1987).

## 2.2 Métodos experimentais para avaliação do custo energético da fixação de nitrogênio

Os altos custos teóricos da fixação biológica de nitrogênio motivaram muitos estudos visando avaliar "in vivo" o custo energético do nitrogênio fixado, em termos de utilização de carboidratos pelos nódulos de leguminosas.

As primeiras tentativas de avaliar o custo energético da fixação de nitrogênio foram feitas pela

comparação do crescimento de plantas noduladas e não noduladas, obtendo a diferença em peso seco e conteúdo de nitrogênio entre elas (Christiansen-Weniger, 1923; Allam, 1931; Andrews, 1937, citados por Phillips, 1980). Alguns destes valores, variando de 3 a 20g carbono/g N-fixado, são surpreendentemente semelhantes a valores obtidos em medições mais sofisticadas (vide Tabela 4). As principais críticas a estes primeiros trabalhos são: a absorção de nitrogênio pelas plantas controle não corresponde a fixação de nitrogênio pelas plantas noduladas; alguns experimentos foram conduzidos no campo e o controle sobre a nodulação não foi eficiente; o período de iniciação do nódulo foi incluído nas avaliações; em alguns casos a época de coleta das plantas indicava que poderia ter havido contribuição de nódulos senescentes; e finalmente erros nas avaliações dos resultados (Gibson, 1966). Gibson (1966) através da mesma metodologia anterior, mas utilizando cálculos de taxas relativas de crescimento de modo a minimizar os efeitos de época de coleta e diferenças iniciais em tamanho das plantas com nitrogênio e noduladas, obteve valores médios  $0,3\text{g C.g N-fixado}^{-1}$  para *Licifolium subterraneum*, bem abaixo do gasto mínimo teórico que é de  $1,8\text{g C.g N}^{-1}$  (Neves, 1982).

A respiração medida através da evolução de  $\text{CO}_2$  e em alguns ensaios pelo consumo de  $\text{O}_2$ , tem sido utilizada na maioria dos experimentos como indicativo do consumo de carboidratos pelo nódulo. Visando tentar superar a

TABELA 4: Valores de custo energético da atividade da nitrogenase obtidos através de diferentes metodologias.

METODOLOGIA	ESPÉCIE	gC/gN	REFERÊNCIA
1. DIFERENÇA ENTRE PESO SECO E CONTEUDO DE N ENTRE PLANTAS NODULADAS E NÃO NODULADAS	Medicago sativa Vicia faba Glycine max	2,9 2,2 5,0-10,4	Christiansen-Weniger, 1923, citado por Phillip, 1980 Christiansen-Weniger, 1923, citado por Phillip, 1980 Allam, 1931, citado por Phillips, 1980 Gibson, 1966
2. IDEM ACIMA, INCLUINDO CÁLCULOS DE TAXAS RELATIVAS DE CRESCIMENTO	Trifolium subterraneum	0,3	
3. DIFERENÇA NA EVOLUÇÃO DE CO <sub>2</sub> ENTRE RAÍZES INTACTAS NODULADAS E NÃO NODULADAS	G. max G. max	7,6 3-4	Bond, 1941 Heytler & Hardy, 1979
4. EVOLUÇÃO DE CO <sub>2</sub> E/OU ABSORÇÃO DE O <sub>2</sub> POR NÓDULOS DESTACADOS EM FUNÇÃO DO ACÚMULO DE N PELA PLANTA INTACTA OU DA ATIVIDADE DE REDUÇÃO DE ACETILENO (ARA)	Rizum sativum Vicia unguiculata Lupinus albus V. unguiculata V. unguiculata Desmodium sp Phaseolus vulgaris V. faba I. ecataense V. unguiculata	5,9 1,1 1,7 1,1 3,4 4,5 5,1 4,4 5,4 1,9-3,2	Minchin & Pate, 1973 Herridge & Pate, 1977 Pate & Herridge, 1978 Neves et al., 1978 Minchin et al., 1980 Tjepkema & Winship, 1980 Tjepkema & Winship, 1980 Tjepkema & Winship, 1980 Tjepkema & Winship, 1980 Rainbird et al., 1983c Cont.

METODOLOGIA	ESPÉCIE	gC/gN	REFERÊNCIA
5. RESPIRAÇÃO DE RAÍZES ANTES E APÓS A RETIRADA DOS NÓDULOS EM RELAÇÃO A ARA EVO- DE H <sub>2</sub> OU ACÚMULO DE N.	P. sativum P. sativum	4,0-12,0 5,1-11,5	Skrdleta et al., 1983 Skrdleta et al., LUÇÃO
6. RESPIRAÇÃO DE SEGMENTOS DE RAÍZES CONTENDO NÓDULOS ENCERRADOS EM MICRORESPIRÔMETROS	G. max L. albus V. unguiculata P. sativum V. unguiculata	2,1 3,6 1,5 4,3-15,2 2,4-4,2	Tjepkema & Yocum, 1973 Layzell et al., 1979 Layzell et al., 1979 Dixon et al., 1981a Rainbird et al., 1983a
7. RESPIRAÇÃO DE RAÍZES NODULADAS INTACTAS OU ANTES E APÓS A REMOÇÃO DE ALGUNS NÓDULOS EM RELAÇÃO AO ACÚMULO DE N	G. max G. max G. max I. cereus V. unguiculata P. sativum G. max P. sativum P. vulgaris V. faba	5,3-16,7 6,0-16,0 6,3 6,6 6,8 1,9 3-5 6,8 6,1 6,7	Dixon et al., 1981a Ryle et al., 1978 Ryle et al., 1979a Ryle et al., 1979a Ryle et al., 1979a Houwaard, 1988 Schubert & Ryle, 1980 Mahon, 1977b Mahon, 1979 Mahon, 1979 Cont.
8. EVOLUÇÃO DE CO <sub>2</sub> E ARA DE RAÍZES NODULADAS INTACTAS SOB DIFERENTES MANIPULAÇÕES AMBIENTAIS			

METODOLOGIA	ESPÉCIE	gC/gN	REFERÊNCIA
	G. max	6,7	Mahon, 1979
	G. max	3,6**	Patterson & LaRue, 1983
	G. max	2,0	Kanamori et al., 1984
	G. max	2,6	Rainbird et al., 1984
	G. max	2,5-7,6	Warembourg, 1983
9. EXPOSIÇÃO SIMULTÂNEA DE PLANTAS NODULADAS INTACTAS A $^{14}\text{CO}_2$ E $^{15}\text{N}_2$	I. CEREOS	2,8-4,6	Warembourg & Roumet, 1989
	G. max	11-12,5	Ryle et al., 1984
10. EVOLUÇÃO DE $\text{CO}_2$ EM RAÍZES NODULADAS INTACTAS EM RELAÇÃO A ARA A 21 E 3% $\text{O}_2$	I. CEREOS	3,4	Ryle et al., 1986
	I. CEREOS	5,0**	Ryle et al., 1989
	I. CEREOS	5,3**	Gordon et al., 1989
	P. sativum	5,4	Witty et al., 1983
11. REDUÇÃO SIMULTÂNEA NA EVOLUÇÃO DE $\text{CO}_2$ E ARA SOB $\text{C}_2\text{H}_2$ OU $\text{PO}_2$ DECRESCENTES	M. sativa	4,6	Witty et al., 1983
	P. sativum	14,0**	Skrdleta et al., 1984b
	P. sativum	3,0-6,0	Skot et al., 1986
	G. max	3,9**	Schuller et al., 1988
	P. sativum	3,7-4,0	Rosendahl & Jakobsen, 1988
	P. sativum	3,2-5,3	Rosendahl et al., 1989

\*\* Calculado assumindo Ca:Ha:Nu=4

dificuldade de medir a respiração de nódulos intactos sem incluir a respiração das raízes, danificar plantas ou nódulos, ou mesmo interferir em outros processos metabólicos, uma larga gama de metodologias tem sido desenvolvidas, o que dificulta as comparações entre as estimativas obtidas nos diversos trabalhos como se verifica nas revisões publicadas por diversos autores (Schubert & Ryle, 1980; Phillips, 1980; Minchin, 1980; Pate et al., 1981; Minchin et al., 1981; Neves, 1982; Atkins, 1984 e Neves & Hungria, 1987).

A primeira estimativa de custo respiratórios dos nódulos foi feita por Bond (1941) que comparou a respiração de raízes de soja noduladas e não-noduladas e assumiu que a diferença representava a respiração devida a atividade dos nódulos. Heytler & Hardy (1979) utilizaram este mesmo princípio para comparar a respiração entre isolíneas nodulantes e não nodulantes de soja e também entre soja nodulada com uma estirpe normal e uma mutante ( $Nif^-$ ) de *Rhizobium*. No entanto algumas críticas são levantadas contra esta metodologia: as taxas respiratórias de raízes noduladas e não noduladas reflete também o custo respiratório de crescimento e manutenção de nódulos jovens e senescentes, que não estão fixando nitrogênio (o que em parte é reparado pelo uso de mutantes  $Nif^-$ ). Além disso, Lambers et al. (1980) comparando o metabolismo energético de raízes de *Lupinus albus* noduladas e não noduladas supridas com  $NO_3^-$  verificou que a assimilação de  $NO_3^-$  afeta a contribuição relativa da

via oxidativa alternativa (SHAM\*-sensível), menos eficiente, nas raízes. Esta via é mais ativa em raízes de plantas supridas com  $\text{NO}_3^-$  (Lambers et al., 1980 e de Visser, 1985) do que em raízes supridas com  $\text{N}_2$  ou  $\text{NH}_4^+$  (de Visser, 1985). Pate et al. (1979), Atkins et al. (1980) e Minchin et al. (1980) observaram uma maior liberação de  $\text{CO}_2$  pelas raízes de suporte dos nódulos em relação às supridas com  $\text{NO}_3^-$  e parte desta diferença foi atribuída a um chamado componente não assimilatório, ou seja, não ligado a custo de manutenção e crescimento de nódulos nem a fixação de nitrogênio.

Visando separar o custo respiratório devido a atividade dos nódulos daquele referente à atividade das raízes, várias aproximações foram tentadas: a) utilização de nódulos destacados como medida direta da evolução de  $\text{CO}_2$  e/ou absorção de  $\text{O}_2$  em função do nitrogênio acumulado (Minchin & Pate, 1973; Herridge & Pate, 1977; Pate & Herridge, 1978; Minchin et al., 1980; Neves et al., 1978) ou da redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  (ARA) (Tjepkema & Winship, 1980); b) medição da respiração de raízes antes e após a retirada de todos os nódulos em relação a ARA e evolução de  $\text{H}_2$  (Skrdleta et al., 1983, 1984a); c) medição da respiração de segmentos de raízes contendo nódulos encerrados em micro-sistemas antes e após a excisão dos nódulos (Tjepkema & Yocum, 1973; Layzell

---

\* SHAM = Ácido hidroxilâmico

et al., 1979; Dixon et al., 1981; Rainbird et al., 1983a) e d) medição da respiração de raízes noduladas antes e depois da remoção de um peso conhecido de nódulos em relação ao acúmulo de nitrogênio na planta (Ryle et al., 1978, 1979a; Houwaard, 1980; Schubert & Ryle, 1980).

A utilização da evolução de  $\text{CO}_2$  como medida do custo energético da fixação de nitrogênio apresenta várias limitações (Minchin et al., 1981). Dixon et al. (1981) obtiveram dados de  $RQ$  (coeficiente respiratório) consistentemente menores que 1 em segmentos de raízes noduladas de soja e ervilha. Isso indica que pode estar ocorrendo uma oxidação parcial da glucose a piruvato e reações anapleuróticas para síntese de aceptores de nitrogênio. Pelos dados destes autores, para estas duas espécies, o custo energético calculado com base na evolução de  $\text{CO}_2$  apresenta-se subestimado em relação ao obtido com base na absorção de  $\text{O}_2$ . Além disso, há a possibilidade de refixação do  $\text{CO}_2$  como é indicado pela presença de carboxilases, tanto nas raízes quanto nos nódulos (Lawrie & Wheeler, 1975b; Christeller et al., 1977; Laing et al., 1979; Lodha et al., 1983; Suganuma & Yamamoto, 1987), e também pela atividade respiratória de microrganismos na rizosfera e no substrato das raízes (Minchin et al., 1981).

Outras críticas tem sido levantadas contra estas metodologias: a) o destacamento provoca declínio na atividade



dos nódulos em termos de evolução de  $\text{CO}_2$  (Minchin, 1980) e refixação deste pela PEP carboxilase (Bethenod et al., 1984). No entanto Herridge & Pate (1977) encontraram uma boa correlação entre os dados obtidos em nódulos destacados e os dados de evolução de  $\text{CO}_2$  obtidos em plantas intactas de caupi. Tjepkema & Winship (1980) verificaram que a excisão dos nódulos de actinomicetos não afeta a taxa de evolução de  $\text{CO}_2$  desses nódulos durante as primeiras 3 horas de incubação, mas que para nódulos de soja há uma queda nessa taxa logo após a retirada dos nódulos; b) a atividade da nitrogenase de nódulos de soja é afetada pela excisão (van Straten & Schmidt, 1974; Ralston & Imsande, 1982); e também pode sofrer um declínio substancial com a remoção da parte aérea e agitação das raízes (Minchin et al., 1986); c) os processos bioquímicos do nódulo mudam rapidamente com a excisão (por exemplo, Lawrie & Wheeler (1975b) detectaram a presença de ácido itacônico em extrato de nódulos preparado 30 minutos após a excisão, sendo que este ácido não é detectado em nódulos imediatamente após a remoção); d) a remoção dos nódulos das raízes bem como a manipulação excessiva das plantas induz a um aumento da taxa respiratória devido a injúria provocada nos tecidos radiculares (Minchin, 1980); e) erros são introduzidos na extrapolação de dados obtidos a partir de uma amostra pequena de nódulos onde se avalia a respiração (Minchin, 1980). A atuação no nódulo de uma barreira a difusão de  $\text{O}_2$  (Sheehy et al., 1983), que pode ser

alterada pelo manuseio ou pelas condições ambientais, afetando as atividades respiratória e da nitrogenase, poderia explicar muitas destas variações na atividade da nitrogenase quando da excisão do nódulo.

Winship & Tjepkema (1982) descreveram uma metodologia que permite a avaliação rápida e simultânea da evolução de  $\text{CO}_2$ , absorção de  $\text{O}_2$  e ARA em nódulos individuais ligados as raízes de plantas intactas. Embora bastante complexo e dispendioso, o método produz um mínimo de interferências no sistema permitindo estudos mais detalhados do custo energético da atividade da nitrogenase, embora não permita a separação da respiração do segmento de raiz, que é incluído numa na cubeta juntamente com o nódulo, da respiração devido a atividade do nódulo, exceto por diferença, após da retirada do nódulo.

Todas estas metodologias falham ainda em separar a respiração de crescimento e manutenção dos tecidos nodulares e do bacteróide (Rawsthorne et al., 1980).

Uma série de estimativas do custo energético da fixação de nitrogênio, utilizando plantas noduladas intactas, envolvem a medição simultânea da evolução de  $\text{CO}_2$  e da atividade da nitrogenase sob efeito de diferentes manipulações ambientais. Estas aproximações baseiam-se na seguinte expressão (Mahon, 1977a):

$$R = \text{RMW} + \text{RGdw/dt} + \text{RF} (\text{N}_2 \text{ ase}) \quad (9)$$

onde  $R$  é a respiração total das raízes e nódulos;  $W$  é o peso seco de raízes e nódulos;  $N_2$ -ase é a atividade da nitrogenase e  $RM$ ,  $RG$  e  $RF$  são coeficientes de manutenção, crescimento e fixação. De acordo com esta expressão, se a atividade da nitrogenase pode ser variada sem variar o peso ou a taxa de crescimento, então a relação entre a respiração total e a atividade da nitrogenase deve ser linear, e a inclinação desta relação deve representar a respiração requerida por unidade de atividade da nitrogenase. Baseado neste princípio foi determinado o custo respiratório em plantas de ervilha pelo declínio provocado na atividade da nitrogenase (medida pela ARA) alguns dias após a adição de altas concentrações de nitrogênio (420 ppm de nitrogênio) ao substrato das plantas noduladas (Mahon, 1977a,b, 1979). Kanamori et al. (1984) utilizaram o mesmo princípio para nódulos individuais de soja. Várias críticas foram levantadas a esta metodologia: inicialmente os dados apresentados por Mahon não são convincentes quanto a linearidade da relação entre as duas atividades; em segundo lugar, conforme foi levantado anteriormente, a conversão de uma "raiz de suporte" em uma raiz suprida com altas doses de nitrogênio pode criar problemas de mudanças nos processos bioquímicos da raiz (Lambers et al., 1980) e perda de atividade respiratória de nódulos em desenvolvimento, ainda sem atividade da fixação; e finalmente o método pressupõe que a adição do nitrogênio deve

suprimir a atividade dos nódulos sem causar senescência e que a redução de nitrato nas raízes da planta teste deve ser insignificante. Explorando a mesma relação entre a respiração do nódulo e a atividade da nitrogenase, Rainbird et al. (1984) estudaram a variação da evolução de  $H_2$  ( $Ar:O_2$  ou em ar) e de  $CO_2$  sob vários regimes de luz em plantas intactas de soja. Os dados mostraram que as taxas de evolução de  $CO_2$  e  $H_2$  decresceram em paralelo quando as plantas foram mantidas no escuro por um período extenso. A queda nas atividades da nitrogenase e de evolução de  $CO_2$  foi mais rápida a  $30^\circ C$  do que a  $22^\circ C$ , mas a inclinação das curvas se manteve constante, ou seja, não houve efeito da temperatura no custo energético da fixação de nitrogênio, o mesmo foi observado por Ryle et al. (1989) em plantas de trevo branco analisadas em temperaturas entre 5 e  $23^\circ C$ . Patterson & Larue (1983) obtiveram curvas de regressão entre a atividade da nitrogenase, estimada pela ARA e a respiração de plantas intactas em câmaras fechadas, chamadas de respirômetros, onde a respiração e ARA eram medidas simultaneamente antes e após um tratamento de 6 minutos com 1 atm de  $O_2$ . Segundo Patterson et al. (1983) há uma relação direta entre a queda na atividade respiratória e da nitrogenase nestas condições, havendo uma recuperação das atividades após um período de 2 a 3 horas.

Warembourg et al. (1982) desenvolveram uma metodologia que permite a exposição da parte aérea das

plantas a  $^{14}\text{CO}_2$  durante um curto período de tempo, analisando cuidadosamente fluxo de  $^{14}\text{CO}_2$  no solo de modo a detectar as diversas fases de atividade. O sistema radicular foi simultaneamente exposto a  $^{15}\text{N}_2$  de modo a estimar a quantidade exata de  $^{15}\text{N}_2$  fixado durante o período de exposição ao  $^{14}\text{CO}_2$ . A respiração do solo foi também monitorada através do fluxo de  $\text{CO}_2$ . Este método foi utilizado para avaliação do custo da fixação de nitrogênio em soja (Warembourg, 1983; Warembourg & Roumet, 1989) tendo a vantagem de trabalhar com plantas intactas. O resultado expressa o custo líquido da fixação de nitrogênio após a formação dos nódulos, incluindo a utilização de carbono para transporte de compostos nitrogenados para fora do nódulo. No entanto, devido à complexidade do sistema necessário, a utilização desta metodologia é limitada pelo pequeno número de amostras que podem ser manuseadas simultaneamente.

Ryle et al. (1984) mediram a evolução de  $\text{CO}_2$  de raízes de plantas intactas de soja antes e após a retirada dos nódulos, no ar e a 3%  $\text{O}_2$ , de modo a inibir a atividade da nitrogenase. A cada intervalo foi determinado o N-fixado pela planta (Kjeldahl). O grau de inibição da nitrogenase foi determinado pela comparação das taxas de ARA em ar e a 3%  $\text{O}_2$  em várias ocasiões durante o ciclo da planta. Os custos respiratórios ligados à nitrogenase e ao crescimento e manutenção de nódulos foram calculados a partir dos dados de evolução de  $\text{CO}_2$  relacionados às taxas da fixação de

nitrogênio. O componente de respiração ligado a nitrogenase foi calculado da seguinte forma:

Respiração dos nódulos a 21% O <sub>2</sub>	-	respiração das raízes e nódulos a 3% O <sub>2</sub>	-	respiração das raízes a 3% O <sub>2</sub> ]	(10)
---	---	---	---	---	------

Estes valores são corrigidos para uma inibição de 100% na atividade da nitrogenase pois a 3% O<sub>2</sub> ocorreu uma inibição média de 84% na atividade da nitrogenase e de 10% na atividade respiratória das raízes, sendo por isso, necessário descontar este fator no cálculo acima. Através destes dados foram obtidas regressões entre a atividade respiratória devida a atividade da nitrogenase e metabolismo de NH<sub>3</sub> e a fixação de nitrogênio (mg N.planta<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) durante o ciclo da planta. As estimativas variaram de 11 a 12,6 mg CO<sub>2</sub>.mg N<sup>-1</sup>. Este método foi usado posteriormente para avaliar efeitos de manipulação de fotossintatos (Ryle et al., 1986), condições ambientais (Ryle et al., 1988; Ryle et al., 1989) e nitrato (Gordon et al., 1989) sobre o custo energético de ARA em trevo branco.

As técnicas descritas anteriormente, além das limitações citadas, não são apropriadas para medições rápidas, não destrutivas, do custo respiratório para fins de comparação entre diferentes sistemas simbióticos e acompanhamento destes parâmetros durante o ciclo da planta. Visando superar estas limitações, Minchin et al. (1983a)

descreveram uma nova técnica baseada na observação de que a exposição de nódulos destacados ou raízes noduladas a certas misturas gasosas provoca reduções simultâneas nas taxas de evolução de  $\text{CO}_2$  e de ARA (Minchin et al., 1983b), diferindo dos métodos descritos no parágrafo anterior na rapidez das medições (de 30-60 min), na maior simplicidade do aparato necessário (essencialmente um IRGA-analisador de gases por infra vermelho e um cromatógrafo), na facilidade de manuseio simultâneo de várias amostras além de permitir a separação dos diferentes componentes do custo respiratório.

Através da utilização de um fluxo contínuo de gases contendo 10%  $\text{C}_2\text{H}_2$ , passando através das raízes de plantas noduladas intactas, Minchin et al. (1983b) observaram que as taxas de evolução de  $\text{CO}_2$  e de ARA sofrem declínios paralelos, cerca de 5-10 minutos após a exposição ao  $\text{C}_2\text{H}_2$ . Verificou-se que este declínio não estava associado a impurezas contidas no  $\text{C}_2\text{H}_2$ , nem ao  $\text{C}_2\text{H}_4$  produzido e não foi verificado em raízes de plantas não noduladas ou contendo nódulos inefetivos. Como a exposição de raízes noduladas ou nódulos a atmosferas de  $\text{Ar}:\text{O}_2$  ou  $\text{He}:\text{O}_2$  teve o mesmo efeito nas taxas de respiração e na atividade da nitrogenase, os autores sugeriram que o declínio possa estar sendo causado pela interrupção na produção de amônia, após a exposição ao  $\text{C}_2\text{H}_2$ .

Sheehy et al. (1983) observaram que a exposição dos nódulos de trevo branco a concentrações crescentes de  $\text{O}_2$  (21 a 80%) não provocaram aumento significativo na respiração dos

nódulos, nem danos a nitrogenase, conforme esperado para estas condições (Bergersen, 1962; Pankhurst & Sprent, 1975, 1976). Sendo assim, foi sugerido que, na ausência de proteção respiratória, a inativação da nitrogenase pelo  $O_2$  é evitada pela mudança na resistência a difusão deste para o interior do bacteróide (Sheehy et al., 1983; Weiz & Sinclair, 1987a,b). A interrupção na produção de amônia durante a exposição ao  $C_2H_2$  aumenta a resistência da barreira à difusão de  $O_2$ , evitando assim que o aumento na  $pO_2$  devido ao decréscimo no consumo de  $O_2$  provoque a inativação da enzima (Witty et al., 1984). Esta resistência foi caracterizada por cálculos matemáticos que analisam a resposta respiratória do nódulo às concentrações externas de  $O_2$  como um processo de difusão limitada (Minchin et al., 1985), permitindo a análise comparativa do comportamento deste mecanismo protetório entre diferentes simbioses (Minchin et al., 1985; Schuller et al., 1988). Algumas simbioses não apresentam declínio na atividade nodular sob  $C_2H_2$ , e a atividade da nitrogenase não resiste a aumentos na concentração externa de  $O_2$ , indicando que há diferenças entre as simbioses quanto ao controle da resistência a difusão de  $O_2$  (Witty et al., 1984). Nas simbioses em que não há variação quanto a resistência à difusão de  $O_2$ , a tolerância da nitrogenase ao  $O_2$  fica relacionada ao suprimento de carboidratos e sob condições normais a fixação de nitrogênio é limitada pela difusão de  $O_2$  (Sheehy et al., 1985; Heckmann et al., 1989). A atuação da



barreira de difusão ao  $O_2$  varia com a combinação simbiótica e idade da planta (Minchin et al., 1983a; Rosendahl & Jakobsen, 1988), com as condições ambientais pré-análise (Minchin et al., 1983a, Minchin et al., 1985), por baixas temperaturas, alagamento (vide revisão de Minchin et al., 1988) e "stress" hídrico (Durand et al., 1987); é alterada também pelo manuseio das plantas durante a análise (Minchin et al., 1986b); pela a exposição prévia das plantas a nitrato (Minchin et al., 1986a) e por mudanças rápidas e substanciais na disponibilidade de fotossintatos (Ryle et al., 1988). A variação na resistência desta barreira afeta a atividade da fixação de nitrogênio em condições atmosféricas normais e a eficiência em termos de moles de nitrogênio fixado/moles de  $O_2$  utilizado (Sheehy et al., 1987). A natureza desta barreira ainda não se encontra esclarecida mas existem evidências de que o cortex do nódulo seja responsável pela resistência à difusão de  $O_2$  para o interior do nódulo (Tjepkema & Yocum, 1973; Witty et al., 1987), obrigando a difusão dos gases por uma fase aquosa (Sinclair & Goudrian, 1981; Sheehy et al., 1985; Hunt et al., 1988). Recentemente foi observada a presença de maior quantidade de determinado tipo de glicoproteínas nos espaços intercelulares do córtex de nódulos de soja crescidos sob exposição à alta  $pO_2$  (James, 1990). A nível especulativo foi sugerido que estas moléculas poderiam, através da absorção de água, estar envolvidas nas respostas rápidas da barreira à difusão de  $O_2$  no nódulo.

Pela metodologia de avaliação de custo energético descrita por Minchin et al. (1983a), durante o período de declínio após a exposição ao  $C_2H_2$ , as taxas de ARA e respiração variam proporcionalmente, sendo descritas por uma regressão linear. Quando um novo estágio de equilíbrio é alcançado, decréscimos sucessivos na  $pO_2$  provocam novas reduções na respiração e produção de  $C_2H_4$ . Esta análise permite a separação dos componentes respiratórios de plantas intactas em: assimilação de amônia, atividade da nitrogenase e crescimento e manutenção de raízes e nódulos. A respiração ligada a assimilação de amônia é medida pelo declínio na produção de  $CO_2$  antes do declínio na taxa de produção de  $C_2H_4$  (Figura 2). O custo respiratório da atividade da nitrogenase é dado pela inclinação da reta que descreve o declínio nas taxas de respiração e ARA durante a exposição ao  $C_2H_2$  ou a  $pO_2$  decrescentes (Figura 3). As evidências de que todo o declínio é ligada a atividade da nitrogenase são: a) relação muito próxima entre os parâmetros ( $r^2 > 0,95$  em todos os experimentos); b) o efeito não é observado em raízes não noduladas ou que apresentem apenas nódulos inefetivos. O intercepto da curva (fixação igual a zero) fornece o valor do custo de manutenção e crescimento de raízes e nódulos.

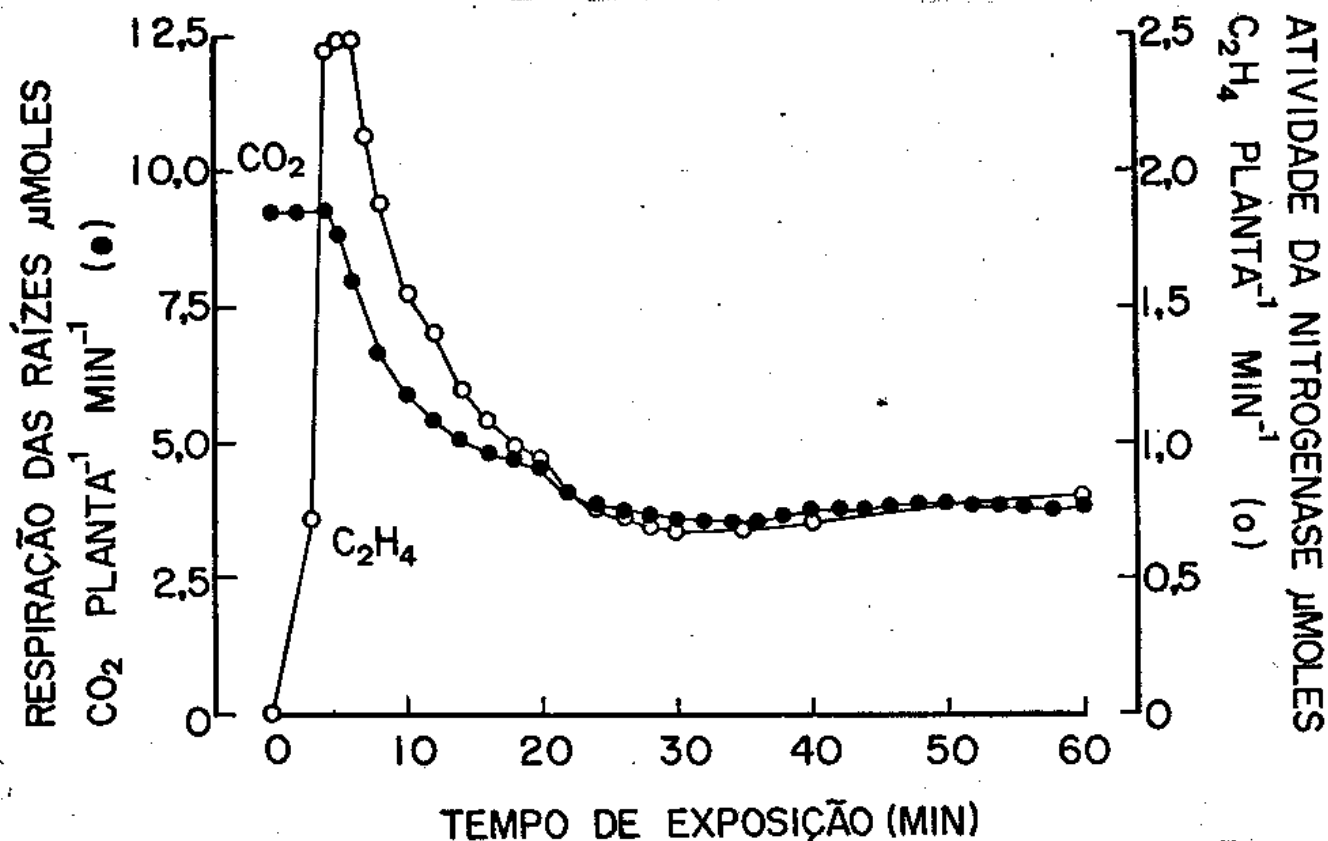


FIGURA 2: Evolução de CO<sub>2</sub> e ARA de raízes noduladas de trevo branco no sistema de fluxo contínuo de gases (adaptado de Minchin et al., 1983a).

A conversão dos valores obtidos a partir das taxas CO<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> em CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> requer entretanto um fator de conversão C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/N<sub>2</sub>, uma vez que o método fornece na realidade o custo respiratório por par de elétrons transferidos pela nitrogenase.

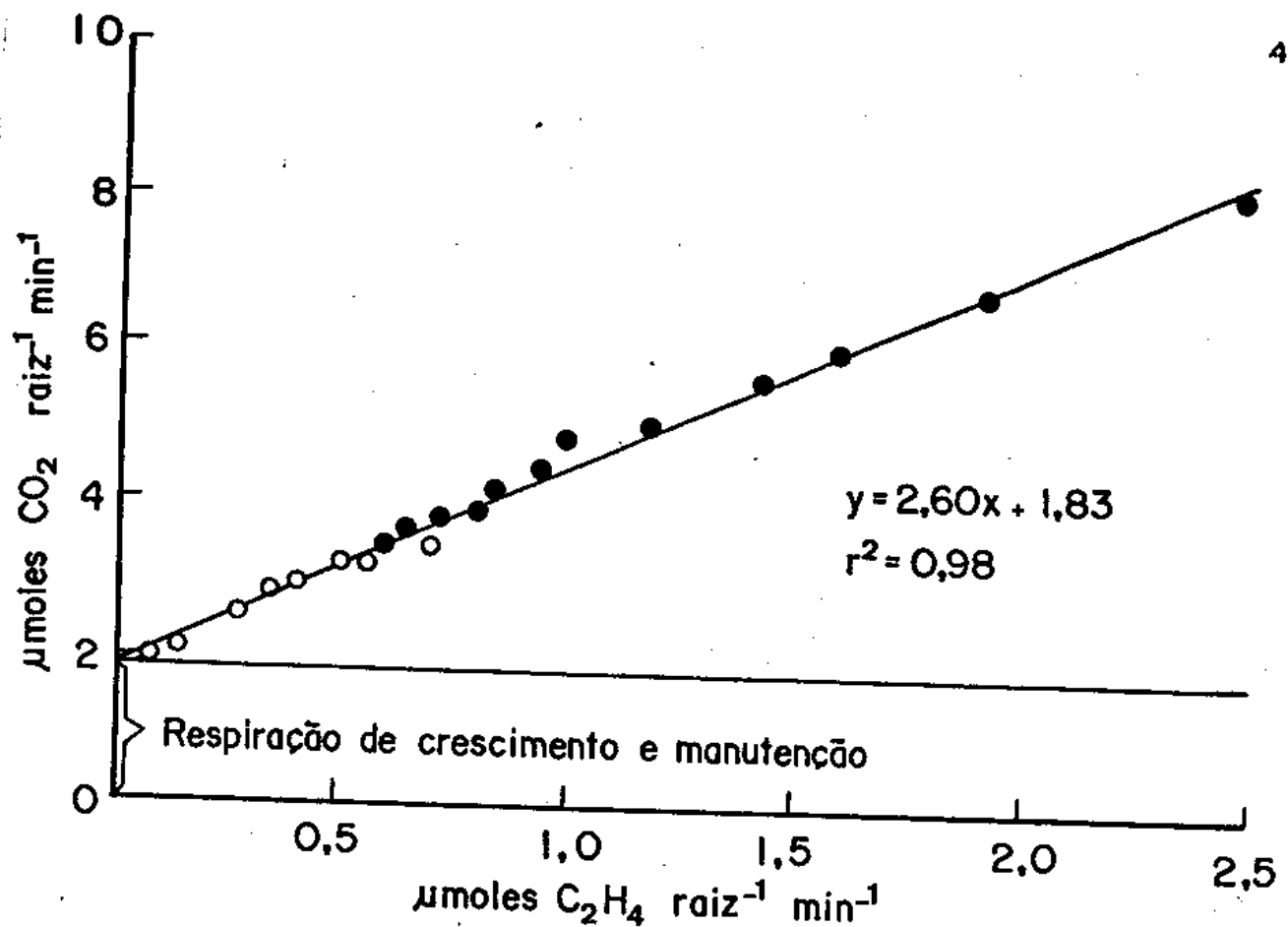


FIGURA 3: Correlação linear entre a produção de  $\text{CO}_2$  e ARA em raízes noduladas de trevo branco, expostas a  $p\text{O}_2$  decrescente. Os círculos fechados representam valores obtidos a 21%  $\text{O}_2$  e os abertos foram obtidos a  $p\text{O}_2$  mais baixas (adaptado de Witty et al., 1983).

Diversos trabalhos tem sido publicados utilizando esta metodologia para avaliação do efeito de diferentes parâmetros sobre o custo energético da fixação de nitrogênio em leguminosas. Witty et al. (1983) fizeram um levantamento entre 13 espécies de leguminosas obtendo valores entre 2-5 moles de  $\text{CO}_2$ .mol de  $\text{C}_2\text{H}_4^{-1}$ , sendo observados variações devido a estirpes de *Rhizobium* e a planta hospedeira, mas não no ciclo da planta. Skot et al. (1986) compararam o custo energético entre 9 estirpes de *Rhizobium* cada uma contendo um entre 3 plasmídeos simbióticos em combinação com um entre 3

diferentes "backgrounds" genômicos, inoculadas em ervilha. Os resultados indicam que o custo energético é pouco influenciado pela presença dos diferentes plasmídeos simbióticos. Schuller et al. (1988) compararam o custo energético em soja cv Bragg e uma mutante supernoduladora (nts 382) indicando haver eficiência respiratória semelhante no uso de carboidratos entre a cv Bragg e a supernodulante, embora esta apresente taxas específicas de ARA bem menores. Em ervilha, o custo energético de uma mutante supernoduladora nod3 em relação a cv Rondo foi 25% menor. A atividade específica de ARA foi também menor e a produção de matéria seca foi apenas 50% da cultivar selvagem (Rosendahl et al., 1989).

Após esta apresentação crítica das metodologias até agora utilizadas para medição do custo energético da fixação de nitrogênio é fácil compreender a extensa gama de valores apresentados na Tabela 4, mesmo quando considera-se a mesma espécie de leguminosa. Além das diferenças devido às características das metodologias utilizadas, trabalhos publicados utilizando a mesma metodologia diferem nas condições de crescimento das plantas: casa de vegetação ou câmara de crescimento, temperatura, luminosidade, etc. Um exemplo são os trabalhos de Rosendahl e Jakobsen (1988) e Skot et al. (1986) onde ambos trabalharam com ervilha em câmara de crescimento mas sob condições de temperatura e luminosidade diferentes. Embora tenham obtido valores

semelhantes ou muito próximos de custo energético da fixação de nitrogênio, é difícil fazer comparações entre as cultivares utilizadas por estes autores. A utilização de uma mesma metodologia por diferentes autores, para avaliação de custo energético, como tem sido observado nos trabalhos mais recentes em relação ao método de Witty et al. (1983), pode facilitar os estudos comparativos e de efeitos de diferentes parâmetros (ciclo da planta, ciclo diurno, luminosidade e temperatura) sobre o custo da fixação de nitrogênio.

### 2.3 Variação diurna e ontogenética do custo energético da fixação de nitrogênio.

Conforme visto no item anterior, a maioria das metodologias utilizadas para avaliação do custo energético da fixação de nitrogênio "in vivo" envolvem medições de respiração de raízes e nódulos. Muitos fatores podem provocar variações nas taxas respiratórias de raízes noduladas, tais como idade da planta, variações diurnas de temperatura e luminosidade (Pate et al., 1981), atividade das carboxilases (Christeller et al., 1977), atividade metabólica geral de raízes e nódulos e a presença de nódulos em crescimento ainda sem atividade da nitrogenase mas com intensa atividade respiratória (Minchin et al., 1981).

Flutuações diurnas no fornecimento de fotossintatos podem influenciar a atividade de raízes e nódulos (Minchin et

al., 1981). Variações diurnas na respiração de raízes foram relatadas em soja (Ryle et al., 1978, 1979a; Finke et al., 1982), ervilha (Minchin & Pate, 1973, 1974), caupi (Neves et al., 1981; Ryle et al., 1979a; Rainbird et al., 1983a) e Vicia (Breeze & Elston, 1978) podendo ser explicadas por variações diurnas na temperatura do ambiente radicular (Finke et al., 1982; Ryle et al., 1989; Gordon et al., 1989) embora sob condições de campo, a radiação solar pode também ser importante (Minchin et al., 1981).

A atividade da nitrogenase também apresenta variações diurnas mas os dados obtidos pelos diferentes autores são de difícil interpretação, devido a utilização de diferentes técnicas de análise e condições de crescimento das plantas. Minchin et al. (1981) apresentam um quadro com os padrões de variação na atividade da nitrogenase obtidos por vários autores em diferentes plantas. Se a atividade da nitrogenase é limitada pelo suprimento de carbono recém-assimilado o perfil típico de variação diurna na atividade da nitrogenase seria um pico durante o dia seguido por taxas de atividade decrescente ou constantes durante a noite (Bergersen, 1970; Hardy et al., 1971; Silva, 1989). No entanto em muitos casos não há um ritmo diurno (Fishbeck et al., 1973; Hart, 1976) ou ocorrem picos de atividade no final do dia (Sellstedt et al., 1989) ou durante a noite (Ayanaba & Lawson, 1977). Isto poderia ocorrer devido a acúmulos transientes de açúcares e polissacarídeos produzidos durante

o dia, ou a variações ambientais que possam estar atuando diretamente sobre a barreira a difusão de  $O_2$ , regulando a atividade da nitrogenase conforme o equilíbrio de gases no interior do nódulo (Hunt et al., 1988). De modo geral, o padrão diurno da atividade da fixação de nitrogênio é afetado por diferenças na morfologia e fenologia da planta, variações na intensidade luminosa, temperatura do solo e do ar, umidade e conteúdo de água na planta, e também pelo estágio de desenvolvimento da planta (Minchin et al., 1981). O padrão diurno de atividade da nitrogenase, quando medido pela ARA, pode ser ainda devido a variações na evolução de  $H_2$  (Rainbird et al., 1983a).

O padrão de variação da atividade respiratória dos nódulos é semelhante ao da ARA, resultando numa relação constante entre respiração e atividade da nitrogenase no ciclo diurno (Mahon, 1977; Rainbird et al., 1983a, 1984; Ryle et al., 1989). No entanto a evolução de  $H_2$  e a ARA podem apresentar variações diurnas assíncronicas (Sellstedt et al., 1989) de modo que variações diurnas na relação  $CO_2$  evoluído/ $N_2$  fixado são esperadas (Rainbird et al., 1983a). Além disso, a natureza das vias metabólicas no nódulo pode variar durante o ciclo diurno, resultando numa eficiência variável no acoplamento da geração de ATP e poder redutor à oxidação dos substratos disponíveis (Rainbird et al., 1983a). Variações diurnas de custo energético de atividade da nitrogenase foram relatadas em ervilha por Skrdleta et al.



(1984) em termos de  $\text{CO}_2$  evoluído. $\text{C}_2\text{H}_4$ <sup>-1</sup> produzido e  $\text{CO}_2$  evoluído. $\text{N fixado}$ <sup>-1</sup>. Para ambos parâmetros ocorreu um máximo durante o período noturno e um mínimo durante o final do período diurno. No entanto, em caupi, Rainbird et al. (1983a) não observaram variação no gasto de  $\text{CO}_2/2$  elétrons utilizadas pela nitrogenase durante o fotoperíodo, porém a relação  $\text{CO}_2$  evoluído. $\text{N fixado}$ <sup>-1</sup> mostrou variação diurna significativa, sendo os valores obtidos durante o fotoperíodo o dobro dos obtidos durante a noite.

Variações ontogenéticas na atividade respiratória e da fixação de nitrogênio foram relatadas por diversos autores (Herridge & Pate, 1977; Mahon, 1977a; Pate & Herridge, 1978; Ryle et al., 1979a, b; Neves et al., 1981; Minchin et al., 1980), havendo uma relação muito próxima entre as taxas respiratórias e da fixação de nitrogênio nos nódulos (Minchin et al., 1980). Através de um levantamento de diversos trabalhos, Minchin et al., (1981) verificaram que o perfil mais comum de variação na atividade da fixação de nitrogênio mostra um aumento durante o período vegetativo, frequentemente se estendendo até o início do período reprodutivo, seguido por um declínio que coincide com o período de enchimento dos grãos. A evolução de  $\text{H}_2$  pelos nódulos também apresenta um perfil sazonal (Bethlenfalvay & Phillips, 1977a, b). Em alguns casos a taxa máxima de evolução de  $\text{H}_2$  coincide com o florescimento e precede o pico da fixação de nitrogênio (Bethlenfalvay & Phillips, 1977a),

consequentemente a eficiência relativa da nitrogenase aumenta após o florescimento (Minchin et al., 1981). Há no entanto, diferenças entre as simbioses quanto ao perfil ontogenético de variação nestas atividades.

Com base nas variações ontogenéticas que são verificadas nas atividades da nitrogenase, evolução de  $H_2$  e eficiência relativa pode-se supor que a eficiência nodular em termos de consumo de C/N assimilado deva também variar durante o ciclo da planta. Alguns trabalhos mostram que durante o estágio vegetativo, no período de intensa fixação de nitrogênio, os nódulos são mais eficientes, ocorrendo um decréscimo significativo na eficiência à medida que a planta avança no estágio reprodutivo.

Este padrão foi observado para soja (Ryle et al., 1978; Warembourg, 1983; Ryle et al., 1984), caupi (Minchin et al., 1980) e trevo (Warembourg & Rounet, 1989). Este decréscimo em eficiência nos estágios finais de desenvolvimento da planta tem sido associado à senescência dos nódulos primários e à substituição destes por uma população secundária menos eficiente e também à competição entre os nódulos e os órgãos reprodutivos pelos fotossintatos. Em ervilha (Rosendahl et al., 1989; Skrdleta et al., 1983) e soja (Ryle et al., 1978) foi verificada uma menor eficiência nodular também no início do desenvolvimento vegetativo provavelmente associada ao dispêndio energético associado a formação do nódulo e ao início de atividade da

nitrogenase. Outros trabalhos porém não verificaram efeito da idade da planta no custo energético de atividade da nitrogenase (Witty et al., 1983; Rosendahl & Jakoben, 1988), embora para ervilha, alfafa e feijão tenha havido decréscimo na proporção da respiração ligada a atividade da nitrogenase e em outra cultivar de ervilha tenha sido verificado aumento nesta proporção. Pela diversidade dos dados obtidos por diferentes autores, inclusive quanto ao padrão de variação nos parâmetros de custo energético, fica evidente a necessidade de um maior número de trabalhos nesta área, visando inclusive a seleção de simbioses mais eficientes energeticamente, principalmente durante os estágios iniciais do período reprodutivo. Além disso, a medida que as metodologias de avaliação permitam estudos comparativos, seria interessante estudar o custo energético da fixação de nitrogênio das simbioses mais promissoras sob condições ambientais adversas. Estes estudos são importantes especialmente em climas tropicais onde a ocorrência de altas temperaturas no solo é bastante comum.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Experimento I:

Variação na atividade da nitrogenase, evolução de  $H_2$  e ER durante o estágio reprodutivo da soja.

##### 3.1.1 Condução do experimento:

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na EMBRAPA-CNPBS, Km 47, Rio de Janeiro.

Sementes de soja (Glucine max), cv Doko, foram desinfestadas superficialmente em bicloreto de mercúrio ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ; Vincent, 1970), pré-germinadas em placas de agar-água e plantadas em vasos plásticos de 4,0 l de capacidade. Os vasos foram desinfestados com água sanitária e a seguir, lavados com água esterilizada. Foram colocadas 4 sementes por

vaso, e 6 dias após o plantio foi feito um desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso. O substrato utilizado foi uma mistura de vermiculita e areia, na proporção 1:2, anteriormente lavado em água corrente durante 30 dias, seco e esterilizado em autoclave.

As plântulas foram inoculadas com cada uma das seguintes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*: CB1809 (BR033), 29W (BR029), DF383 (BR077) e SEMIA587 (BR096). As estirpes foram crescidas em meio inclinado YMA (Vincent, 1970) a 30°C por 7 dias. Uma suspensão contendo aproximadamente de  $10^8$  unidades formadoras de colônia.ml<sup>-1</sup> foi preparada pela adição de 20 ml de solução de sais esterilizada. A inoculação foi feita 7 dias após a emergência (DAE), colocando-se 1 ml desta suspensão junto ao hipocótilo. Após a inoculação, a superfície do vaso foi coberta com uma camada de areia esterilizada de aproximadamente 3 cm.

De modo a diminuir os riscos de contaminação nos vasos, a irrigação foi feita com água destilada estéril, adicionada diariamente, através de um tubo plástico introduzido cerca de 10 cm no substrato, mantendo-se o orifício superior tampado com papel alumínio. Solução nutritiva esterilizada de Norris & T'Mannetje (1964) foi adicionada a cada 7 dias.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com 3 repetições, 4 tratamentos e 3 coletas,

totalizando 36 vasos. As coletas foram realizadas aos 60, 75 e 110 DAE, correspondendo aos períodos de floração, início da formação das vagens e enchimento de grãos.

### 3.1.2 Coleta de dados:

As plantas foram cortadas na altura do nó cotiledonar e após serem retiradas do solo e removido o substrato, foram medidas as atividades da nitrogenase e evolução de  $H_2$  para cálculo da eficiência relativa.

#### 3.1.2.1 Evolução de $H_2$ :

As raízes noduladas foram incubadas em frascos de 250 ml, hermeticamente vedados com rolha tipo "Suba-Seal" (William Freeman & Co., Barnsley, England) por 10 minutos. Uma alíquota de 1,5 ml da fase gasosa foi então retirada com seringa e estocada em "Vacutainers" (Becton Dickinson, Ind. Cirúrgicas, Minas Gerais, Brasil). Posteriormente, o conteúdo de  $H_2$  foi determinado por cromatografia gasosa usando-se um detector de condutividade térmica conforme ítem 3.3.2.5.

Para efeito de cálculos foi utilizado um padrão de  $H_2$  a  $40 \text{ ml.l}^{-1}$ .

### 3.1.2.2 Atividade da nitrogenase:

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno descrito por Dart et al. (1972), mas o tempo de incubação foi reduzido para 5 min de modo a diminuir o erro experimental desta metodologia (Minchin et al., 1983a). Os frascos contendo as raízes noduladas, após a retirada da amostra para leitura da evolução de  $H_2$ , foram abertos para reequilíbrio do sistema e novamente vedados com rolha do tipo "Suba-Seal". A seguir, 10% do volume do frasco foi substituído por  $C_2H_2$ . Os frascos foram então incubados por 5 min a temperatura ambiente. Após esse tempo, alíquotas de 1,5 ml foram retiradas e guardadas em "Vacutainers" de 10 ml para posterior análise cromatográfica (item 3.3.2.5).

Para efeito de cálculo foi utilizado um padrão de  $C_2H_2$  a  $104 \mu l.l^{-1}$ .

### 3.1.2.3 Cálculo da eficiência relativa:

A eficiência relativa foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído no ar}}{C_2H_2} \times 100$$

(Schubert & Evans, 1976)

### 3.2 Experimento II:

Medida da razão  $C_2H_2 : N_2$  através de incubação com  $^{15}N_2$ .

#### 3.2.1 Condução do experimento:

O experimento foi conduzido conforme 3.1.1. exceto que foram utilizados potes plásticos de 500 ml para plantio, contendo 1 planta por vaso. As plantas foram mantidas nestes potes por apenas 30 dias evitando-se o desenvolvimento excessivo do sistema radicular, o que exigiria um gasto maior de  $^{15}N_2$  no sistema de incubação. As plantas foram então cuidadosamente retiradas dos vasos, todo o substrato foi removido por imersão em água e foram a seguir transferidas para potes plásticos de 500 ml de volume, que permitiam a vedação hermética, necessária posteriormente. Nestes potes, as plantas foram mantidas em solução nutritiva aerada por 3 dias antes da incubação com  $^{15}N_2$ , para adaptação ao novo sistema. A tampa dos potes foi cortada para passagem e fixação da parte aérea, e, um dia antes da coleta, 4 plantas, uma de cada tratamento, foram agrupadas por vaso, de modo a reduzir o volume de gás necessário e permitir o manuseio simultâneo dos sistemas de incubação. Estes vasos foram então



fechados hermeticamente (vide ítem 3.3.2.1), mantendo-se dois orifícios, um no fundo do vaso para aeração antes da coleta ou passagem da solução nutritiva no momento da incubação com  $^{15}\text{N}_2$ . Outro orifício foi feito na tampa para passagem de um tubo de plástico rígido, fixado com cola "Durepoxi" (Pulvitec S.A., São Paulo, Brasil) usado para entrada dos gases e retirada de amostras durante a incubação (Figura 4).

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 4 tratamentos (estirpe CB 1809, 29 W, DF 383 e SEMIA 587) e 4 repetições.

### 3.2.2 Sistema para preparação do gás $^{15}\text{N}_2$ :

O gás nitrogênio enriquecido com  $^{15}\text{N}$  foi obtido a partir da reação de sulfato de amônio, contendo 21% de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso ( $\text{AX}^{15}\text{N}_{\text{exc.}}$ ), com hipobromito de sódio. A Figura 5 mostra o sistema usado para obter, purificar e estocar o gás, baseado em Matsui et al. (1978) e Witty & Day (1978).

O sistema consistiu de 3 componentes básicos: a) câmara de reação; b) linha de purificação e c) frasco para estocagem. Uma bomba de vácuo ou um cilindro de argônio foram acoplados alternadamente ao sistema através de "V" para retirada de qualquer vestígio de nitrogênio do ar.

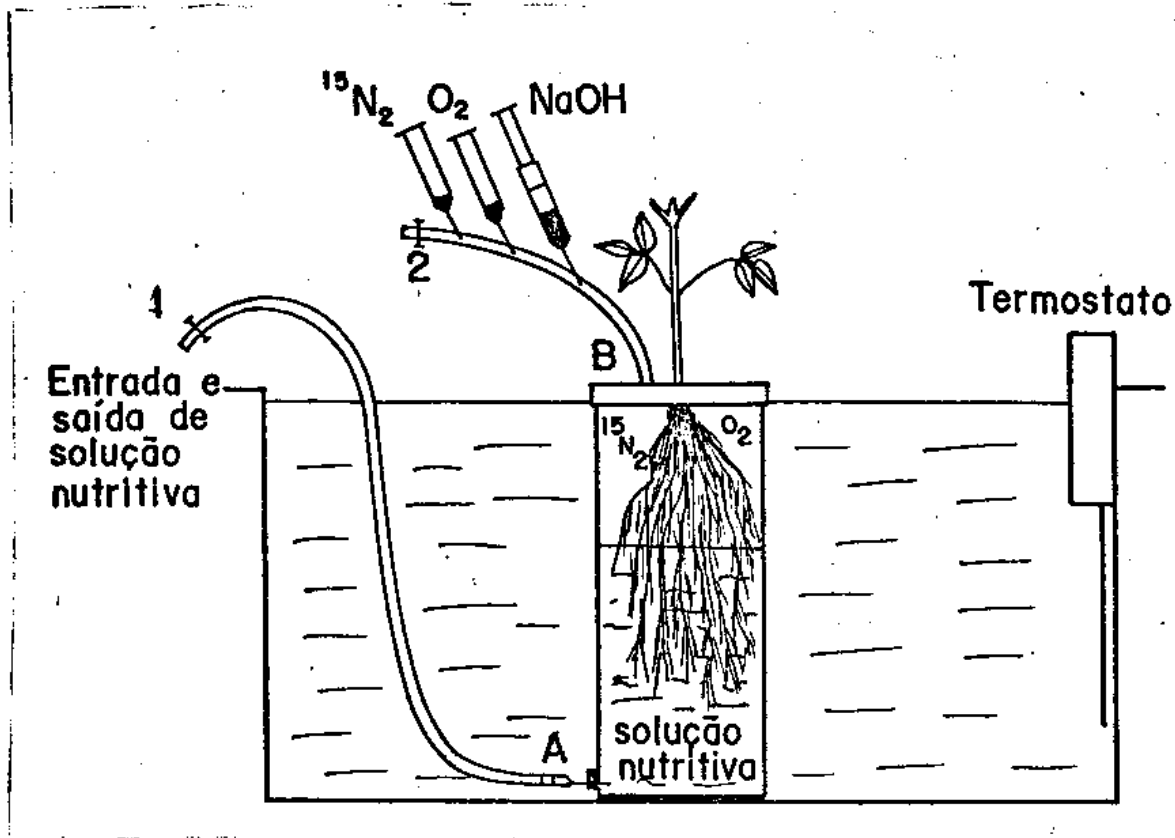


FIGURA 4: Sistema utilizado para incubação das plantas em  $^{15}\text{N}_2$ .

A câmara de reação montada sobre um agitador, consistiu de um funil de decantação (A), para depósito da solução de sulfato de amônia. Esta era adicionado gota a gota no balão (B) contendo hipobromito de sódio e um agitador magnético. Este balão era mantido imerso em um recipiente contendo gelo. Os frascos A e B foram conectados através de

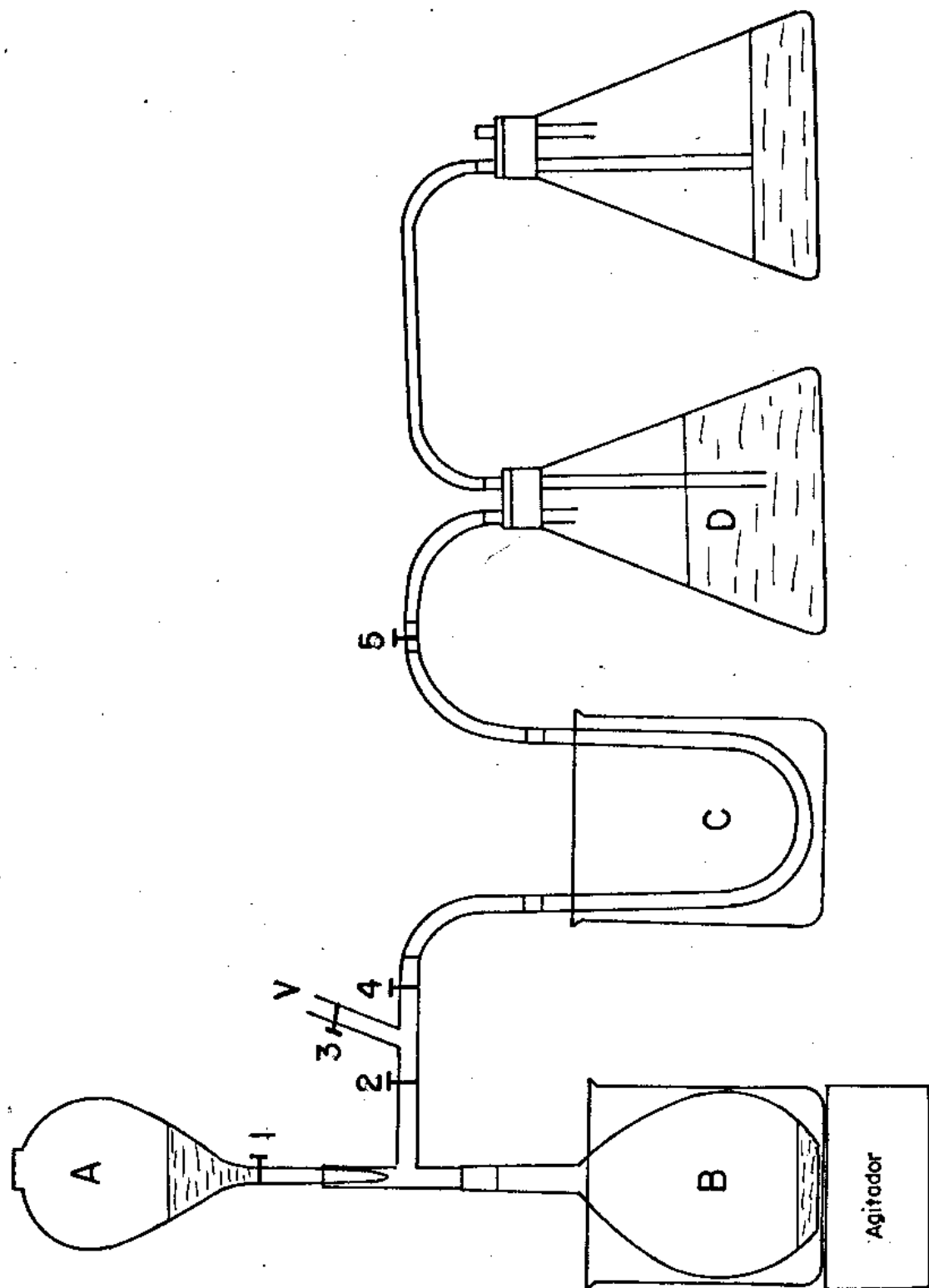


FIGURA 4: Sistema utilizado para preparação do gás  $^{15}\text{N}_2$ .

um "T" de vidro. O gás produzido era passado através das conexões de vidro e borracha de silicone até a linha de purificação, que consistia de um "U" de vidro (C) mergulhado em nitrogênio líquido. A partir daí o gás era empurrado até o frasco de estocagem (D), contendo vaselina para diminuir a perda de  $^{15}\text{N}_2$  para o líquido. Foi montado um sistema de vasos comunicantes para permitir o equilíbrio entre o volume de gás que entrava no sistema e a saída da vaselina. Este sistema facilita a utilização do gás armazenado. Todas as juntas e válvulas do sistema foram lubrificadas com graxa para alto vácuo.

A solução de hipobromito de sódio foi preparada reagindo-se 40 ml de uma solução de NaOH (40g em 40ml de água) com 4 ml de  $\text{Br}_2$ , acrescentados, aos poucos. O frasco de reação foi mantido resfriado numa capela de exaustão, por imersão em uma mistura 3:1 de gelo picado e sal. Esta quantidade é suficiente para preparar 200 ml de gás nitrogênio. Para produção deste volume de gás foram gastos 1,2 g de sulfato de amônio marcado, dissolvidos em 10 ml de água.

#### 3.2.2.1 Produção de $^{15}\text{N}_2$

Devido a baixa marcação do sulfato de amônia utilizado, todo cuidado foi tomado de modo a evitar a contaminação do sistema com nitrogênio proveniente do ar. O

gás foi preparado do seguinte modo:

1) colocou-se a solução de hipobromito de sódio em B;

2) com a válvula Nº 2 fechada, Nº 3, 4 e 5 abertas, o sistema foi evacuado através de V, até a vaselina preencher totalmente o frasco C e chegar até a válvula 4, a qual foi fechada permanecendo assim até o início da reação;

3) com a válvula Nº 1 fechada, Nº 2 e 3 abertas foi aplicando alto vácuo por 5 minutos, usando para isto uma bomba de difusão, logo após foi fechada a válvula Nº 3;

4) Foi substituída a bomba de difusão pela saída de um cilindro de argônio, aberta a válvula Nº 1, e passado um fluxo forte de argônio no sistema por 2-3 minutos;

5) Os procedimentos 3 e 4 foram repetidos mais 2 vezes para garantir a retirada de qualquer vestígio de nitrogênio;

6) O sistema foi evacuado (procedimento 3) para início da reação e a solução de sulfato de amônio marcado foi colocada em A com a válvula Nº 1 fechada. A válvula Nº 1 foi aberta cuidadosamente e o conteúdo de A foi gotejado em B sob forte agitação, mantendo-se as válvulas Nº 2 e 4 abertas e a 3 fechada;

7) Antes que a solução em A terminasse, adicionou-se mais um pouco de água, continuando-se a reação até terminar a efervescência que era produzida pela reação;

8) Para transportar o gás até o recipiente D, foi

adicionada água até encher o recipiente A, abrindo-se então cuidadosamente a válvula Nº 1 até que a pressão no sistema fosse equilibrada pela água;

9) A partir daí, abriu-se a válvula Nº 5 e empurrou-se o gás com a água até o recipiente D, passando pelo sistema de resfriamento C;

10) Quando a água chegou até a válvula Nº 5, esta foi fechada e o recipiente C, juntamente com esta válvula, foi desligado do sistema, permitindo o transporte e utilização do gás no experimento;

11) Duas amostras de 10 ml de gás foram guardadas em "Vacutainer" para leitura do enriquecimento do gás em espectrômetro de massa.

### 3.2.3 Sistema para incubação das plantas com $^{15}\text{N}_2$ :

As plantas foram incubadas em um tanque de água com temperatura controlada a 33°C.

O procedimento para incubação das raízes noduladas foi o seguinte (Figura 4):

1) O vaso foi desligado do sistema de aeração e um tubo de látex foi acoplado em A, por onde o vaso foi preenchido com solução nutritiva até esta começar a sair em B. Este tubo de entrada foi mantido num nível superior ao sistema para evitar o retorno da água.

2) A válvula Nº 2 foi fechada e 150 ml de  $^{15}\text{N}_2$  e 30

ml de  $O_2$  foram injetados através de um septo, expulsando igual volume de água pela borracha acoplada em A. Neste momento foram retiradas de cada vaso duas amostras de 10 ml, guardadas em "Vacutainer", para leitura de enriquecimento de  $^{15}N$ .

3) A válvula Nº 1 foi fechada e o vaso mantido assim durante o período de aproximadamente 1 hora.

4) Amostras foram retiradas a cada 10 minutos para leitura da concentração de  $O_2$  no sistema, o qual foi mantido sempre em torno de 20%, através de oxigênio injetado com uma seringa através de B. Ao final da incubação, duas novas amostras de gases foram retiradas para leitura da  $AZ^{15}N_{exc}$  ao final da incubação. A  $pCO_2$  nos vasos foi mantida baixa através do bombeamento da atmosfera dos vasos com uma seringa contendo NaOH, embora através de um experimento preliminar tenha sido observado que a exposição dos nódulos a  $pCO_2$  elevadas não provoca decréscimos significativos na ARA, o que está de acordo com os dados de Hopmans et al. (1983).

5) Após o período de incubação, a válvula Nº 1 foi aberta e todo o vaso foi novamente preenchido com solução nutritiva para retirada de todo o gás marcado do sistema.

#### 3.2.4 Medições de ARA e evolução de $H_2$

As plantas foram retiradas cuidadosamente dos

vasos, a parte aérea foi cortada na altura do nó cotiledonar e as raízes noduladas foram incubadas no mesmo tanque para leitura da evolução de  $H_2$  e da ARA. Para leitura da evolução de  $H_2$ , as plantas foram incubadas durante 10 minutos em frascos de 25 ml de capacidade mantidos na mesma temperatura usada no experimento. Após este período, alíquotas de 3 ml foram retiradas e guardadas em "Vacutainer" para análise cromatográfica (ítem 3.3.2.5). A ARA foi medida nestes mesmos frascos, os quais foram abertos para reequilibrar o sistema, fechados novamente e foi injetado 2,5 ml de  $C_2H_2$ . A incubação foi feita durante 5 minutos a  $33^\circ C$  e alíquotas de 3 ml foram retiradas para leitura da concentração de  $C_2H_4$  por cromatografia (ítem 3.3.2.5), logo a seguir, as raízes noduladas foram congeladas para término da atividade dos nódulos.

### 3.2.5 Determinação da $AZ^{15}N$ em excesso nas amostras gasosas provenientes do sistema de incubação

Para leitura da percentagem de enriquecimento dos gases usados no experimento, foi utilizado um espectrômetro de massa modelo VG900 (VG-ISOGAS, Middlewich, Inglaterra).

As amostras de gás que provinham de vasos de incubação, continham cerca de 20% de oxigênio. Como este gás interfere na leitura do espectrômetro de massa, foi feita uma lavagem em pirogalol para absorção do  $O_2$  da amostra antes da



entrada desta no aparelho.

Para isto, uma solução de KOH saturado foi inicialmente preparada misturando-se 100g de KOH em 100 ml de água destilada. Foram pesadas 200 mg de pirogalol e colocadas no próprio frasco de amostras do espectrômetro, juntamente com um mini agitador magnético. O frasco foi encaixado, o sistema evacuado e injetado 2 ml da solução de KOH. Cerca de 1 ml de amostra de ar foi inicialmente injetada para teste e o conteúdo do frasco foi agitado durante cerca de 5 minutos. A seguir a amostra foi congelada e procedida a leitura para determinação do pico de oxigênio. Após o teste foi procedida leitura das amostras de gases contendo N marcado.

Foi preparado um padrão contendo cerca de 10,5% de  $A^{15}N_{exc}$ . para calibração do aparelho.

### 3.2.6 Cálculo do N fixado:

As amostras de nódulos, raízes e parte aérea das plantas foram secas separadamente em estufa a 60°C até peso constante e foram então determinados o peso, N-total pelo método Kjeldahl e a  $AZ^{15}N_{exc}$  por espectrometria de massa, para cada parte da planta. Inicialmente determinou-se a variação natural existente em nódulos, raízes e parte aérea, separadamente, de plantas de soja cultivadas nas condições do experimento mas não expostas ao gás enriquecido. Estas

amostras foram usadas como controle, uma vez que a variação natural na  $AZ^{15}N$  de amostras de plantas frequentemente difere do valor 0,365 ( $AZ^{15}N$  presente naturalmente no ar).

O valor de  $AZ^{15}N_{exc.}$  das amostras de nódulos, raízes e parte aérea das plantas expostas ao gás enriquecido, foi calculada, separadamente então pela seguinte fórmula:

$$AZ^{15}N_{exc. amostra} = AZ^{15}N_{amostra} - AZ^{15}N_{controle}$$

A quantidade de nitrogênio fixado no período de uma hora foi calculado, para cada parte da planta, pela fórmula:

$$N_2 \text{ fixado (umoles)} = \frac{N_{amostra}(\text{umoles}) \times AZ^{15}N_{exc. amostra}}{AZ^{15}N_{exc. na fase } N_2} \times \frac{60}{t}$$

onde  $t$  = tempo de incubação, que variou entre os blocos (vasos de incubação) de 63 a 70 minutos. A soma do nitrogênio fixado em cada parte da planta foi dividida pelo peso seco de nódulos de modo a obter-se a atividade específica de fixação de nitrogênio, expressa em umoles N fixado.g de nódulo<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

### 3.3 Experimento III:

Variação do custo energético de atividade da nitrogenase e de manutenção de raízes e nódulos durante o

estágio reprodutivo da soja.

### 3.3.1 Condução do experimento:

O experimento foi conduzido conforme descrito em 3.1.1 exceto que foram utilizados vasos de 1,5 Kg, contendo 1 planta por vaso. Os tratamentos foram os mesmos do referido experimento e as coletas realizadas nos mesmos períodos, obedecendo ao mesmo delineamento experimental.

Três dias antes do início de cada coleta, os vasos foram levados para um tanque de água com temperatura controlada a 33°C, o nível da água no tanque foi mantido até a altura de 5 cm da borda do vaso.

### 3.3.2 Sistema de fluxo contínuo de gases para leitura da evolução de CO<sub>2</sub> e ARA:

#### 3.3.2.1 Preparação dos vasos:

Foram utilizadas Jarras plásticas de 1,5 l de capacidade, cuja tampa possui uma abertura que permite a passagem da planta na fase inicial do crescimento. Na época da coleta, os vasos foram vedados hermeticamente para permitir a passagem de um fluxo de 500 ml/min da mistura gasosa utilizada. A vedação da tampa foi feita com massa de

vidraceiro. A seguir, passou-se uma camada de borracha de silicone cobrindo a junção da tampa com o vaso e por último o local foi envolvido com fita crepe. No local de saída do caule foi adaptada uma seringa assentada sobre uma base preparada com cola "Durepoxi" para saída dos gases ou entrada de água e solução nutritiva. O espaço ao redor do caule foi preenchido com pedaços de isopor recobertos com cola de silicone (Silastic RTV, Dow Corning do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). A abertura lateral próxima ao fundo do vaso, utilizada para drenagem, foi fechada com uma "Suba-Seal" para permitir a entrada dos gases (Figura 6). Até o momento da coleta dos dados, os vasos foram mantidos aerados através de uma linha de ar suprida por um compressor.

#### 3.3.2.2 Sistema de fluxo contínuo de gases:

Um sistema de fluxo de gases (Figura 6), foi montado de modo a permitir a leitura simultânea das taxas de ARA e respiração das raízes noduladas de plantas intactas conforme descrito por Minchin et al. (1983a). A mistura gasosa provinha de um cilindro de nitrogênio, outro de  $C_2H_2$  e de um compressor. Parte do fluxo de ar do compressor foi usada para aeração dos vasos no intervalo das análises. O fluxo dos gases foi controlado com válvulas reguladoras e fluxímetros, de modo a obter-se as diferentes misturas de gases usadas no experimento. Um frasco para lavar gases tipo

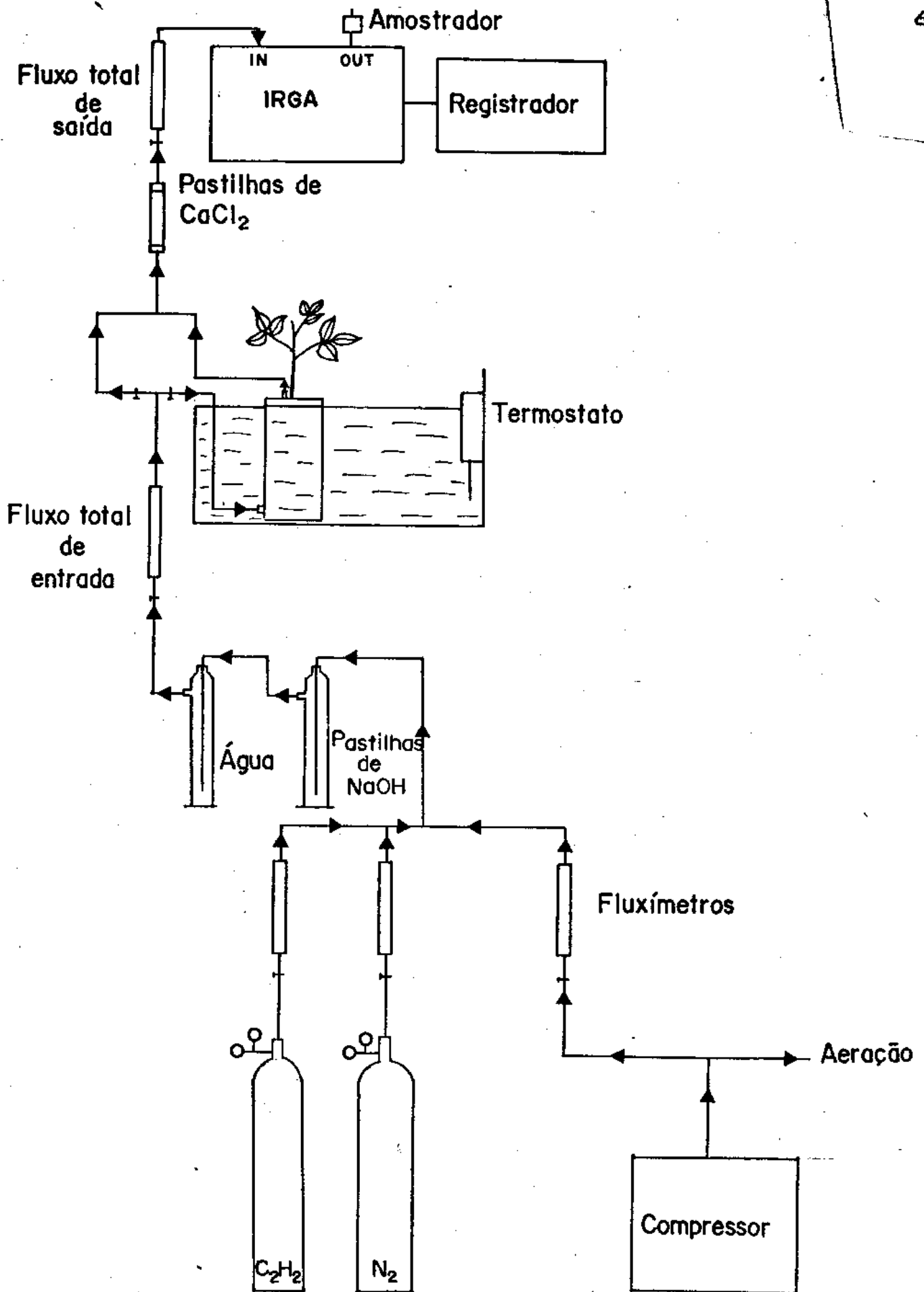


FIGURA 6: Sistema de fluxo contínuo de gases

Dreschel, de 500 ml, contendo pastilhas de NaOH foi utilizado para absorção do  $\text{CO}_2$  do ar e/ou contaminantes dos cilindros. A seguir os gases foram umidificados em um Dreschel contendo água. Ao sair do vaso, o fluxo de ar foi desumidificado em uma coluna contendo cloreto de cálcio em pastilhas, antes de entrar no analisador de gases por infra vermelho (IRGA) modelo 864 (Beckman Industrial, Fullerton, USA) acoplado a um registrador potenciométrico, para determinação de  $\text{CO}_2$ . Dois fluxímetros controlavam a entrada e saída de gases do vaso de modo a detectar possíveis vazamentos. Na saída do IRGA foi adaptado um septo para retirada de amostras dos gases, que eram guardadas em "Vacutainer" para posterior análise de  $\text{O}_2$  e  $\text{C}_2\text{H}_4$  por cromatografia gasosa.

### 3.3.2.3 Calibração do IRGA:

Para permitir a aferição do IRGA, um sistema de fluxo de gases adicional teve que ser montado conforme Figura 7. O fluxo proveniente de dois cilindros de gases, um de  $\text{CO}_2$  e outro de nitrogênio puro foram controlados independentemente por fluxímetros e válvulas-agulha de ajuste fino. Antes da entrada no aparelho, o fluxo de gás foi misturado e passado por um estabilizador de fluxo. Uma válvula e um fluxímetro foram usados na regulagem do fluxo total de entrada no IRGA. Um amostrador foi adaptado na entrada do aparelho para retirada de amostra da mistura.

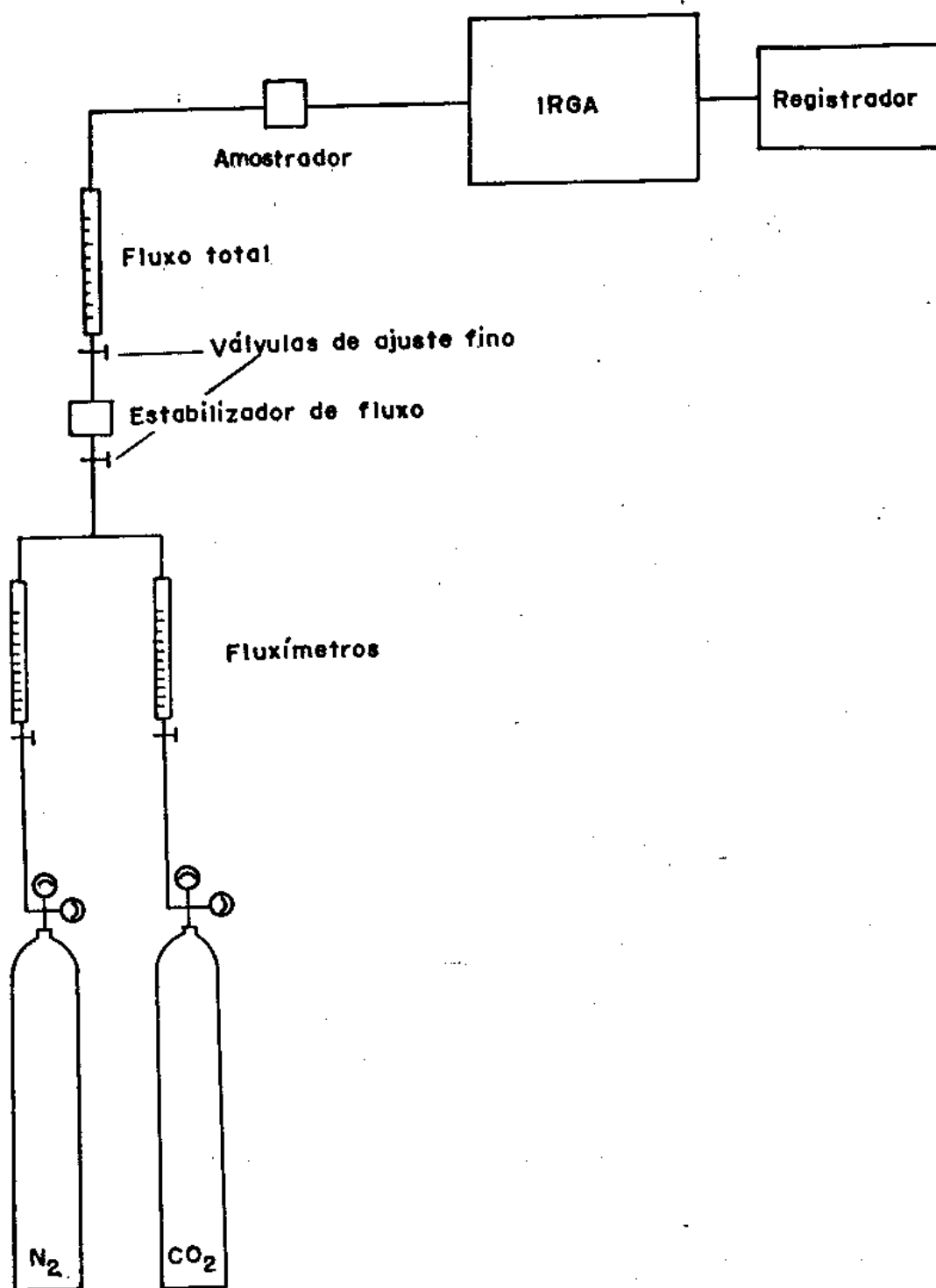


FIGURA 7: Sistema para calibração do IRGA

A calibração foi iniciada pela passagem de um fluxo de nitrogênio puro pelo aparelho, regulando-se o valor zero. A seguir uma mistura de 500 ppm de CO<sub>2</sub> no fluxo foi ajustada, calibrando-se o valor 100. A determinação da concentração de 500 ppm de CO<sub>2</sub> foi feita por cromatografia gasosa. Uma curva de calibração foi obtida inicialmente no cromatógrafo pela mistura, em vacuotainer, de diferentes quantidades de CO<sub>2</sub> e nitrogênio.

#### 3.3.2.4 Procedimento para leitura da evolução de CO<sub>2</sub> e ARA:

Foi realizado um teste com as plantas de modo a determinar se os sistemas simbióticos estavam sujeitos a uma queda inicial nas taxas de respiração devido a exposição ao C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Minchin et al., 1983b). As plantas foram analisadas para evolução de CO<sub>2</sub> durante 20 min no sistema de fluxo contínuo de gases, antes e durante a passagem de um fluxo de 500 ml.min<sup>-1</sup> de ar contendo 10% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Neste período não foi observada queda nas taxas iniciais de evolução de CO<sub>2</sub> de modo que as análises posteriores foram iniciadas cerca de 5 min após a ligação das plantas ao sistema, aguardando-se apenas a estabilização da leitura de evolução CO<sub>2</sub>.

Antes da coleta de dados de cada planta, foi testada a saturação do NaOH utilizado para absorção do CO<sub>2</sub> proveniente do ar. Para isto, um fluxo de ar, foi desviado da planta diretamente para o IRGA após passagem nos frascos



lavadores de gases para checar a leitura do zero. Quando vestígios de  $\text{CO}_2$  foram detectados, procedeu-se a renovação das pastilhas de  $\text{NaOH}$ .

As plantas foram submetidas a uma mistura de 10%  $\text{C}_2\text{H}_2$  em ar e níveis decrescentes de  $\text{O}_2$ . O nível de  $\text{O}_2$  foi diminuído através da adição de nitrogênio até atingir 8-9% de  $\text{O}_2$  na mistura, momento em que foi interrompida a coleta de amostras, de modo a evitar a anaerobiose. A cada mudança nos níveis de nitrogênio, aguardava-se um tempo de 3 a 4 min para estabilização das taxas respiratórias das raízes e nódulos. As concentrações de  $\text{O}_2$  e  $\text{C}_2\text{H}_2$  foram determinadas por cromatografia gasosa (ítem 3.3.2.5). As taxas de produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{C}_2\text{H}_4$  foram obtidas pelo produto da concentração e o fluxo dos gases, mantido em  $500 \text{ ml}/\text{min}^{-1}$ .

Ao final de cada coleta, as plantas foram retiradas dos vasos e determinados o peso da parte aérea, raízes e nódulos secos.

### 3.3.2.5 Análises cromatográficas:

O  $\text{C}_2\text{H}_4$  foi determinado em um cromatógrafo Perkin Elmer F11 com detector de ionização de chama, usando-se uma coluna com  $0,32 \text{ cm}$  (diâmetro externo) por  $50 \text{ cm}$  de comprimento, contendo Poropak N e operada a  $40^\circ\text{C}$ , usando nitrogênio como gás de arraste, a um fluxo de  $40 \text{ ml}/\text{min}^{-1}$ .

As leituras de  $H_2$ ,  $CO_2$  e  $O_2$  foram realizadas em cromatógrafo Varian, modelo 1420 usando-se detector de condutividade térmica. Utilizou-se uma coluna de aço inoxidável com 0,32 cm (diâmetro externo) por 100 cm de comprimento, contendo peneira molecular 5A e operada a 40°C (para análise de  $H_2$  ou  $O_2$ ) ou 80°C (para análise de  $CO_2$ ), usando-se argônio (para determinação de  $H_2$  ou  $O_2$ ) ou hélio (para determinação de  $CO_2$ ) como gás de arraste a um fluxo de 25 ml.min<sup>-1</sup>.

3.3.2.6 Cálculo dos custos energéticos de atividade da nitrogenase e de crescimento e manutenção de raízes e nódulos e da porcentagem da respiração acoplada a atividade da nitrogenase.

O custo energético de atividade da nitrogenase (umoles de  $CO_2$  evoluído.umoles  $C_2H_4$  reduzido<sup>-1</sup>) foi calculado pelo coeficiente angular da reta que descreve o declínio provocado nas taxas de respiração e de ARA durante a exposição a  $pO_2$  decrescente (Figura 8). Estes valores foram convertidos em custo energético de fixação de nitrogênio (umoles  $CO_2$ .umoles de  $N_2$  fixado<sup>-1</sup>) através da utilização do fator de conversão  $C_2H_4 = N_2$  obtido conforme descrito em 3.2. O intercepto da curva, que corresponde ao ponto de ARA igual a zero, fornece o valor do custo de manutenção e crescimento de raízes e nódulos. Subtraindo-se os valores de custo de

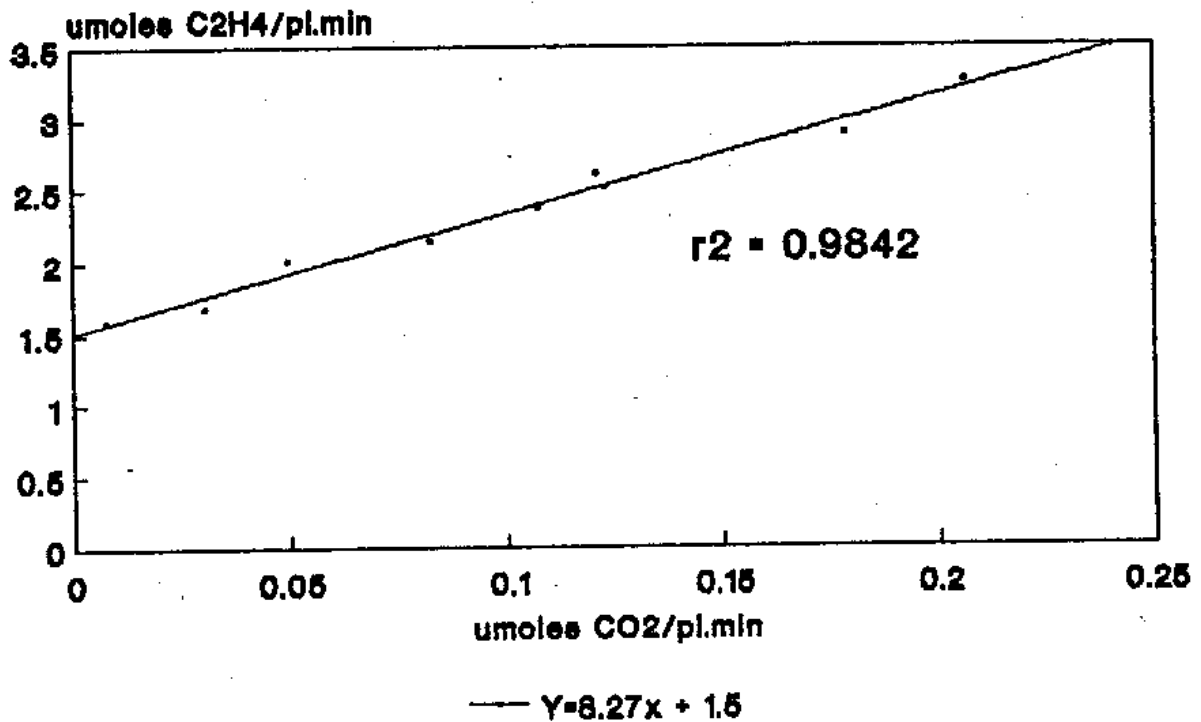


FIGURA 8: Correlação linear entre a produção de CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> em raízes noduladas de soja inoculadas com a estirpe CB 1809, expostas a pO<sub>2</sub> decrescente. Cálculo dos custos:

- Custo de manutenção = a = coeficiente de regressão = 1,5 umoles de CO<sub>2</sub>.

- Custo de atividade da nitrogenase = b = intercepto = 8,27 moles de CO<sub>2</sub>. moles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub><sup>-1</sup>.

manutenção e crescimento de raízes e nódulos da atividade respiratória das raízes noduladas antes da exposição a pO<sub>2</sub> decrescentes, calculada a porcentagem da respiração das raízes acoplada a atividade da nitrogenase.

### 3.4 Experimento IV:

Variação diurna dos custos energéticos da atividade da nitrogenase e de crescimento manutenção de raízes e nódulos.

#### 3.4.1 Condução do experimento:

O experimento foi conduzido conforme descrito em 3.3.1, exceto que foram utilizadas apenas as estirpes CB 1809 (BR 033) e 29 W (BR 029) e que as plantas foram mantidas a temperatura ambiente. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com 3 repetições e 4 coletas, totalizando 24 vasos. As coletas foram iniciadas aos 62 DAE, prosseguindo por 3 dias nos seguintes horários: 6:00, 12:00, 18:00 e 24:00 hs. As plantas foram analisadas quanto ao custo energético da atividade da nitrogenase.

#### 3.4.2 Coleta dos dados:

Os vasos foram preparados conforme descrito em 3.3.2.1 e o sistema de fluxo contínuo de gases foi utilizado para análise das plantas, conforme ítem 3.3.2.4, exceto que um menor número de pares de dados foi coletado de modo a reduzir ao mínimo o tempo de análise. Apesar disso, cerca de 40 min foram gastos para coleta dos dados de uma planta

tornando inviável a coleta de 3 repetições de cada tratamento num mesmo dia. Sendo assim a coleta prosseguiu por 3 dias, coletando-se uma repetição de cada tratamento por dia. Durante o período do experimento foram registradas as variações de temperatura e umidade relativa do ar, e nos dias das coletas, os valores de luminosidade foram monitorados em um solarímetro.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Experimento I:

Variação na atividade da nitrogenase, evolução de  $H_2$  e ER durante o estágio reprodutivo da soja.

Este experimento preliminar foi delineado com os objetivos de verificar a época de maior atividade da nitrogenase, durante o período reprodutivo da soja, para avaliação do custo energético relacionado com a atividade máxima dos nódulos, e verificar como os parâmetros de evolução de  $H_2$  e ARA variam nestas simbioses durante a ontogenia.

O período de maior atividade da nitrogenase foi o do florescimento, para todas as estirpes, havendo uma queda

substancial durante o início de formação das vagens (Tabela 5). No período de enchimento de grãos, foram observados os valores mais baixos de atividade da nitrogenase para os nódulos formados pelas estirpes 29W, DF 383 e SEMIA 587. No entanto, os nódulos formados pela estirpe CB 1809 permaneceram um período mais longo em atividade uma vez que na época de enchimento dos grãos, o nível de atividade dos nódulos formados por esta estirpe foi significativamente maior do que o dos outros tratamentos.

Para os tratamentos 29W, DF 383 e SEMIA 587, a variação entre as coletas na evolução de  $H_2$  pelos nódulos seguiu o mesmo padrão de variação da ARA. Assim, durante o florescimento houve maior evolução e os menores valores foram observados durante os períodos de início de formação das vagens e de enchimento dos grãos. Os nódulos formados pela estirpe CB 1809 apresentaram, em todas as coletas, os níveis mais baixos de evolução de  $H_2$ . Durante o período de enchimento dos grãos, não houve diferença estatisticamente significativa na evolução de  $H_2$  entre os nódulos formado pela estirpe CB 1809 ( $hup^+$ ) e os demais tratamentos (nódulos formados por estirpes  $hup^-$  ou com baixa capacidade de reciclagem de  $H_2$ ), no entanto a evolução de  $H_2$  para a estirpe CB 1809 foi muito menor do que para as plantas inoculadas com a outras estirpes. O alto coeficiente de variação dos dados de evolução de  $H_2$  (40%) pode explicar estes resultados (Tabela 5).

TABELA 5: Variação na atividade de redução de acetileno, evolução de  $H_2$  e eficiência relativa (ER) durante o ciclo reprodutivo da soja cv. DOKO, inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*<sup>1</sup>.

COLETAS	EVOLUÇÃO DE $H_2$ <sup>2,3</sup>						ER		
	I <sup>4</sup>	II	III	I	II	III	I	II	III
CB1809	62,01 Aab	15,82 Bc	28,59 Ba	4,42 Ac	0,58 Bb	0,16 Bc	0,93 a	0,96 a	0,99 a
DF383	66,36 Aa	20,10 Bbc	8,48 Bb	23,47 Ab	5,84 Bb	2,67 Bb	0,65 b	0,71 b	0,68 b
SEMIAS87	48,10 Ab	30,95 Bab	19,77 Bab	21,48 Ab	15,73 Aa	7,01 Ba	0,56 c	0,48 c	0,64 c
29W	72,02 Aa	40,61 Ba	10,00 Cb	46,39 Aa	21,61 Ba	5,26 Cab	0,36 d	0,47 d	0,45 d
CV (%)	23,50			16,37			11,37		

<sup>1</sup> Valores são médias de 3 repetições e aqueles seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05)

<sup>2</sup> amoles.g peso seco de nódulos<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>

<sup>3</sup> Análise de variância a partir de dados transformados em raiz de x+0,5.

<sup>4</sup> I=florescimento; II=formação das vagens; III=enchimento de grãos



A eficiência relativa (ER) de alocação de elétrons para a nitrogenase dos nódulos formados pela estirpe hup<sup>+</sup>, CB 1809, foi a mais alta na média de todas as coletas, apresentando valores entre 93 e 99%. Os menores valores de ER foram observados nos nódulos formados pela estirpe 29W. Não houve variação nos valores de ER durante o ciclo reprodutivo da planta, para todos os tratamentos (Tabela 5).

As duas conclusões principais deste experimento são: a) o período de maior atividade da nitrogenase foi o do florescimento e b) a evolução de H<sub>2</sub> e a ARA apresentaram padrões de variação semelhantes durante o ciclo reprodutivo, resultando num valor de ER constante.

#### 4.2 Experimento II:

Medida da razão C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> através da incubação com <sup>15</sup>N<sub>2</sub>.

Devido a grande variação na ER entre as estirpes em estudo (Tabela 5), foi necessário a obtenção do fator de conversão C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> para cada uma delas. Como estas simbioses apresentaram sincronia na evolução de H<sub>2</sub> e ARA durante o ciclo reprodutivo (ER constante, experimento I), este fator de conversão foi determinado em apenas uma coleta.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, durante a produção do gás <sup>15</sup>N<sub>2</sub> houve uma queda na A%<sup>15</sup>N<sub>exc.</sub> de 21,0% para 18,96%, correspondendo a uma queda de enriquecimento de

16%. Durante a transferência do gás enriquecido do reservatório para os vasos de incubação, a queda no enriquecimento foi menor, 9,26%, e durante a incubação das plantas a queda foi de 5,4; 0,7 e 0,5% para os vasos I, II e III, respectivamente, e de 13,5% para o vaso IV.

A variação natural de  $AZ^{15}N$  das plantas usadas como controle, ou seja, não incubadas em atmosfera enriquecida, encontra-se na Tabela 7, juntamente com o desvio padrão das análises para cada parte da planta.

Aos 30 DAE as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apresentaram o maior peso seco, ZN e N total na parte aérea e maior peso seco e N total da planta. As outras estirpes não diferiram entre si quanto ao peso seco e N total da planta, apresentando dados variáveis nos parâmetros de nódulos e parte aérea isoladamente. A incorporação do  $^{15}N$

TABELA 6: Porcentagem de  $^{15}N$  em excesso presentes na fase gasosa dos vasos no início e final do período de incubação de raízes noduladas de plantas intactas de soja.

AZ <sup>15</sup> Nexc.		
VASO	INICIAL	FINAL
I	17,99	17,02
II	17,35	17,21
III	17,20	17,10
IV	18,52	16,02

AZ<sup>15</sup>Nexc. no reservatório= 18,96

TABELA 7: Variação natural na  $AZ^{15}N$  presente nas plantas de soja usadas como controle, não expostas ao gás enriquecido.

	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	MÉDIA	s*
PARTE AÉREA	0,3690	0,3687	0,3688	0,3688	0,0004
RAÍZES	0,3751	0,3769	0,3747	0,3756	0,0028
NÓDULOS	0,3744	0,3736	0,3686	0,3722	0,0077

\* Desvio padrão da média a 95% de probabilidade

em todas as partes da planta durante o período de 1 hora foi maior para as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 apesar do alto coeficiente de variação de alguns destes dados (Tabela 8).

Os nódulos formados pela estirpe CB 1809 apresentaram a maior taxa de atividade específica de fixação de nitrogênio, medida por incubação em atmosfera enriquecida com  $^{15}N_2$ , mas os valores de ARA foram semelhantes aos das estirpes DF 383 e SEMIA 587. Não foi observada evolução de  $H_2$  nos nódulos formados por esta estirpe, conseqüentemente o valor da ER foi de 100%. Por outro lado, os nódulos formados pela estirpe 29W, em relação aos mesmos parâmetros, apresentaram menor eficiência. Os nódulos formados pelas estirpes DF 383 e SEMIA 587 tiveram um comportamento intermediário (Tabela 9).

Foi observada uma relação direta entre a atividade

TABELA 8: Efeito de estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* com diferentes capacidades de reciclar  $H_2$  no peso seco ( $mg.planta^{-1}$ ), %N, N total ( $mg N.planta^{-1}$  e  $\mu moles N.planta^{-1}$ ) e na incorporação de  $^{15}N_2$  em soja cv. DOKO aos 30 dias após a emergência<sup>1</sup>.

	PESO SECO (mg)	%N	N TOTAL mg N ( $\mu moles N$ )		AZ $^{15}N$ exc amostra <sup>2</sup>	N FIXADO <sup>3</sup> $\mu moles N.h^{-1}$
<b>Nódulos</b>						
CB 1809	161	5,09 a	8,18 a (292)		0,1048	1,7262 a
DF 383	125	4,58 c	5,68 b (203)		0,0792	0,8857 b
SEMIA 587	140	4,78 bc	6,70 ab(239)		0,0567	0,7211 b
29W	156	4,86 ab	7,58 a (264)		0,0512	0,7031 b
CV (%)	14,54	3,33	15,34	15,58	35,13	44,03
<b>Parte aérea</b>						
CB 1809	1329 a	2,89 a	38,44 a (1373a)		0,0268 a	1,9811 a
DF 383	1116 b	1,68 c	18,76 c (670c)		0,0277 a	1,0070 b
SEMIA 587	1089 b	2,25 b	24,56 b (877b)		0,0228 a	1,0804 b
29W	1016 b	2,10 b	21,97 bc(784bc)		0,0118 b	0,4911 b
CV (%)	9,46	9,40	9,51	9,52	28,50	32,04
<b>Raízes</b>						
CB 1809	380	1,31	4,90 (175)		0,0248 a	0,2241 a
DF 383	350	1,20	4,23 (151)		0,0203 ab	0,1654 ab
SEMIA 587	336	1,28	4,21 (150)		0,0135 bc	0,1125 bc
29W	304	1,43	4,32 (154)		0,0070 c	0,0623 c
CV (%)	12,47	15,38	10,33	10,07	37,94	31,89
<b>Planta inteira</b>						
CB 1809	1869 a	---	51,53 a (1840a)		0,0512	3,9324 a
DF 383	1592 b	---	28,67 c (1024c)		0,0368	2,0580 b
SEMIA 587	1565 b	---	35,48 b (1267b)		0,0280	1,9141 b
29W	1475 b	---	33,87 bc(1203bc)		0,0264	1,2565 b
CV (%)	8,55	---	9,03	9,01	46,02	29,87

<sup>1</sup> Valores são médias de 4 repetições e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).

<sup>2</sup> Calculado para cada parte da planta pela fórmula  
 $AZ^{15}N \text{ excesso amostra} = AZ^{15}N \text{ amostra} - AZ^{15}N \text{ controle}$

<sup>3</sup> Calculado considerando-se que os tempos de incubação e  $AZ^{15}N$  excesso na atmosfera dos vasos foi: 63 min. e 17,15% (vaso 1); 65 min. e 16,92% (vaso 2); 63 min. e 16,79% (vaso 3) e 70 min. e 16,91% (vaso 4). Cada vaso representa 1 bloco.

TABELA 9: Atividade da nitrogenase avaliada pela atividade de redução de acetileno e pela incubação de raízes noduladas de plantas intactas em  $^{15}\text{N}_2$ , evolução de  $\text{H}_2$ , eficiência relativa (ER), razão  $\text{CaH}_4:\text{N}_2$  e razão  $\text{CaH}_4/(3\text{N}_2+\text{H}_2)$  em soja cv. DOKO inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* com diferentes capacidades de reciclar  $\text{H}_2$ . Avaliação aos 30 DAE<sup>1</sup>.

ESTIRPE DE <i>Bradyrhizobium</i>	$\text{CaH}_4$ umoles.g peso seco de nódulos <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	$\text{N}_2$	$\text{H}_2$	ER	$\text{CaH}_4:\text{N}_2$	$\text{CaH}_4/(3\text{N}_2+\text{H}_2)$
CB 1809	66,09 a	24,38 a	0	100	2,83 a	0,94 b
DF 383	59,82 a	16,37 b	18,76 a	69,15 b	3,66 ab	1,05 ab
SEMIA 587	53,47 ab	14,01 bc	21,53 a	59,61 c	4,03 b	1,34 a
29W	37,20 b	8,26 c	17,79 a	51,27 d	4,69 b	0,87 b
CV	19,22%	23,53%	24,87%	6,63%	18,62%	17,62%

<sup>1</sup> Valores são médias de 4 repetições e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste Duncan (P=0,05)

<sup>2</sup> Foi calculado o N fixado separadamente nas raízes, nódulos e parte aérea, após a exposição de raízes noduladas a  $^{15}\text{N}_2$  durante o período de 1 hora, e o valor total foi dividido pelo peso seco dos nódulos.

específica de fixação de nitrogênio medida pelo enriquecimento das plantas em atmosfera contendo  $^{15}\text{N}_2$  e a ARA específica ( $r^2=0,56^{**}$ , para 16 pares de dados).

O fator de conversão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  calculado para a atividade da nitrogenase a partir dos dados de  $^{15}\text{N}$  incorporado e ARA, foi de 2,83 para a estirpe hup<sup>+</sup> CB 1809, próximo ao valor teórico de 3. A estirpe 29W conforme esperado pelos dados obtidos de evolução de  $\text{H}_2$  foi a que apresentou o maior fator de conversão, juntamente com a estirpe SEMIA 587 (Tabela 9). O balanço eletrônico ( $\text{C}_2\text{H}_4/(\text{3N}_2+\text{H}_2)$ ) calculado para as estirpes CB 1809, DF 383 e 29W apresentou valores próximos do valor teórico 1. Para a estirpe SEMIA 587, este valor foi significativamente maior, indicando que neste caso está ocorrendo uma superestimativa da fixação de nitrogênio quando avaliada pelo método de redução de acetileno (Tabela 9).

#### 4.3 Experimento III:

Variação do custo energético de atividade da nitrogenase e de crescimento e manutenção de raízes e nódulos durante o estágio reprodutivo da soja.

Os valores de ARA e de evolução de  $\text{CO}_2$ , medidos nas raízes noduladas de plantas intactas no sistema de fluxo contínuo de gases, aumentaram significativamente entre o florescimento e o período inicial de formação das vagens

(Figura 9). Durante este período foi registrado também aumento significativo no peso seco de nódulos, raízes e parte aérea. Os maiores valores de peso seco de parte aérea e nódulos foram verificados no período de enchimento de grãos, no entanto nesta coleta foi observado grande número de nódulos em estágio de senescência (Tabela 10) e um decréscimo significativo nos valores de ARA e evolução de  $\text{CO}_2$  (Figura 9). As médias dos valores de ARA e evolução de  $\text{CO}_2$  para todos os tratamentos apresentaram o mesmo padrão de variação durante o ciclo reprodutivo da planta.

O custo energético da atividade da nitrogenase, expresso em  $\mu\text{moles CO}_2 \text{ evoluído} \cdot \mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \text{ reduzido}^{-1}$ , foi calculado através das retas de regressão entre a atividade da nitrogenase e a evolução de  $\text{CO}_2$  (Minchin et al., 1983a). Os dados de atividade da nitrogenase e a evolução de  $\text{CO}_2$  das raízes noduladas expostas a  $p\text{O}_2$  decrescentes (0,2 até  $\pm$  0,1 atm) apresentaram-se linearmente correlacionados. Os valores dos coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre os dados foram altamente significativos ( $P=0,01$ ) para os períodos de florescimento (60 DAE) e início de formação das vagens (75 DAE) (Tabela 11). No período de enchimento de grãos (110 DAE), muitas plantas não apresentaram correlação entre os dois parâmetros, não sendo possível calcular os valores de custo energético nesta fase.

Durante o florescimento foram observados os menores valores de custo energético para todas as estirpes (Figura

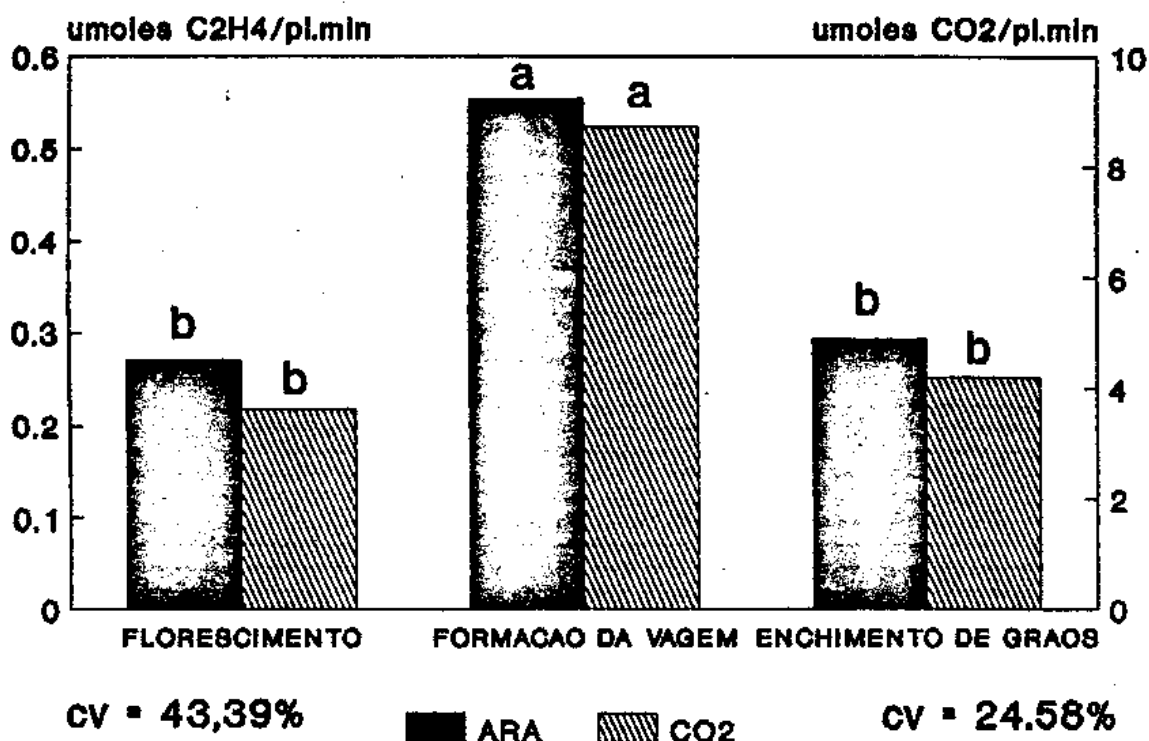


FIGURA 9: Variação na ARA e evolução de CO<sub>2</sub> durante o ciclo reprodutivo de soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809, 29W, DF 383 e SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Valores representam a média de todas as estirpes (12 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).

TABELA 10: Peso seco de nódulos e parte aérea durante o estágio reprodutivo de soja cv DOKO inoculada com diferentes estirpes CB 1809, 29W, DF 383 e SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*.

ÉPOCA DE COLETA	PARTE AÉREA	NÓDULOS
	g/PLANTA <sup>1</sup>	
FLORESCIMENTO	7,02 c	0,75 c
FORMAÇÃO DAS VAGENS	21,13 b	1,62 b
ENCHIMENTO DE GRÃOS	25,07 a	1,91 a
CV	16,65%	18,59%

<sup>1</sup> Valores são médias de todas as estirpes (12 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (P=0,05).



TABELA 11: Valores do coeficiente da regressão - b (custo de atividade da nitrogenasé), do intercepto do eixo y - a (custo de manutenção) e dos coeficientes de determinação -  $r^2$  das retas que definem a relação entre a redução de acetileno e respiração em raízes noduladas de soja cv DOKO, submetidas a  $pO_2$  decrescentes em um sistema de fluxo contínuo de gases. Plantas inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, avaliadas durante o ciclo reprodutivo da planta.

ESTIRPES	ESTÁGIO FENOLÓGICO <sup>1</sup>						
	FLORESCIMENTO		INÍCIO DE FORMAÇÃO DAS VAGENS			ENCHIMENTO DE GRÃOS <sup>2</sup>	
	$r^2$	b	a	$r^2$	b	a	$r^2$
CB 1809	0,9088**	3,6	1,9	0,9842**	8,3	1,5	0,9001**
	0,9856**	2,7	1,8	0,9902**	5,2	1,3	0,4645 <sup>NB</sup>
	0,9863**	2,4	2,0	0,9861**	5,3	1,6	0,8796**
DF 383	0,9938**	3,1	2,0	0,9847**	8,0	1,6	0,9926**
	0,9881**	3,0	1,6	0,9729**	16,9	1,3	0,8757**
	0,9046**	4,3	3,3	0,9436**	14,3	1,5	0,2836 <sup>NB</sup>
SEMIA 587	0,9742**	3,1	2,0	0,8798**	6,9	1,4	0,9099**
	0,8500**	2,5	2,1	0,8750**	8,8	2,2	0,4130 <sup>NB</sup>
	0,9761**	2,7	1,8	0,9410**	9,1	1,3	0,9113**
29W	0,9432**	2,9	2,1	0,9823**	6,4	0,7	0,0491 <sup>NB</sup>
	0,9710**	2,9	2,0	0,9764**	6,5	1,7	0,7771**
	0,9550**	3,0	1,9	0,9506**	9,7	1,9	0,3193 <sup>NB</sup>

\*\* Valores significativos a  $P=0,01$ .

<sup>NB</sup> Valores não significativos estatisticamente.

<sup>1</sup> Valores representam dados obtidos para cada uma das plantas analisadas em cada período.

<sup>2</sup> Não foram incluídos os valores de a e b devido a grande variabilidade no comportamento das plantas neste período.

10). Entre as estirpes, este valor apresentou-se significativamente maior ( $P=0,05$ ) na média das coletas, para a estirpe DF 383 (Figura 11).

A respiração acoplada a atividade da nitrogenase, expressa como uma proporção da respiração líquida do sistema radicular foi significativamente maior durante a formação das vagens do que no florescimento (Tabela 12), porém o custo total e específico de manutenção de raízes e nódulos foi significativamente menor ( $P=0,05$ ), para todas as estirpes, durante o período de formação das vagens (Figura 12).

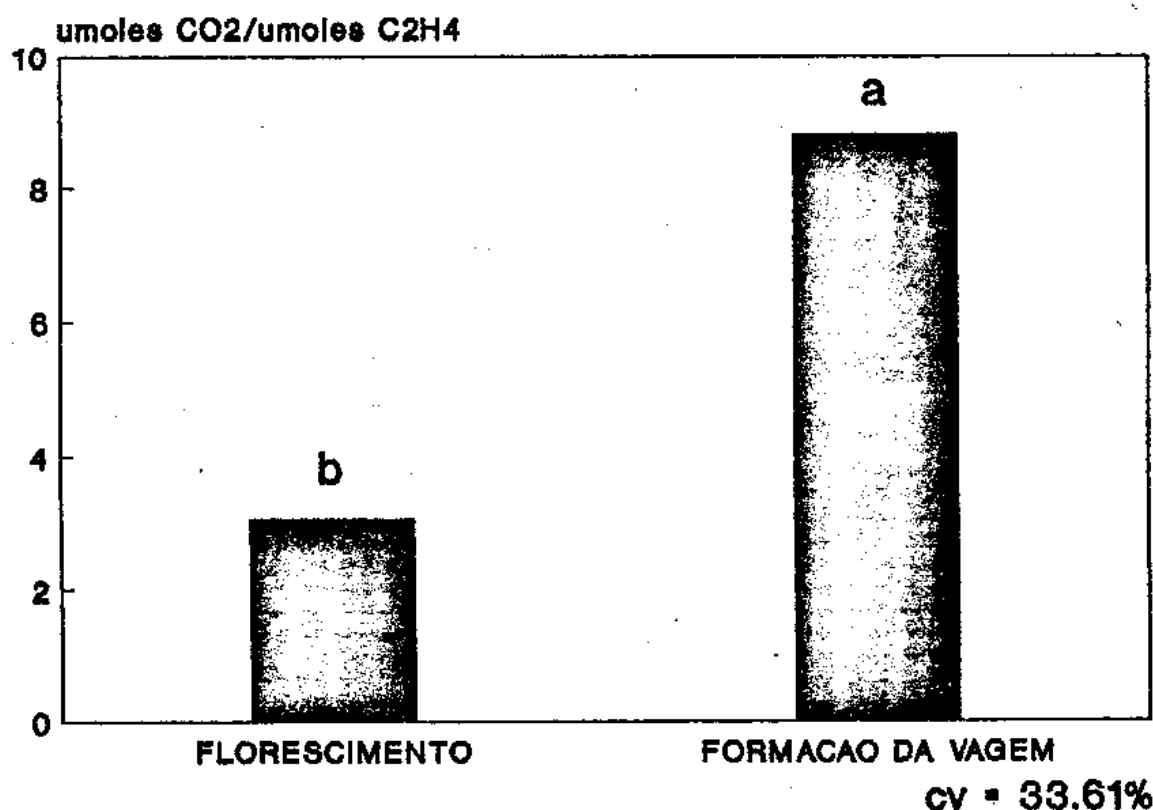


FIGURA 10: Variação no custo energético da atividade da nitrogenase durante o ciclo reprodutivo da soja cv. Doko, inoculada com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (coeficiente  $b$  da regressão entre ARA e CO<sub>2</sub>). Valores representam a média das estirpes e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ( $P=0,05$ ).

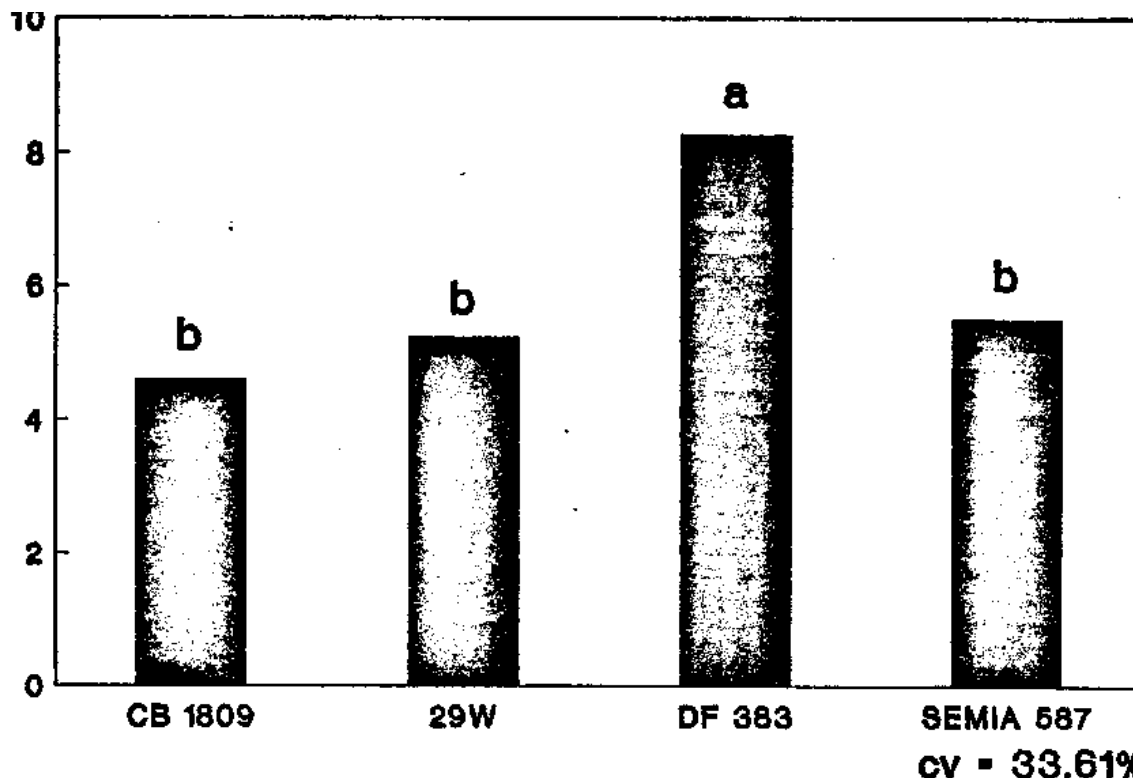


FIGURA 11: Efeito da estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* no custo energético da atividade da nitrogenase em soja cv. Doko (valor b da regressão entre ARA e  $CO_2$ ). Valores representam a média de 2 coletas (florescimento e formação das vagens, 6 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ( $P=0,05$ ).

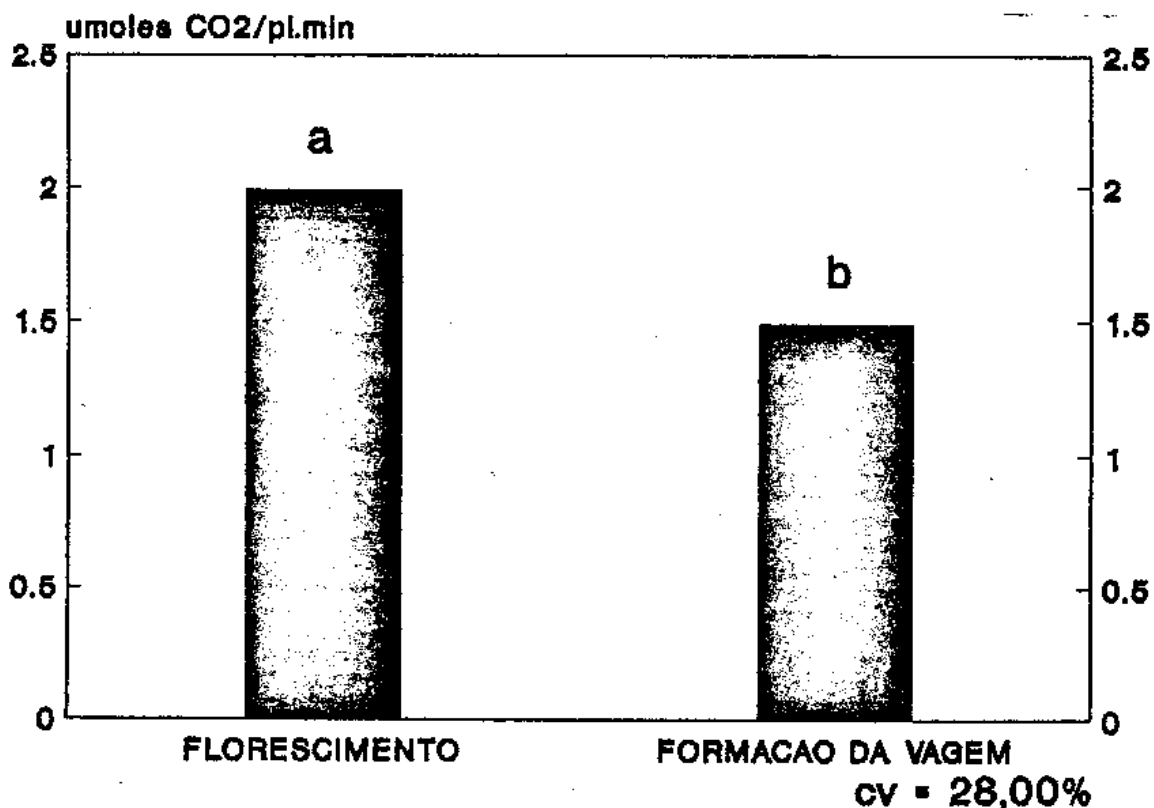


FIGURA 12: Variação no custo energético total de manutenção de raízes e nódulos, durante o ciclo reprodutivo da soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809, 29W, DF 383 e SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* (valor a da regressão entre ARA e  $CO_2$ ). Valores representam a média das estirpes (9 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan ( $P=0,05$ ).

TABELA 12: Variação na percentagem da respiração das raízes acoplada a atividade da nitrogenase durante o estágio reprodutivo de soja cv DOKO inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes CB 1809, DF 383, SEMIA 587 e 29W<sup>1</sup>.

ÉPOCA DA COLETA	% RESPIRAÇÃO <sup>2</sup>
FLORESCIMENTO	51,14 b
FORMAÇÃO DAS VAGENS	81,90 a
CV	21,39%

<sup>1</sup> Valores representam médias de todas as estirpes (12 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Duncan (P=0,05).

<sup>2</sup> Dados calculados subtraindo-se o custo energético de manutenção do valor da respiração das raízes noduladas antes da exposição destas a pO<sub>2</sub> decrescentes.

#### 4.4 Experimento IV:

Variação diurna do custo energético de atividade da nitrogenase e de crescimento e manutenção de raízes e nódulos.

Os dados de evolução de CO<sub>2</sub> apresentaram variação diurna significativa (P=0,05) para a média das estirpes. No horário de 12:00 hs houve maior evolução de CO<sub>2</sub> e os valores mais baixos foram observados as 24:00 hs (Figura 13). A variação diurna não foi significativa (P=0,05) nos níveis de atividade da nitrogenase medida pela ARA no sistema de fluxo contínuo de gases, embora os valores de ARA tenham se

mostrado mais elevados na coleta das 12:00 hs, decrescido até a coleta das 24:00 hs e apresenta, nova recuperação as 6:00 hs.

Foi observada correlação entre os valores de ARA e evolução de  $\text{CO}_2$  para os níveis decrescente de  $\text{pO}_2$ . As correlações obtidas foram altamente significativas para todos os horários de coleta (Tabela 13).

TABELA 13: Coeficientes de determinação ( $r^2$ ) entre as taxas de evolução de  $\text{CO}_2$  e ARA em raízes noduladas de soja cv DOKO submetidas a  $\text{pO}_2$  decrescentes em um sistema de fluxo contínuo de gases. Plantas inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes CB 1809 e 29W, avaliadas durante um ciclo diurno. Valores representam os coeficientes obtidos para cada um dos vasos analisados.

ESTIRPES	Nº DA PLANTA	HORÁRIO			
		6:00	12:00	18:00	24:00
CB 1809	1	0,9690**	0,8975**	0,9828**	0,9778**
	2	0,9329**	0,8948**	0,9926**	0,8686**
	3	0,9807**	0,9778**	0,9669**	0,9281**
29W	1	0,9073**	0,9795**	0,9901**	0,9250**
	2	0,9061**	0,9458**	0,9486**	0,9841**
	3	0,9061**	0,9616**	0,9858**	0,8957**

\*\* Valores significativos a  $P=0,01$

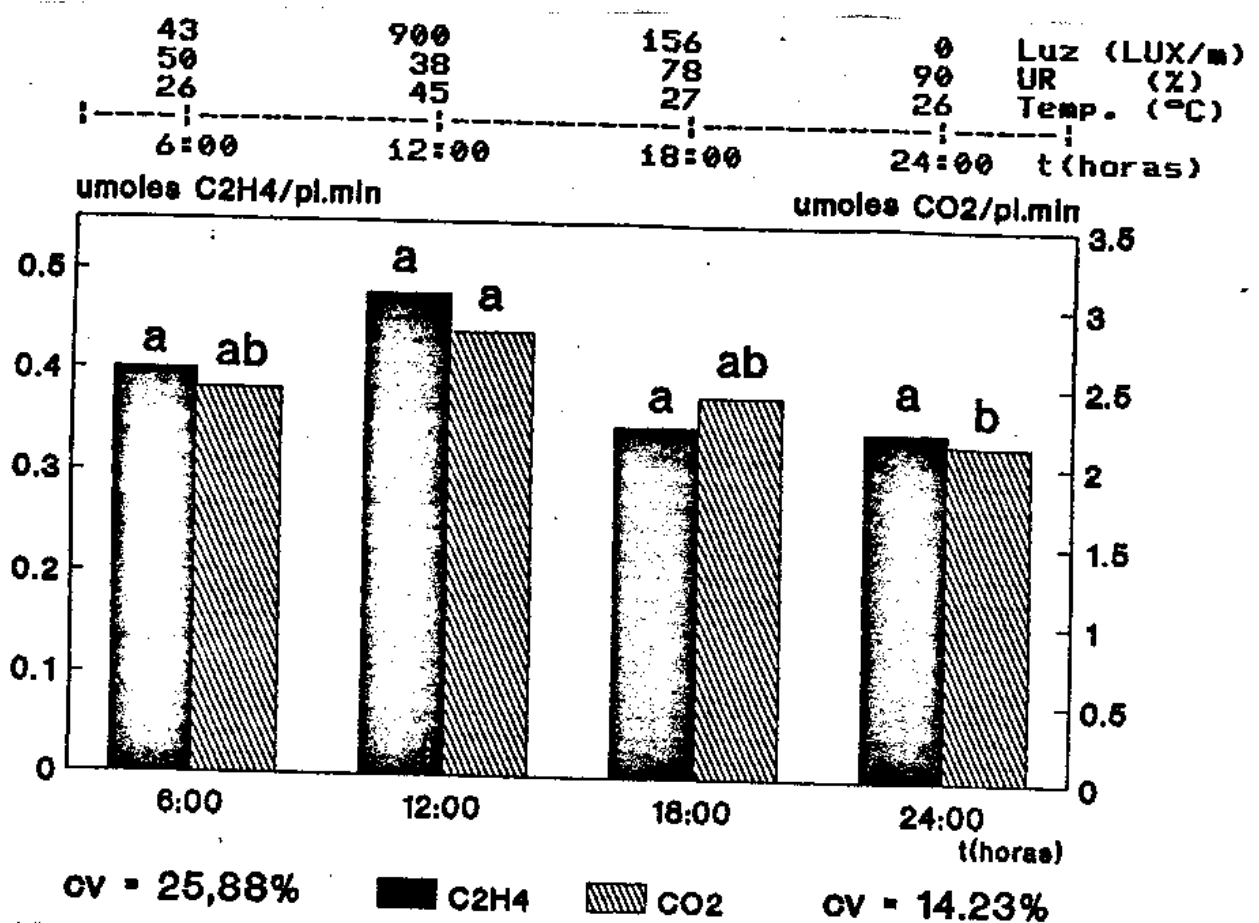


FIGURA 13: Variação diurna na ARA e evolução de CO<sub>2</sub> medida no sistema de fluxo contínuo de gases em soja cv. Doko inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, estirpes CB 1809 e 29W. Valores representam a média das estirpes e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).

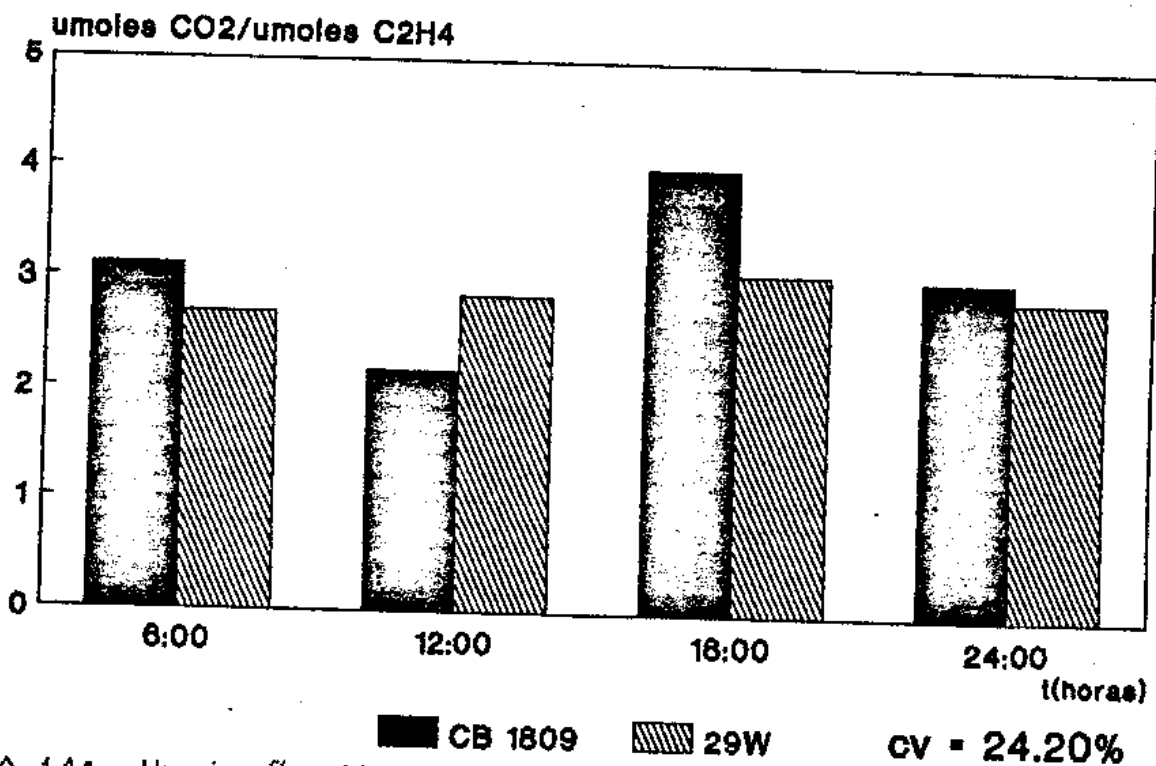


FIGURA 14: Variação diurna no custo energético da atividade da nitrogenase em soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W de *Bradyrhizobium japonicum* (valor b da regressão entre ARA e CO<sub>2</sub>). Valores representam a média de 3 repetições e não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).

Os valores de custo energético de atividade da nitrogenase não diferiram estatisticamente durante o período diurno, não havendo também diferenças significativas entre as estirpes ( $P=0,05$ ) (Figura 14). No entanto, os valores de custo calculadas para as plantas inoculadas com a estirpe CB 1809 foram superiores aos da estirpe 29W, exceto para a coleta das 12:00 hs, período onde também se verificaram os valores mais altos de atividade da nitrogenase e evolução de  $CO_2$ .

Apesar das temperaturas dos vasos nos experimentos III e IV serem diferentes, os valores de custo energético deste experimento estão dentro da mesma faixa dos obtidos no experimento III, analisado no mesmo estágio fenológico da planta.

As plantas inoculadas com a estirpe 29W não apresentaram variação diurna significativa no custo respiratório de manutenção e crescimento de raízes e nódulos (Figura 15). Na coleta das 12:00 hs o tratamento com a estirpe CB 1809 apresentou o maior valor de custo energético de manutenção e crescimento, sendo que esta foi a única coleta em que este tratamento apresentou valores superiores aos do tratamento com a estirpe 29W.

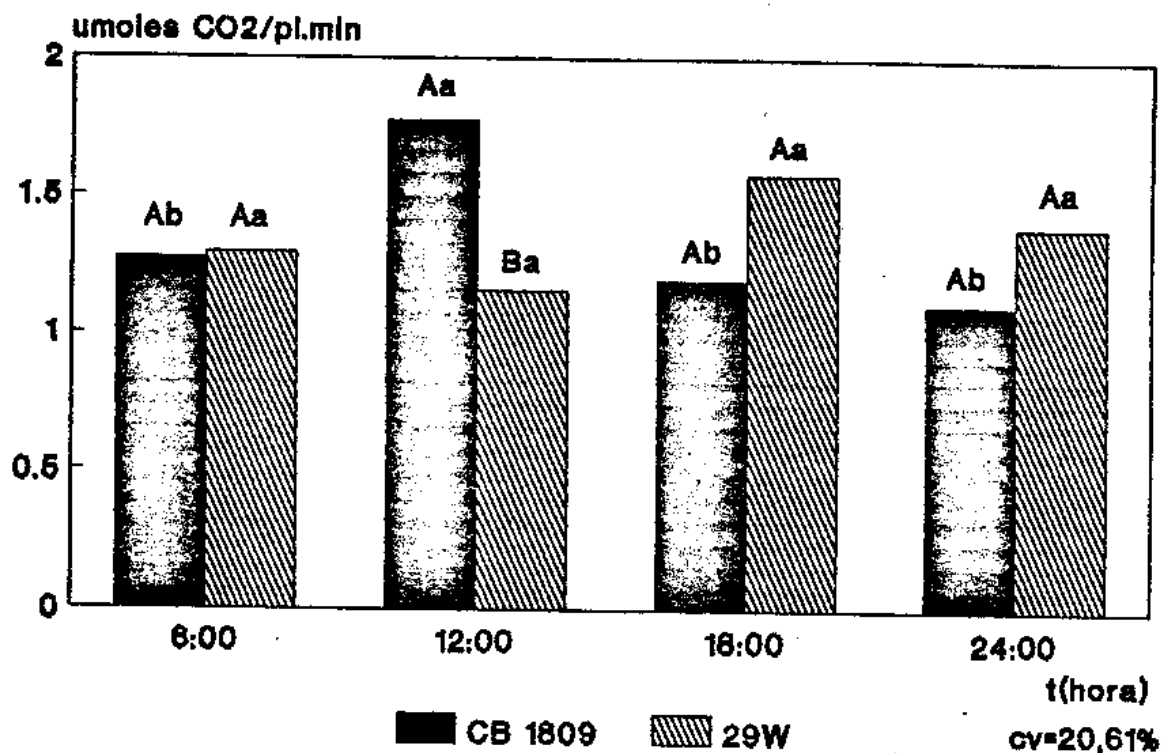


FIGURA 15: Variação diurna no custo energético total de manutenção de raízes e nódulos em soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W de *Bradyrhizobium japonicum* (coeficiente a da regressão entre ARA e CO<sub>2</sub>). Valores representam médias de 3 repetições e aqueles seguidos pela mesma letra maiúscula dentro da coleta e minúscula dentro da estirpe não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).



## 5 DISCUSSÃO

5.1 Variação nas atividades da nitrogenase, evolução de  $H_2$  e  $CO_2$  e eficiência relativa durante o ciclo reprodutivo da planta.

O perfil mais comum de variação sazonal na atividade da nitrogenase em soja mostra um aumento na atividade durante o período vegetativo, às vezes estendendo-se até o início do ciclo reprodutivo seguido por um declínio que coincide com o período médio de enchimento dos grãos (Minchin et al., 1981). Este declínio, atribuído inicialmente a uma menor disponibilidade de fotossintatos para os nódulos, devido a competição com as vagens (Lawn & Brun, 1974; Bethlenfalvay & Phillips, 1977b e Herridge & Pate, 1977) tem sido atualmente associado a fatores ligados às estruturas reprodutivas que, segundo Peat et al. (1981), estimulariam a

fixação de  $N_2$  durante a primeira fase do ciclo reprodutivo, passando a competir pelos fotossintatos durante a fase de crescimento rápido das vagens, resultando em declínio na fixação de  $N_2$ . Este decréscimo na atividade de fixação de nitrogênio nas fases finais de desenvolvimento da planta tem sido atualmente discutido também em termos da atuação da barreira à difusão de  $O_2$  presente nos nódulos das leguminosas. Segundo Minchin et al. (1988) a eficácia com a qual o  $O_2$  pode ser balanceado em função da disponibilidade de substratos de carbono poderá: a) limitar a fixação de nitrogênio; b) promover o balanço adequado para as necessidades respiratórias do nódulo ou c) danificar a nitrogenase. Existem poucos estudos sobre a atuação desta barreira a medida que o nódulo e a planta atingem estágios mais avançados de desenvolvimento (Minchin et al., 1983a; Rosendahl & Jakobsen, 1988). Rosendahl & Jakobsen (1988) mostraram que há uma tendência a uma melhor tolerância ao  $O_2$  em raízes noduladas de plantas mais jovens. Com o envelhecimento do nódulo, pode ocorrer uma diminuição na capacidade de ajuste desta barreira às necessidades de  $O_2$  do nódulo, provocando a senescência do tecido nodular.

Comparações entre os resultados dos experimentos I e III quanto ao padrão de variação da atividade da nitrogenase devem levar em conta que as plantas foram crescidas e a atividade da nitrogenase avaliada em condições diferentes, especialmente de temperatura e que as medições de

ARA do experimento III foram obtidas em plantas intactas num sistema de fluxo contínuo de gases, enquanto que o experimento I foi avaliado em raízes destacadas, incubadas num sistema fechado. Uma vez que a atividade da nitrogenase sofre um declínio substancial com a remoção da parte aérea e agitação das raízes (Minchin et al., 1986b); que este declínio parece estar relacionado a atuação da barreira a difusão de  $O_2$  dentro do nódulo (Sheehy et al., 1983); e que a atuação desta barreira varia com a idade da planta (Minchin et al., 1983a e Rosendahl & Jakobsen, 1988), não é possível fazer comparações entre os dados obtidos nos dois experimentos quanto ao padrão de variação na atividade da nitrogenase.

Sendo a evolução de  $H_2$  uma reação obrigatória durante o processo de redução do  $N_2$  (Evans et al., 1987) e não havendo uma hidrogenase ativa, aumentos na taxa de fixação devem corresponder a aumentos na evolução de  $H_2$ . Assim a evolução de  $H_2$  pelos nódulos, avaliada no experimento I durante o ciclo reprodutivo da soja, seguiu a variação da atividade da nitrogenase apresentando taxas mais elevadas durante o florescimento, exceto para a estirpe CB 1809 que evoluiu muito pouco  $H_2$ . Hungria (1985) observou este padrão de variação na evolução de  $H_2$  em nódulos de feijoeiro embora haja relatos de que o pico de evolução de  $H_2$  possa preceder o pico de atividade da nitrogenase (Bethlenfalvay & Phillips, 1977b) resultando num aumento da eficiência relativa de

atividade da nitrogenase durante o estágio reprodutivo da planta. No entanto, em ervilha, a eficiência da nitrogenase permanece constante durante o período vegetativo e decresce durante o período reprodutivo (Bethlenfalvay & Phillips, 1979). Hungria (1985) também verificou decréscimo na ER após o florescimento embora neste trabalho, um grande número de coletas tenha sido realizado após o florescimento, permitindo observar que, do florescimento (35 DAE) até o final do ciclo da planta (77 DAE), há uma considerável variação nos valores ER. No entanto aos 77 DAE, o valor de ER é praticamente igual ao observado no florescimento e em algumas coletas intermediárias, os valores se aproximam. No presente experimento não foi verificada variação significativa na ER durante o ciclo reprodutivo da planta, confirmando os resultados obtidos por Schubert et al. (1977) para soja.

## 5.2 Fator de conversão $C_2H_2:N_2$

O valor teórico da conversão da ARA para atividade de fixação de nitrogênio, considerando-se a evolução de  $H_2$  e baseado no número de elétrons necessários para cada reação, é de 4:1, pois nas concentrações utilizadas comumente nos testes de ARA, este gás inibe quase totalmente a produção de  $H_2$ . Nestas condições, assume-se que o fluxo total de elétrons pela nitrogenase é direcionado a redução de  $C_2H_2$  a  $C_2H_4$  (Burris, 1974). Valores abaixo da proporção teórica tem sido

relatados como consequência da atuação da hidrogenase (Montange et al., 1981), mas devido a baixa ER da maioria das estirpes de *Rhizobium*, os valores mais comuns são próximos de 4:1 ou mesmo maiores (Burris, 1974; Saito et al., 1980; Hudd et al., 1980; Skot, 1983; Hopmans et al., 1983a,b; Sellstedt, 1986). A grande variação observada nos valores da razão  $C_2H_2:N_2$  são atribuídas à ineficiência da bactéria em fixar  $N_2$ , devido a evolução de  $H_2$ , ou às condições ambientais prevalentes em cada experimento (Bergersen, 1970).

A calibração do teste de redução de  $C_2H_2$  tem sido feita usualmente pela exposição de nódulos destacados a  $N_2$  enriquecido com  $^{15}N$  por períodos curtos de tempo (Hudd et al., 1980; Skot, 1983). Sabendo-se que ocorre uma queda significativa na atividade da nitrogenase após o destacamento dos nódulos ou remoção da parte aérea (Van Straten & Schimdt, 1974; Ralston & Imsande, 1982; Minchin et al., 1986b), esta calibração foi feita pela exposição de plantas intactas a  $^{15}N_2$ .

No entanto, devido ao fato de que cada pote utilizado para exposição das raízes noduladas ao gás enriquecido continha uma planta de cada tratamento, não foi possível fazer a incubação das plantas sob  $C_2H_2$  no mesmo sistema. Sendo assim, a ARA foi medida através do destacamento da parte aérea e incubação das raízes noduladas em sistema fechado. O tempo de incubação foi de apenas 5 min. de modo a reduzir os efeitos detectados por Minchin et al.

(1986b). Além disso, observou-se posteriormente que a exposição destas simbioses ao  $C_2H_2$  no sistema de fluxo contínuo de gases não provoca diminuição significativa nas taxas de atividade da nitrogenase durante os primeiros 20 min. de tratamento.

A utilização do gás  $^{15}N_2$  para este tipo de estudo exigiu o desenvolvimento de sistemas especiais para produção do gás e incubação das plantas, adaptados as disponibilidades do laboratório e que evitassem a perda do gás marcado por contaminação com  $N_2$  atmosférico. Embora o sistema tenha apresentado perdas na percentagem de átomos de  $^{15}N$  em excesso, foi possível obter o enriquecimento das plantas durante o período de exposição ao gás. Durante o período de incubação das plantas porém, as perdas de  $^{15}N_2$  foram bem menores (Tabela 6). O equipamento utilizado, feito a partir de material mais simples e de mais fácil acesso do que os comumente usados em experimentos deste tipo, abre maiores possibilidades de utilização desta metodologia. O coeficiente de variação dos dados de fixação de  $^{15}N_2$ , embora um pouco mais elevados do que os observados para as medições de ARA (Tabela 9), encontram-se dentro da média relatada em outros trabalhos (Roughley & Dart, 1969; Bergensen, 1970 e Saito et al., 1980). A maior variabilidade dos dados nas medidas de  $^{15}N$  incorporado não é uma característica comum deste tipo de metodologia, no entanto as perdas observadas no sistema de incubação podem ter sido responsáveis por estes resultados.

As estirpes utilizadas para avaliação do custo energético de atividade da nitrogenase nos experimentos III e IV apresentaram grande variação entre si na evolução de  $H_2$  e ER (Tabelas 5 e 9) e em experimentos anteriores mostraram diferentes capacidades de reciclar  $H_2$  (Silva, 1989), o que ficou evidenciado pelos valores da relação  $C_2H_2:N_2$  obtidos para estas simbioses (Tabela 9). Estes valores estão na faixa de 2,8 para a estirpe CB 1809, a 4,7 para a estirpe 29W. O menor valor para a estirpe CB 1809 é esperado em função da evolução de  $H_2$  nula (ER de 100%) para esta estirpe. As outras estirpes apresentaram maior evolução de  $H_2$  e conseqüentemente menores valores de ER. A ordem das estirpes quanto a ER nos experimentos I e II é a mesma e, conforme esperado, há uma relação inversa entre a ER e a relação  $C_2H_2:N_2$ .

Após a correção para a evolução de  $H_2$ , o balanço eletrônico  $C_2H_4/(3N_2+H_2)$  (Peters et al., 1977) deveria ser próximo a 1, assumindo-se que 1 mol de pares de elétrons é consumido na redução de 1 mol de  $C_2H_2$ , enquanto que 3 moles são usados para reduzir 1 mol de  $N_2$  a  $2NH_3$ . Para a estirpe SEMIA 587 observa-se que houve uma superestimativa da ARA de 34%. Valores superestimados para esta razão foram também observados por Saito et al. (1980) em raízes noduladas de feijoeiro e por Drevon et al. (1982) em nódulos de soja. Esta variação inclui erros experimentais relacionados a análise de N total (Kjeldahl) da ordem de 5% para os valores de N fixado (Saito et al., 1980). Além disso, neste caso pode estar

ocorrendo uma taxa de redução de  $C_2H_2$  maior do que a de redução de  $N_2$ , uma vez que os dois substratos tem Km diferentes em relação a nitrogenase (Bergensen, 1970, Rivera-Ortiz & Burris, 1975). Por outro lado, valores menores que 1, embora muito próximos, para este balanço como ocorreu para as estirpes CB 1809 e 29W indicam uma subestimativa do N fixado, o que pode ser confirmado fazendo-se uma estimativa do N fixado a partir das taxas de ARA e evolução de  $H_2$ , utilizando-se a seguinte fórmula (Rainbird et al., 1983a):

$$N\text{-fixado} = \frac{C_2H_2 - H_2 \text{ evoluído no ar}}{3}$$

Esta estimativa aplicada aos dados da estirpe 29W (HUP<sup>-</sup>) fornece um valor de 6,47 umoles de  $N_2$ .g peso seco de nódulos<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, inferior ao valor de 8,26 umoles de  $N_2$ .g.peso seco de nódulos<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> medido pela incubação em atmosfera contendo <sup>15</sup>N<sub>2</sub>.

Concluindo, vale ressaltar que muitos fatores ambientais podem afetar a evolução líquida de  $H_2$ , devido tanto a mudanças na alocação de elétrons para a nitrogenase como a variações na atividade da hidrogenase. Sem considerar os fatores intrínsecos da simbiose (razão ATP=ADP, disponibilidade de carbono, etc.) o principal fator ambiental que afeta a alocação de elétrons para a nitrogenase é a temperatura (Neves & Hungria, 1987). Considerando-se que a



temperatura foi mantida a 33°C durante os experimentos II e III e que os nódulos formados pela estirpes utilizadas não apresentaram variação ontogenética na alocação de elétrons para a nitrogenase, pode-se tentativamente utilizar uma medição da razão  $C_2H_2:N_2$ , realizada durante um período de desenvolvimento da planta, para obtenção do custo energético de fixação de nitrogênio a partir de dados de ARA obtidos durante o ciclo reprodutivo da planta (experimento III).

### 5.3. Custo energético de atividade da nitrogenase.

Em 1981, Minchin *et al.* escreveram que obtenção do valor correto para o uso de carboidratos "in vivo" na fixação de nitrogênio nos nódulos necessitaria de mais medições e mesmo de um enfoque mais crítico do que o adotado até aquele momento. Desde então, as técnicas experimentais para medição da demanda energética envolvida na fixação biológica de  $N_2$  desenvolveram-se consideravelmente, especialmente envolvendo avaliações de custo respiratório em plantas noduladas intactas (Warembourg *et al.*, 1982; Witty *et al.*, 1983; Rainbird *et al.*, 1984; Ryle *et al.*, 1984).

Os pré-requisitos de uma metodologia para avaliação adequada do custo energético da fixação de nitrogênio são: a) a avaliação do custo energético deve ser feita em um período curto de tempo uma vez que a taxa de fixação de nitrogênio, a evolução de  $H_2$  e a atividade das carboxilases são

influenciadas por fatores ambientais; b) a metodologia deve permitir a separação dos diferentes componentes da atividade respiratória:  $\text{CO}_2$  produzido para atividade de crescimento e manutenção de raízes e nódulos e  $\text{CO}_2$  produzido nas atividades de redução e assimilação do nitrogênio; c) a medição da atividade respiratória deve ser acoplada com a medição do nitrogênio fixado no mesmo período e d) a integridade das plantas e as condições ambientais devem ser mantidas de modo a permitir a extrapolação dos resultados para condições de campo (Warembourg & Roumet, 1989). A estes pré-requisitos podem ainda ser acrescentados: e) a metodologia deve ser de manuseio simples o suficiente para permitir a obtenção de dados comparativos entre diferentes tratamentos e f) o equipamento necessário deve ser o mais simples e econômico possível de modo a permitir o uso generalizado da metodologia.

A metodologia utilizada neste trabalho, baseada na descrição de Witty et al. (1983), preenche de maneira satisfatória os requisitos acima. Através de curvas de regressão entre a atividade da nitrogenase e a evolução de  $\text{CO}_2$  de raízes noduladas intactas, permite a separação dos dados relativos ao gasto de  $\text{CO}_2$  para crescimento e manutenção de raízes e nódulos dos relativos a atividade da nitrogenase. Isto é importante para a avaliação comparativa do gasto energético envolvido na fixação de nitrogênio entre diferentes simbioses, uma vez que algumas estirpes induzem a

formação de maior massa nodular, não necessariamente envolvida em maior atividade de fixação de nitrogênio. Por outro lado, algumas espécies produzem raízes mais abundantes ou mesmo raízes tuberosas, como por exemplo *Lupinus* sp, que exigem maior gasto respiratório devido ao componente de crescimento e manutenção de raízes (Atkins et al., 1978). Os diferentes componentes do custo energético podem ainda apresentar um padrão de variação distinto de acordo com a fenologia da planta e o desenvolvimento nodular, conforme ocorreu no experimento III, onde o período de maior gasto energético para crescimento e manutenção de raízes e nódulos foi observado durante a floração (Figura 12), época de maior eficiência do sistema nitrogenase. Uma vez que o método utiliza plantas intactas com um mínimo de distúrbio no sistema, são evitados os problemas decorrentes de possíveis alterações na barreira a difusão de  $O_2$ , levantados por Minchin et al. (1986b). Esta metodologia é bastante simples em comparação às citadas em literatura, e permite a avaliação das plantas em um curto espaço de tempo (40 minutos por planta). Através de algumas adaptações, como a introdução de uma válvula de múltipla entrada controlada automaticamente, é possível manter-se até 10 plantas ligadas simultaneamente ao sistema, fazendo-se a leitura de cada uma isoladamente por cerca de um minuto, para cada nível de  $O_2$ . Isto permitiria uma maior reprodutibilidade dos dados devido ao pequeno intervalo entre a leitura das plantas. Esta automação não foi

entretanto possível, embora do modo como foi utilizado no experimento III, o método tenha permitido a obtenção de dados comparativos entre as simbioses, uma vez que durante todo o período de leitura as plantas foram mantidas à mesma temperatura. Finalmente, o equipamento necessário pode ser considerado relativamente barato. A etapa mais dispendiosa deste tipo de trabalho foi a obtenção do fator de conversão  $C_2H_2:N_2$  através da exposição das raízes noduladas a  $^{15}N_2$ .

Para os estudos da variação diurna, o método se mostrou pouco adequado pois as repetições foram avaliadas em dias diferentes devido ao tempo gasto para a análise de cada planta, dificuldades que poderiam ser superadas com a automação. Isto resultou num alto coeficiente de variação e num significativo efeito de blocos, que entretanto não explicou toda a fonte de variação. Talvez devido a estas dificuldades, durante o período diurno não foi observada variação significativa na relação  $CO_2$  evoluído. $C_2H_4$  produzido<sup>-1</sup> (Figura 14), indicando que o fluxo de elétrons pela nitrogenase nas duas simbioses permanece constante. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Rainbird et al. (1983a) em caupi, embora para ervilha, Skrdleta et al. (1984a) tenha observado variação diurna neste parâmetro.

Em termos de  $CO_2$  evoluído.N fixado<sup>-1</sup> (Figura 16) também não foi observada variação diurna significativa, no entanto, neste caso a utilização do mesmo fator de conversão para todas as coletas possa ser questionada, pois variações

diurnas nas condições ambientais podem afetar a alocação de elétrons para a nitrogenase e a reciclagem destes conforme discutido anteriormente. Skrdleta et al. (1984a) e Rainbird et al. (1983a), embora estudando outras simbioses, observaram variação diurna na relação  $\text{CO}_2$  evoluído. $\text{N fixado}^{-1}$ . Quanto a variação diurna no custo energético de crescimento e manutenção de raízes e nódulos, observa-se que, apesar de apenas apresentarem diferença estatística entre si na coleta das 12:00 hs, os valores para a estirpe CB 1809, exceto para esta coleta, foram inferiores aos da estirpe 29W (Figura 15). Isto pode ser decorrente desta estirpe ter apresentado peso seco de nódulos significativamente menor na média das coletas.

Os valores de custo energético da atividade da nitrogenase durante o estágio reprodutivo da soja, após o cálculo da conversão para nitrogênio fixado pela utilização da relação  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$ , foram de 11,5 moles de  $\text{CO}_2$ .mol de  $\text{N}_2$  fixado $^{-1}$  durante o florescimento e de 33,58 moles de  $\text{CO}_2$ .mol de  $\text{N}_2$  $^{-1}$  durante o período de formação das vagens, para a média das 4 estirpes (Figura 17). Isto corresponde a um gasto de 4,9 e de 14,39 g C.g  $\text{N}^{-1}$ , respectivamente para cada época de coleta. Ryle et al. (1978, 1984) também verificaram aumento significativo no custo energético de fixação de nitrogênio para soja nos estágios finais de desenvolvimento da planta. Esta mesma tendência de aumento no custo energético com o tempo foi observado em soja por Warembourg

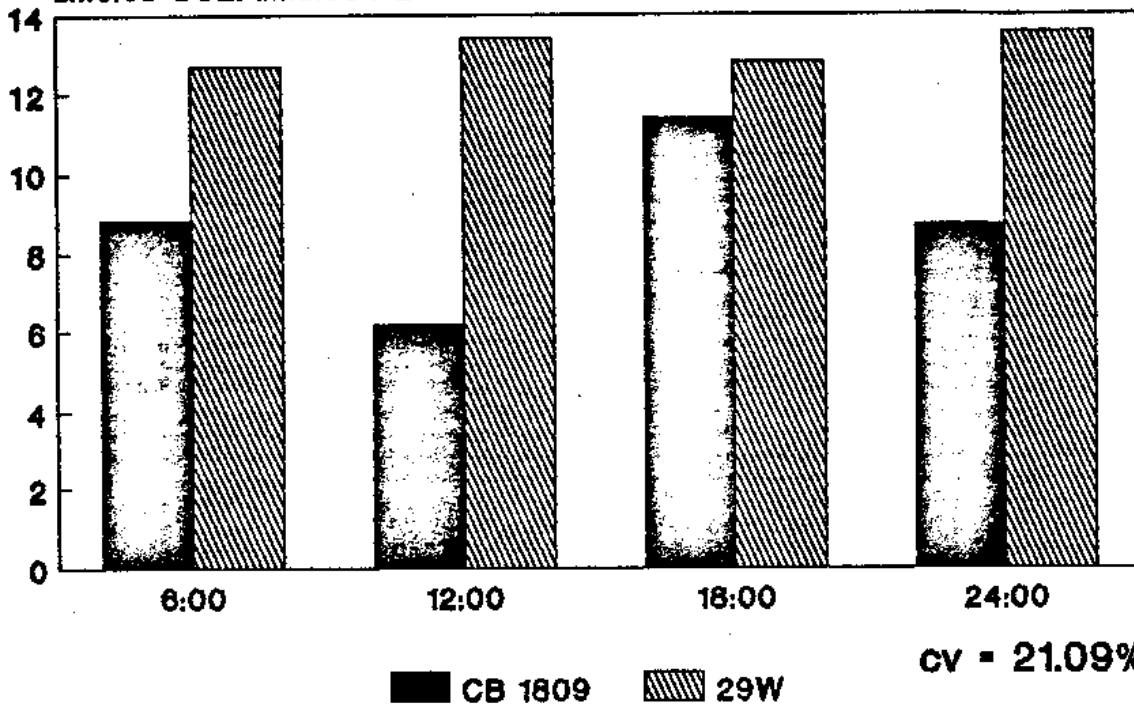


FIGURA 16: Variacão diurna no custo energético da fixaco de nitrogênio em soja cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809 e 29W de *Bradyrhizobium japonicum*. Dados calculados pela conversão dos valores de reduco de acetileno em N<sub>2</sub> fixado através da relao C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> de cada estirpe. Valores representam a média de 3 repeties e não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).

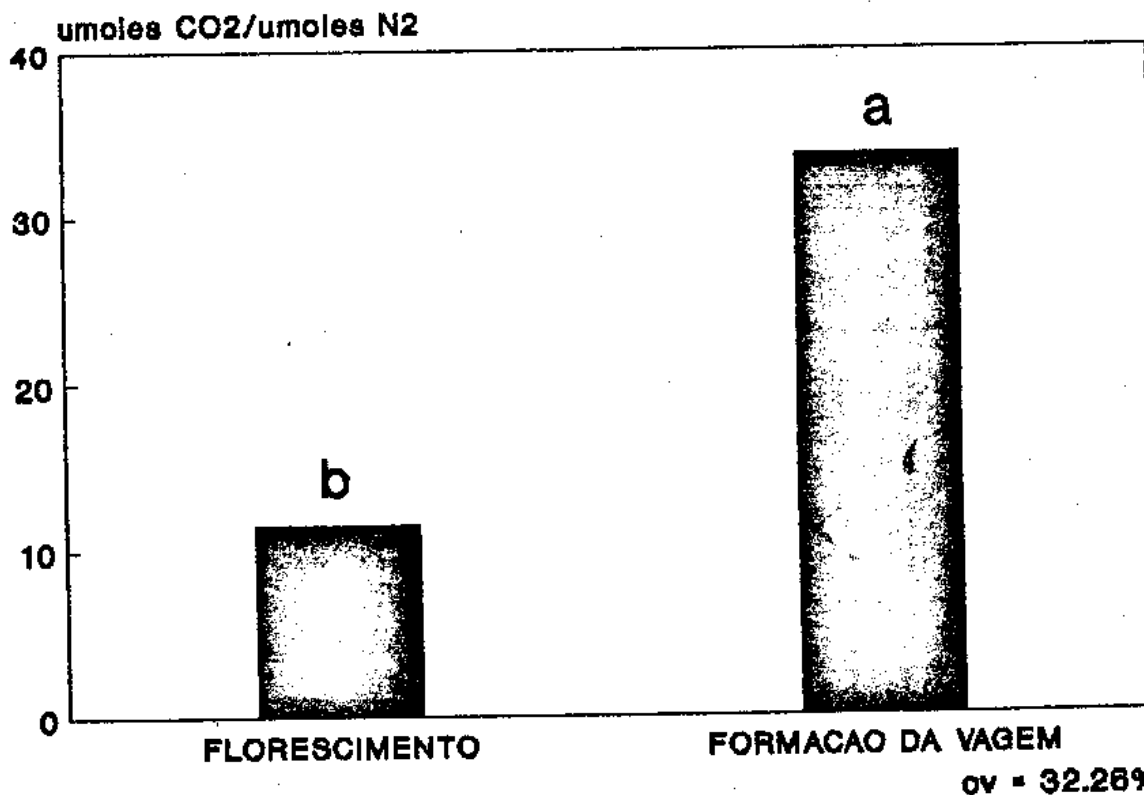


FIGURA 17: Variao no custo energético da fixaco de nitrogênio durante o ciclo reprodutivo cv. Doko inoculada com as estirpes CB 1809, DF 383, SEMIA 587 e 29W, de *Bradyrhizobium japonicum*. Dados calculados pela conversão dos valores de reduco de acetileno em N<sub>2</sub> fixado através da relao C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> de cada estirpe. Valores representam a média das estirpes (12 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan (P=0,05).

(1983) e em trevo por Warembourg & Roumet, (1989). Este decréscimo na eficiência na atividade da nitrogenase, tem sido associado por diversos autores à competição entre os nódulos e as vagens em formação pelos fotossintatos disponíveis ou ao início de senescência dos nódulos. Na segunda época de coleta ainda não foram verificados nódulos em senescência conforme indica o aumento no peso seco de nódulos observados entre a segunda e a terceira coleta (Tabela 10). Além disso, atualmente sabe-se que o potencial de fixação de nitrogênio de uma leguminosa deve ser considerado em função do suprimento de oxigênio para os nódulos, o qual depende da atuação da barreira à difusão de  $O_2$ , que por sua vez varia com a ontogenia (Minchin et al., 1983a; Rosendahl & Jakobsen, 1988), ou seja, o balanço entre o suprimento de oxigênio e de carboidratos provavelmente determinam a eficiência na utilização destes no nódulo.

Os valores de custo energético obtidos durante o período do florescimento estão dentro da faixa de valores citados em literatura (Tabela 4). O valor de  $14,4 \text{ g C.g N}^{-1}$  obtido durante o período de formação das vagens apesar de alto, está dentro da faixa dos valores citados na literatura para períodos mais avançados de desenvolvimento da planta (Ryle et al., 1978, 1984).

A percentagem da respiração das raízes e noduladas acoplada ligada a atividade da nitrogenase aumentou entre o florescimento e o período de formação das vagens, passando de

50 para 80% do total, o que na realidade é um reflexo da diminuição observada no gasto respiratório para manutenção de raízes e nódulos. Esta diminuição provavelmente reflete a redução no ritmo de crescimento dos nódulos nesta fase (Tabela 10). Os dados de literatura quanto à variação ontogenética neste percentual dependem da combinação simbiótica em estudo, mesmo considerando-se trabalhos utilizando a mesma metodologia deste experimento (Witty et al., 1983; Rosendahl & Jakobsen, 1988).

Devido a menor relação  $C_2H_2:N_2$  obtida para a estirpe CB 1809 (HUP<sup>+</sup>), os valores de custo energético para esta simbiose também foram significativamente menores (Figura 18), indicando um envolvimento da atividade da hidrogenase na economia dos nódulos formados por esta simbiose. Estes resultados vem a confirmar uma série de trabalhos anteriores que atribuem as diferenças observadas entre plantas inoculadas com estirpes HUP<sup>+</sup> e HUP<sup>-</sup> à economia em termos energéticos devido a reciclagem do  $H_2$  acoplada a geração de ATP (Albrecht et al., 1979), que pode ser de até 30% (Pate et al., 1981). Outros autores observaram menor evolução de  $CO_2$  por estirpes HUP<sup>+</sup> (Drevon et al., 1982), o que em caupi (Rainbird et al., 1983c) resultou num custo energético 35% menor. Layzell et al. (1988) desenvolveram um modelo matemático que permite obter informações sobre a importância relativa de vários fatores físicos e fisiológicos que determinam o custo respiratório de fixação de nitrogênio,



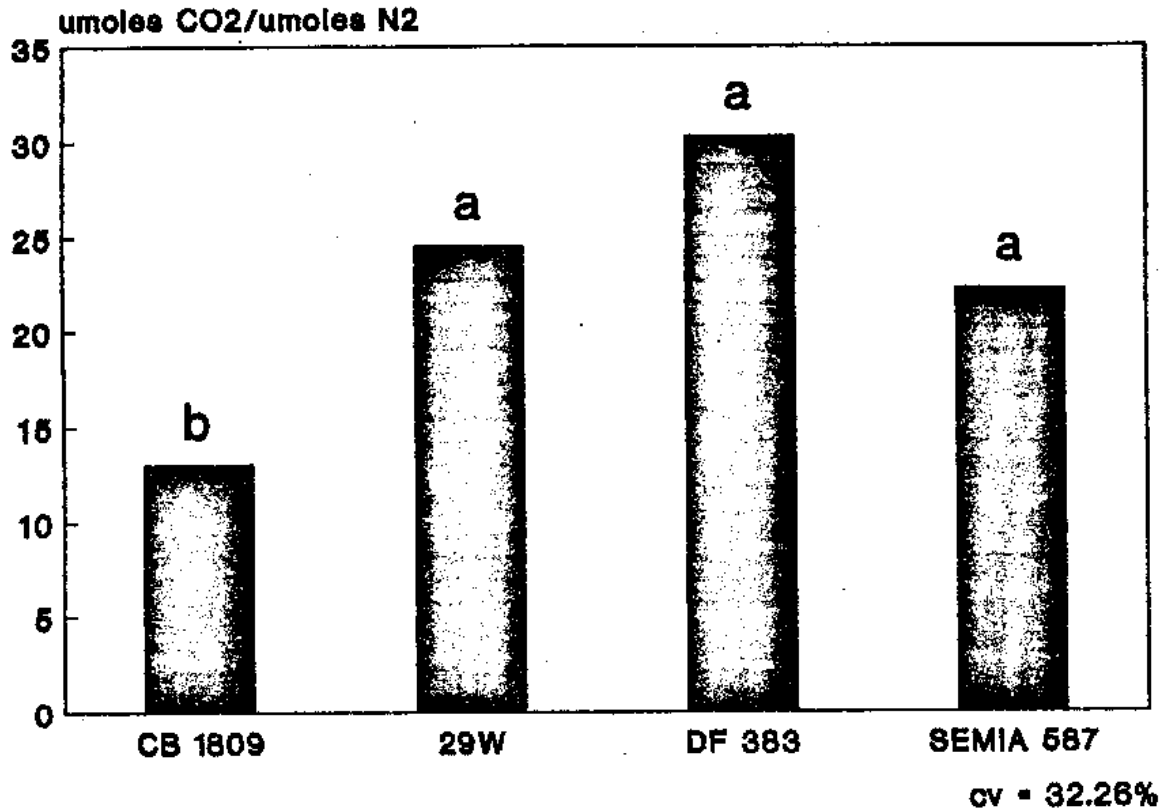


FIGURA 18: Efeito da estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* no custo energético de fixação de nitrogênio em soja cv. Doko. Dados calculados pela conversão dos valores de ARA em N<sub>2</sub> fixado pela relação C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> obtida para cada estirpe. Valores representam médias de 2 coletas (florescimento e formação da vagem, 6 plantas) e aqueles seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P=0,05).

tendo incluído a atividade da hidrogenase como um fator que pode reduzir este custo em 18%, sem considerar o envolvimento da atividade desta enzima em outros processos bioquímicos no bacteróide. A interpretação dos resultados experimentais obtidos deve levar em conta que a atividade da hidrogenase na economia dos nódulos formados por estirpes HUP<sup>+</sup> não pode ser analisada isoladamente. Sabe-se atualmente que a inoculação com estirpes HUP<sup>+</sup> pode também afetar o metabolismo do

nitrogênio nos nódulos (Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1987). Confirmando estas observações iniciais obtidas com estirpes não isogênicas, Hungria et al. (1989) estudando mutantes isogênicas de *Bradyrhizobium japonicum* verificaram nas plantas inoculadas com a revertante HUP<sup>+</sup>, um aumento na fixação de nitrogênio, na síntese de ureídeos e no índice de colheita. Os resultados obtidos no presente experimento confirmam a relação entre a atividade da hidrogenase e economia do nódulo observada por estes autores.

Estes efeitos podem ser de considerável importância econômica, pois no Brasil um aumento de apenas 10% na produção da soja devido a introdução de estirpes eficientes HUP<sup>+</sup> poderia levar a um ganho anual de mais de um bilhão de dólares.

## 6 CONCLUSÕES

1. Para as estirpes DF 383, SEMIA 587 e 29W, o perfil de evolução de  $H_2$  reflete diretamente as variações na atividade da nitrogenase de modo que a ER permaneceu constante durante o ciclo reprodutivo da planta. A estirpe CB 1809 apresentou evolução de hidrogênio muito baixa ou nula e ER sempre próxima a 100%.

2. Os valores da relação  $C_2H_2:N_2$  foram bastante variáveis entre as estirpes, sendo que a estirpe CB 1809 apresentou a menor relação  $C_2H_2:N_2$  conforme esperado devido a alta atividade de fixação de  $^{15}N_2$  e baixa evolução de  $H_2$  observada para esta estirpe.

3. A metodologia utilizada para avaliação do custo energético

da atividade da nitrogenase mostrou-se adequada para verificar diferenças entre as simbioses estudadas e nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta. No entanto, para estudos de variação diurna neste parâmetro é necessário automatizar o sistema, de modo a diminuir o intervalo de análise das plantas.

4. Houve uma correlação altamente significativa entre a evolução de  $\text{CO}_2$  e a atividade de redução de acetileno a  $\text{pO}_2$  decrescente durante o período de atividade crescente da nitrogenase. Esta correlação foi fraca no período de enchimento dos grãos, dificultando a obtenção dos custos respiratórios da atividade da nitrogenase nesta fase.

5. Não foi observada variação diurna no custo energético de atividade da nitrogenase e de fixação de nitrogênio, provavelmente devido a inadequação do método para este tipo de estudo.

6. Houve variação no custo energético de atividade da nitrogenase e de fixação de  $\text{N}_2$  durante o ciclo reprodutivo da planta, sendo que o menor valor foi verificado no florescimento aumentando significativamente no período inicial de formação das vagens.

7. A época de maior custo energético para manutenção de

raízes e nódulos foi durante o florescimento, período em que os nódulos encontravam-se em acentuado crescimento.

8. A estirpe DF 383 apresentou maior custo respiratório de transferência de elétrons pela nitrogenase ( $\mu\text{moles CO}_2/\mu\text{moles C}_2\text{H}_4$ ) indicando a presença de uma nitrogenase deficiente nas condições do presente experimento.

9. A estirpe CB 1809 apresentou os menores valores de custo energético de atividade da nitrogenase e fixação de  $\text{N}_2$  para a média das coletas durante o ciclo diurno e reprodutivo, indicando um possível efeito da atividade da hidrogenase na economia do nódulo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, S.L.; MAIER, R.J.; HANUS, F.J.; RUSSELL, S.A.; EMERICH, D.W. & EVANS, H.J. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. *Science*, Washington, 203:1255-7, 1979.
- ARIMA, Y. Respiration and efficiency of  $N_2$  fixation by nodules formed with a  $H_2$ -uptake positive strain of *Rhizobium japonicum*. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, 27:115-9, 1981.
- ATKINS, C.A. Efficiencies and inefficiencies in legume/*Rhizobium* - a review. *Plant and Soil*, The Hague, 82:273-84, 1984.
- ATKINS, C.A.; HERRIDGE, D.F. & PATE, J.S. The economy of carbon and nitrogen in nitrogen-fixing annual legumes.

- Experimental observations and theoretical considerations. In: *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation*. Vienna, IAEA, 1978. p. 211-42. (Panel Proceedings Series).
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; GRIFFITHS, G.A. & WHITE, S.T. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated ( $\text{NO}_3^-$ -grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiology*, Rockville, 66:978-83, 1980.
- AYANABA, A. & LAWSON, T.L. Diurnal changes in acetylene reduction in field-grown cowpeas and soyabeans. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 9:125-9, 1977.
- BEDMAR, E.J.; EDIE, S.A. & PHILLIPS, D.A. Host plant cultivar effects on hydrogen evolution by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant Physiology*, Rockville, 72:1011-15, 1983.
- BERGERSEN, F.J. The effects of partial pressure of oxygen upon respiration and nitrogen fixation by soybean root nodules. *Journal of General Microbiology*, Cambridge, 29:113-25, 1962.
- BERGERSEN, F.J. Nitrogen fixation in legume root nodules: biochemical studies with soybean. *Proceedings of the Royal Society B*, London. 172:401-16, 1969.
- BERGERSEN, F.J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Australian Journal of Biological Sciences*, Victoria, 23:1015-25, 1970.
- BERGERSEN, F.J. The central reactions of nitrogen fixation. *Plant and Soil*, The Hague, 1971. p. 511-4. Special volume

- BETHENOD, O.; PRIOUL, J.L. & DEROUCHE, M.E. Short term inhibition of acetylene reduction activity by low CO<sub>2</sub> concentrations around the nodulated roots of various legumes. *Physiologie Végétale*, Paris, 22:565-70, 1984.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. In: HOLLAENDER, A., ed. *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*. New York, Plenum Press, 1977a. p. 401-9.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Ontogenetic interactions between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Plant Physiology*, Rockville, 60:419-21, 1977b.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Variations in nitrogenase and hydrogenase activity of Alaska pea root nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 63:816-20, 1979.
- BOND, G. Symbiosis of leguminous plants and nodule bacteria. I. Observations on respiration and on the extent of utilization of host carbohydrates by nodule bacteria. *Annals of Botany*, London, 5:313-37, 1941.
- BREEZE, V. & ELSTON, J. Some effects of temperature and substrate content upon respiration and the carbon balance of field beans (*Vicia faba* L.). *Annals of Botany*, London, 43:863-76, 1978.
- BULEN, W.A.; BURNS, R.C. & Lecomte, S.R. Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,



- Washington, 53:532-39, 1965
- BULEN, W.A. & LeCOMTE, J.R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for  $N_2$  reduction ATP-dependent  $H_2$  evolution and ATP hydrolysis. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 56:979-86, 1966.
- BURRIS, R.H. Methodology. In: QUISPTEL, A., ed. The Biology of Nitrogen Fixation. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., 1974. p. 9-33.
- CAMMACK, R. & YATES, M.G. Hydrogenases from chemistry to legume growth. Nature, London, 312:182, 1986.
- CARTER, K.R.; JENNINGS, N.T.; HANUS, N.T. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybean inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 24:307-11, 1978.
- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A. & SUTTON, W.D. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. I. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase and correlation with nitrogen fixation during nodule development. Plant Physiology, Rockville, 60:47-50, 1977.
- CUNNINGHAM, S.D.; KAPULNIK, Y.; BREWIN, N.J. & PHILLIPS, D.A. Uptake hydrogenase activity determined by plasmid PRLGJ1 in *Rhizobium leguminosarum* does not increase symbiotic nitrogen fixation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 50:791-4, 1985.
- DART, P.J.; DAY, J.M. & HARRIS, D. Assay of nitrogenase

- activity by acetylene reduction. In: Use of Isotopes for Study of Fertilizer Utilization by Legume Crops. Vienna, IAEA, 1972. p.85-100. (Technical Report, 149).
- DEJONG, T.M.; BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B. & PHILLIPS, D.A. Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarum* by plasmid transfer. *Journal of General Microbiology*, London, 128:1829-38, 1982.
- DIXON, R.O.D. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. *Annals of Botany*, London, 31:179-88, 1967.
- DIXON, R.O.D. Hydrogenase in legumes root nodule bacteroids: Occurrence and properties. *Archives für Microbiologie*, Berlin, 85:193-201, 1972.
- DIXON, R.O.D. Hydrogenases and efficiency of nitrogen fixation in aerobes. *Nature*, London, 262:173, 1976.
- DIXON, R.O.D. Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in rhizobia. *Biochimie*, Paris, 60:233-6, 1978.
- DIXON, R.O.D.; BERLIER, Y.M. & LESPINAT, P.A. Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soya bean and pea. *Plant and Soil*, The Hague, 61:135-43, 1981a.
- DIXON, R.O.D.; BLUNDEN, E.A.G. & SEARL, J.W. Intercellular space and hydrogen diffusion in pea and lupin root nodules. *Plant Science Letters*, Amsterdam, 23:109-16, 1981b.
- DIXON, R.O.D. & BLUNDEN, E.A.G. The relative efficiency of nitrogen fixation in pea root nodules. *Plant and Soil*, The Hague, 75:131-8, 1983.

- DREVON, J.J.; FRAZIER, L.; RUSSEL, S.A. & EVANS, H.J. Respiratory and nitrogenase activities of soybean nodules formed by hydrogen uptake negative (*hup<sup>-</sup>*) mutant and revertant strain of *Rhizobium japonicum* characterized by protein patterns. *Plant Physiology*, Rockville, 70:1341-6, 1982.
- DREVON, J.J.; KALIA, V.C.; HECKMANN, M.O. & SALSAC, L. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 53:610-2, 1987.
- DREVON, J.J. & SALSAC, L. Relations entre le métabolisme de l'hydrogene et la fixation d'azote par les nodosités de légumineuses. *Physiologie Végétale*, Paris, 22:263-75, 1984.
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L. & BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of  $N_2$  fixation using  $^{15}N$ . *Plant and Soil*, Dordrecht, 88:333-43, 1985.
- DURAND, J-L.; SHEEHY, J.E. & MINCHIN, F.R. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soyabean plants experiencing water deprivation. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 38:311-21, 1987.
- EDIE, S.A. & PHILLIPS, D.A. Effect of the host legume on acetylene reduction and hydrogen evolution by *Rhizobium* and nitrogen. *Plant Physiology*, Rockville, 72:156-60,

- 1983.
- EISBRENNER, G. & EVANS, H.J. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. *Annual Review Plant Physiology*, Rockville, 34:105-36, 1983.
- EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGUESO, T.; CHING, T.M. & EVANS, H.J. Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium jaeppicum* bacteroids. *The Journal of Bacteriology*, Baltimore, 132(1):153-60, 1979.
- EMERICH, D.W.; RUIZ-ARGUESO, T.; RUSSEL, S. & EVANS, H.J. Investigation of the H<sub>2</sub> oxidation system in *Rhizobium jaeppicum* 122DES nodule bacteroids. *Plant Physiology*, Rockville, 66:1061-6, 1980.
- EVANS, H.J.; EISBRENNER, G.; CANTRELL, M.A.; RUSSEL, S.A. & HANUS, F.J. The present status of hydrogen recycling in legumes. *Israel Journal of Botany*, Jerusalem, 31:72-88, 1982.
- EVANS, H.J.; EMERICH, D.W.; LEPO, J.E.; MAIER, R.J.; CARTER, K.R.; HANUS, F.J. & RUSSELL, S.A. The role of hydrogenase in nodule bacteroids and free-living rhizobia. In: STEWART, W.D.T. & GALLON, J.R., eds. *Nitrogen fixation*, London, Academic Press, 1980. p. 55-80.
- EVANS, H.J.; PUROHIT, K.; CANTRELL; EINSBRENNER, G.; RUSSEL, S.A.; HANUS, F.J. & LEPO, J.E. Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen-fixing organisms. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. *Current Perspectives in Nitrogen*

- Fixation. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p. 84-96.
- EVANS, H.J.; ZUBER, M. & DALTON, D.A. Some processes related to nitrogen fixation in nodulated legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, London, 312:209-25, 1987.
- FINKE, R.L.; HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. Efficiency of nitrogen assimilation by  $N_2$ -fixing and nitrate-grown soybean plants (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiology*, Rockville, 70:1178-84, 1982.
- FISHBECK, K.; EVANS, H.J. & BOERSMA, L.L. Measurement of nitrogenase activity of intact legume symbionts "in situ" using the acetylene reduction assay. *Agronomy Journal*, Madison, 65:429-33, 1973.
- GIBSON, A.H. The carbohydrate requirement for symbiotic nitrogen fixation: A "whole-plant" growth analysis approach. *Australian Journal of Biological Science*, Victoria, 19:499-515, 1966.
- GIBSON, A.H. The energy requirements of symbiotic nitrogen fixation. In: BROUGHTON, W.J. & JOHN, C.K., eds., *Proceedings of the Soil Microbiology and Plant Nutrition Symposium*. Malaya, University of Malaya Press, 1976. p. 1-16.
- GIBSON, A.H.; DREYFUS, B.L.; LAWN, R.J.; SPRENT, J.I. & TURNER, G.L. Host and environmental factors affecting hydrogen evolution and uptake. In: GIBSON, A.H. & NEWTON,

- W.E., eds. *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p.373.
- GORDON, A.J.; MACDUFF, J.H.; RYLE, G.J.A. & POWELL, C.E. White clover  $N_2$ -fixation in response to root temperature and nitrate. II.  $N_2$ -fixation, respiration, and nitrate reductase activity. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 40:527-34, 1989.
- GUTSCHICK, V. Energy and nitrogen fixation. *Bio Science*, Washington, 28:571-5, 1978.
- HANUS, F.J.; ALBRECHT, S.L.; ZABLOTOWICZ, R.M.; EMERICH, D.W.; RUSSELL, S.A. & EVANS, H.J. Yield and N content of soybean seed as influenced by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic. *Agronomy Journal*, Madison, 73:368-72, 1981.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HERBERT, R.R.; HOLSTEN, R.D. & JACKSON, E.K. Biological nitrogen fixation: a key to world protein. *Plant and Soil*, The Hague, 1971. p. 561-90. Special Volume
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. Nitrogen fixation research: a key to world food?. *Science*, London, 188:633-43, 1975.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.S. ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, Cambridge University Press, 1976. p.421-39.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. The

- acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, Rockville, 43:1185-207, 1968.
- HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.W. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine Max* L. Merr.). *Plant Physiology*, Rockville, 42:146-54, 1972.
- HART, A.L. A root chamber for measuring the acetylene reducing activity of intact soya beans. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 12:349-52, 1976.
- HECKMANN, M.O.; DREVON, J.J.; SAGLIO, P. & SALSAC, L. Effect of oxygen and malate on  $NO_3^-$  inhibition of nitrogenase in soybean nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 20:224-9, 1989.
- HERRIDGE, D.F. & PATE, J.S. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in an annual legume. *Plant Physiology*, Rockville, 60:759-64, 1977.
- HEYTLER, P.G. & HARDY, W.F. Energy requirements for  $N_2$  fixation by rhizobial nodules in soybeans. *Plant Physiology*, Rockville, 63:84, 1979. Supplement
- HOCH, G.E.; LITTLE, H.N. & BURRIS, R.H. Hydrogen evolution from soybean root nodules. *Nature*, London, 129:430-1, 1957.
- HOPMANS, P.; CHALK, P.M. & DOUGLAS, L.A. Symbiotic  $N_2$  fixation by legumes growing in pots. I. Fixation of  $^{15}N$ -labelled  $N_2$  and  $C_2H_4$  reduction by *Trifolium subterraneum*

- L. *Plant and Soil*, The Hague, 24:325-32, 1983a.
- HOPMANS, P.; CHALK, P.M. & DOUGLAS, L.A. Symbiotic  $N_2$  fixation by legumes growing in pots. II. Uptake of  $^{15}N$ -labelled  $NO_3^-$ ,  $C_2H_2$  reduction and  $H_2$  evolution by *Trifolium subterraneum* L., *Medicago truncata* Gaertn and *Acacia dealbata* Link. *Plant and Soil*, The Hague, 24:325-32, 1983b.
- HOUWAARD, F. Nitrogenase activity of pea bacteroids as affected by carbohydrates and ammonium chloride. *Plant and Soil*, The Hague, 54:51-63, 1980.
- HUDD, G.A.; LLOYD-JONES, C.P. & HILL-COTTINGHAM, D.G. Comparison of acetylene-reduction and nitrogen-15 techniques for the determination of nitrogen fixation by field bean (*Vicia faba*) nodules. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 48:111-5, 1980.
- HUNGRIA, M. *Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em Phaseolus vulgaris* L. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1985. 292p. (Tese Doutorado)
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 21:127-40, 1986.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Cultivar and *Rhizobium* strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, Dordrecht, 103:111-121, 1987.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. & DOBEREINER, J. Relative



- efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium jaeonicum*. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 7:325-9, 1989.
- HUNT, S.; GAITO, S.T. & LAYZELL, D.B. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characterisation of the diffusion barrier and estimation of the concentration of CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> in the infected cells. *Planta*, Berlin, 173:128-41, 1988.
- ISRAEL, D.W. Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and remobilization by soybeans. *Agronomy Journal*, Washington, 73:505-16, 1981.
- JAMES, E.K. Oxygen diffusion barrier in soybean root nodules. Dundee, University of Dundee, 1990. (Tese de Doutorado)
- KAHN, M.L.; KRAUS, J. & SOMERVILLE, J.E. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium* - legume symbiosis. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J. & NEWTON, W.E., eds. *Nitrogen Fixation Research*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p. 193-9.
- KANAMORI, T.; YONEYAMA, T. & ISHIZUKA, J. Relationships of dinitrogen fixation (acetylene reduction) with respiration, ATP, and magnesium in soybean nodules. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, 30:231-7, 1984.
- KIMOU, A. & DREVON, J.J. Hydrogen metabolism and nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.) Inoculated with different strains of *Rhizobium* spp. *Biology and Fertility*

- of Soils, Berlin, Z:259-62, 1989.
- KOHL, D.H.; REYNOLDS, P.H.S. & SHEARER, G. Distribution of  $^{15}\text{N}$  within pea, lupin and soybean nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 20:420-6, 1989.
- LAING, W.A.; CHRISTELLER, J.T. & SUTTON, W.D. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. II. Studies with  $^{14}\text{C}$ -labeled glucose, the pathway of glucose catabolism, and the effects of some treatments that inhibit nitrogen fixation. *Plant Physiology*, Rockville, 63:450-4, 1979.
- LAMBERS, H.; LAYZELL, D.B. & PATE, J.S. Efficiency and regulation of root respiration in a legume: effects of the N source. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 50:319-25, 1980.
- LAWN, R.J. & BRUN, L.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans; I - Effect of perotosynthetic source-sink manipulation. *Crop Science*, Madison, 14:11-6, 1974.
- LAWRIE, A.C. & WHEELER, C.T. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of *Pisum sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen. *New Phytologist*, London, Z2:1341-8, 1973.
- LAWRIE, A.C. & WHEELER, C.T. Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon. I. Plant growth and metabolism of photosynthetic assimilates. *New Phytologist*, London, Z4:429-36, 1975a.
- LAWRIE, A.C. & WHEELER, C.T. Nitrogen fixation in root

- nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon. II. The dark fixation of carbon dioxide. *New Phytologist*, London, 74:437-45, 1975b.
- LAYZELL, D.B.; GAITO, S.T. & HUNT, S. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. I. Calculation of gas exchange rates and the energy cost of  $N_2$  fixation. *Planta*, Berlin, 173:117-27, 1988.
- LAYZELL, D.B.; RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. Economy of photosynthate use in nitrogen-fixing legume nodules. Observation on two contrasting symbiosis. *Plant Physiology*, Rockville, 64:888-91, 1979.
- LEIGH, J. Metals set a trap for nitrogen. *New Scientist*, London, 123:55-8, 1990.
- LEPO, J.E.; HICKOK, R.E.; CANTRELL, M.A.; RUSSELL, S.A. & EVANS, H.J. Revertible hydrogen uptake-deficient mutants of *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, Washington, 144:614-20, 1981.
- LODHA, M.L.; JOHARI, R.P.; SHARMA, N.D. & MEHTA, S.L. Nitrogen fixation in relation to dark  $CO_2$  fixation in developing nodules of *Arachis hypogaea* L. mutants. *Indian Journal Experimental Biology*, New Delhi, 21:629-32, 1983.
- LONG, S.R. *Rhizobium* - Legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, Cambridge, 56:203-14, 1989.
- LOPEZ, M.; CARBONERO, V.; CABRERA, E. & RUIZ-ARGUESO, T. Effects of host on the expression of the  $H_2$ -uptake hydrogenase of *Rhizobium* in legume nodules. *Plant Science*

- Letters, Amsterdam, 22:191-9, 1983.
- MAHON, J.D. Root and nodule respiration in relation to acetylene reduction in intact nodulated peas. *Plant Physiology*, Rockville, 60:812-6, 1977a.
- MAHON, J.D. Respiration and the energy requirements for nitrogen fixation in nodulated pea roots. *Plant Physiology*, Rockville, 60:817-21, 1977b.
- MAHON, J.D. Environmental and genotypic effects on the respiration associated with symbiotic nitrogen fixation in peas. *Plant Physiology*, Rockville, 63:892-7, 1979.
- MATSUI, E.; VOSE, P.B.; RODRIGUES, N.S. & RUSCHEL, A.P. Use of  $^{15}\text{N}$  enriched gas to determine  $\text{N}_2$ -fixation by undisturbed sugar-cane plant in the field. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, P.B. , eds. *Associative  $\text{N}_2$ -Fixation*. Boca Raton, CRC, 1981. Vol II. p. 153-61.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, Oxford, 15:873-85, 1976.
- MINCHIN, F.R. Energetics of nitrogen metabolism in plants. Discussion paper for the Royal Society Study Group on the Nitrogen Cycle, 1980. 12p.
- MINCHIN, F.R.; MINGUEZ, M.I.; SHEEHY, J.E.; WITTY, J.F. & SKOT, L. Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 32:1103-13, 1986a.
- MINCHIN, F.R. & PATE, J.S. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *Journal of*

- Experimental Botany, Oxford, 24:259-71, 1973.
- MINCHIN, F.R. & PATE, J.S. Diurnal functioning of the legume root nodule. Journal of Experimental Botany, Oxford, 25:295-308, 1974.
- MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E.; MINGUEZ, M.I. & WITTY, J.F. Characterization of the resistance to oxygen diffusion in legume nodules. Annals of Botany, London, 55:53-60, 1985.
- MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E. & WITTY, J.F. Further errors in the acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. Journal of Experimental Botany, Oxford, 37:1581-91, 1986b.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H. & RAWSTHORNE, S. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. Plant, Cell and Environment, Oxford, 4:5-26, 1981.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & NEVES, M.C.P. Carbon metabolism, nitrogen assimilation, and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata*, L. walp) grown in an adverse temperature regime. Journal Experimental Botany, Oxford, 31:1327-45, 1980.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F. & SHEEHY, J.E. A new technique for the measurement of respiratory costs of symbiotic nitrogen fixation. In: JONES, D.G. & DAVIES, D.R., eds. Temperate Legumes: Physiology, Genetics and Nodulation. London, Pitman Advanced Publishing Program, 1983. p. 201-16.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J.E. & MULLER, M.A. A

- major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular activity under assay conditions. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 34:641-9, 1983b.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F. & SKOT, L. Limitations and benefits of oxygen diffusion control in legume nodules. In: O'GARA, F. et al., eds. *Physiological limitations and the genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 77-85.
- MONTANGE, D.; WAREMBOURG, F.R. & BARDIN, R. Utilisation du  $^{15}\text{N}_2$  pour estimer la fixation d'azote et la repartition chez les légumineuses. *Plant and Soil*, The Hague, 63:131-40, 1981.
- NELSON, L.M. & CHILD, J.J. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism by *Rhizobium leguminosarum* isolates in pea root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 27:1028-34, 1981.
- NEVES, M.C.P. Carbon and nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). Reading, University of Reading, 1978. 229p. (Tese Doutorado)
- NEVES, M.C.P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium*-leguminosas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 5:79-92, 1981.
- NEVES, M.C.P. Energy cost of biological nitrogen fixation. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. eds. *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. Cali,

- Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. p. 77-92.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F. & DOBEREINER, J. Rhizobium strain effect on nitrogen transport and distribution in soybeans. *Journal Experimental Botany*, Oxford, 36:1179-92, 1985.
- NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, 6:267-319, 1987.
- NEVES, M.C.P.; MINCHIN, F.R. & SUMMERFIELD, R.J. Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) plants dependent on nitrate-nitrogen or on one of two strains of Rhizobium. *Tropical Agriculture*, Trinidad, 58(2):115-32, 1981.
- NORRIS, D.O. & T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp in relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, 22:214-35, 1964.
- ORME-JOHNSON, W.H.; DAVIS, L.C.; HENZEL, M.T.; AVERILL, B.A.; ORME-JOHNSON, N.R.; MUNCK, E. & ZIMMERMAN, R. Components and pathways in biological nitrogen fixation. In: NEWTON, W.; POSTGATE, C. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C., eds. *Recent Developments in Nitrogen Fixation*. London, Academic Press, 1977. p. 131-78.
- PANKHURST, C.E. & SPRENT, J.I. Effect of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root

- nodules. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 26:287-304, 1975.
- PANKHURST, C.E. & SPRENT, J.I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybean and french bean root nodules. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 26:1-9, 1976.
- PATE, J.S. Functional biology of  $N_2$  fixation by legumes. In: HARDY, R.W.F. & SILVER, W.S., eds. *A Treatise on Dinitrogen Fixation*. New York, John Wiley & Sons, 1977. Section III: Biology, p. 473-517.
- PATE, J.S.; ATKINS, C.A. & RAINBIRD, R.M. Theoretical and experimental costing of nitrogen fixation and related processes in nodulates of legumes. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., eds. *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p. 105-16.
- PATE, J.S.; ATKINS, C.A.; HERRIDGE, D.F. & LAYZELL, D.B. Synthesis, storage and utilization of amino compounds in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiology*, Rockville, 67:37-42, 1981.
- PATE, J.S. & HERRIDGE, D.F. Partitioning and utilization of net photosynthate in a nodulated annual legume. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 29:401-12, 1978.
- PATE, J.S.; LAYZELL, D.B. & ATKINS, C.A. Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and non nodulated ( $NO_3^-$  grown)



- legume. *Plant Physiology*, Rockville, 64:1083-8, 1979.
- PATTERSON, T.G. & LaRUE, T. Root respiration associated with nitrogenase activity ( $C_2H_2$ ) of soybean, and a comparison of estimates. *Plant Physiology*, Rockville, 72:701-5, 1983.
- PATTERSON, T.G.; PATERSON, J.B. & LaRUE, T.A. Effect of supra-ambient oxygen on nitrogenase activity ( $C_2H_2$ ) and root respiration of soybeans and isolated soybean bacteroids. *Plant Physiology*, Rockville, 72:695-700, 1983.
- PEAT, J.R.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & JEFFCOAT, B. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soya bean. *Annals of Botany*, London, 48:177-82, 1981.
- PETERS, G.A.; TOIA Jr., R.E. & LOUGH, S.M. Azolla-Anabaena azollae relationship. V.  $^{15}N_2$  fixation, acetylene reduction and  $H_2$  production. *Plant Physiology*, Rockville, 52:1021-5, 1977.
- PHILLIPS, D.A. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annual Review of Plant Physiology*, Rockville, 31:29-49, 1980.
- RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. Diurnal variation in the functioning of cowpea nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 72:308-12, 1983a.
- RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. Effect of temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 72:392-394, 1983b.
- RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & SANFORD, P. Significance of hydrogen evolution in the carbon and

- nitrogen economy of nodulated cowpea. *Plant Physiology*, Rockville, **Z1**:122-7, 1983c.
- RAINBIRD, R.M.; HITZ, W.D. & HARDY, R.W. Experimental determination of the respiration associated with soybean/*Rhizobium* nitrogenase function, nodule maintenance, and total nodule nitrogen fixation. *Plant Physiology*, Rockville, **Z5**:49-53, 1984.
- RALSTON, E.J. & IMSANDE, J. Entry of oxygen and nitrogen into intact soybean nodules. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, **33**:208-14, 1982.
- RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; COOKSON, C. & COOMBS, J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry*, Oxford, **12**:341-55, 1980.
- RIVERA-ORTIZ, J.M. & BURRIS, R.H. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **123**:537-45, 1975.
- ROSENDAHL, L. & JAKOBSEN, I. Effect of age, supra-ambient oxygen and repeated assays on acetylene reduction and root respiration in pea. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **Z4**:77-82, 1988.
- ROSENDAHL, L.; VANCE, C.P.; MILLER, S.S. & JACOBSEN, E. Nodule physiology of a supernodulating pea mutant. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **ZZ**:606-12, 1989.
- ROUGHLEY, R.J. & DART, P.J. Reduction of acetylene by nodules of *Licifolium subtetraneum* as affected by root temperature, *Rhizobium* strain and host cultivar. *Archives of*

- Microbiology, Berlin, 62:171-9, 1969.
- RUIZ-ARGUESO, T.; EMERICH, D.W. & EVANS, H.J. Hydrogenase system in legume nodules: a mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. The Journal of Bacteriology, Baltimore, 132:824-9, 1979a.
- RUIZ-ARGUESO, T.; EMERICH, D.W. & EVANS, H.J. Characteristics of the  $H_2$  oxidizing system in soybean nodule bacteroids. Archives für Microbiologie, Berlin, 121:199-206, 1979b.
- RUIZ-ARGUESO, T.; HANUS, J. & EVANS, H.J. Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of *Rhizobium leguminosarum*. Archives für Microbiologie, Berlin, 116:113-B, 1978.
- RYLE, G.J.A.; ARNOTT, R.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J.  $N_2$  fixation and the respiratory costs of nodules, nitrogenase activity and nodule growth and maintenance in fiskeby soybean. Journal of Experimental Botany, Oxford, 35:1156-65, 1984.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. Effect of source of nitrogen on the growth fiskeby soya bean: the carbon economy of whole plants. Annals of Botany, London, 42:637-48, 1978.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. I. Nitrogen fixation and the respiration of the nodulated root. Journal of Experimental Botany, Oxford, 30:135-44, 1979a.

- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 30:145-53, 1979b.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. Defoliation in white clover: nodule metabolism, nodule growth and maintenance, and nitrogenase functioning during growth and regrowth. *Annals of Botany*, London, 57:263-71, 1986.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. Responses of  $N_2$  fixation-linked respiration to host-plant energy status in white clover acclimated to a controlled environment. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 39:879-87, 1988.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E.; TIMBRELL, M.K. & GORDON, A.J. Effect of temperature on nitrogenase activity of white clover. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 40:733-9, 1989.
- SAITO, S.M.T. Relação entre fixação de  $^{15}N_2$ , evolução de  $H_2$  e redução de  $C_2H_2$  em feijão-de-pasta. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1978. 89p. (Tese Doutorado)
- SAITO, S.M.T.; MATSUI, E. & SALATI, E.  $^{15}N_2$  fixation,  $H_2$  evolution and  $C_2H_2$  reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 49:37-42, 1980.
- SALMINEN, S.O. & NELSON, L.M. Role of uptake hydrogenase in

- providing reductant for nitrogenase in *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 764:132-7, 1984.
- SALSAC, L.; DREVON, J.J.; ZENGBÉ, M.; CLEYET-MAREL, J.C. & OBATON, M. Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physiologie Végétale*, Paris, 22(4):509-21, 1984.
- SCHUBERT, K.R.; ENGELKE, J.A.; RUSSELL, S.A. & EVANS, H.J. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. I. Effect of rhizobial strains and plant age. *Plant Physiology*, Rockville, 60:651-4, 1977.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, 73(4):1207-11, 1976.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. The relation of hydrogen reactions to nitrogen fixation in nodulated symbionts. In: NEWTON, W.; POSTGATE, J.R. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C., eds. *Recent Developments in Nitrogen Fixation*. London, Academic Press, 1977. p. 85-96.
- SCHUBERT, K.R.; JENNINGS, N.T. & EVANS, H.J. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. *Plant Physiology*, Rockville, 61:398-401, 1978.
- SCHUBERT, K.R. & RYLE, G.J.A. The energy requirements for  $N_2$  fixation in nodulated legumes. In: SUMMERFIELD, R.R. & BUNTING, A.H., eds. *Advances in Legume Science*. London,

- The Majesty's Stationery Office, 1980. p. 85-96.
- SCHULLER, K.A.; MINCHIN, F.R. & GRESSHOFF, P.M. Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of soybean cv. Bragg and a supernodulating mutant: effects of nitrate. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 39:865-77, 1988.
- SELLSTEDT, A. Acetylene reduction,  $H_2$  evolution and  $^{15}N_2$  fixation in the *Alnus incana*-*Frankia* symbioses. *Planta*, Berlin, 167:382-6, 1986.
- SELLSTEDT, A.; HÖGBERG, P. & JONSSON, K. Diurnal variation in acetylene reduction and net hydrogen evolution in five tropical and subtropical nitrogen-fixing tree symbioses. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 40:1163-8, 1989.
- SHEEHY, J.E.; BERGENSEN, F.J.; MINCHIN, F.R. & WITTY, J.F. A simulation study of gaseous diffusion resistance, nodule pressure gradients and biological nitrogen fixation in soybean nodules. *Annals of Botany*, London, 60:345-51, 1987.
- SHEEHY, J.E.; MINCHIN, F.R. & WITTY, J.F. Biological control of the resistance to oxygen flux in nodules. *Annals of Botany*, London, 52:565-71, 1983.
- SHEEHY, J.E.; MINCHIN, F.R. & WITTY, J.F. Control of nitrogen fixation in a legume nodule: an analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure. *Annals of Botany*, London, 55:549-62, 1985.
- SILVA, V.S. da. Variação diurna das enzimas assimilatórias de amônio e xantina desidrogenase em soja inoculada com

- estirpes de rizóbio com diferentes capacidade de reciclar  $H_2$ . Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1989. 135p. (Tese Mestrado)
- SIMPSON, F.B. The hydrogen reaction of nitrogenase. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 62:187-90, 1987.
- SIMPSON, F.B. & BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, Washington, 224:1095-7, 1984.
- SINCLAIR, T.R. & GOUDRIAAN, J. Physical and morphological constraints on transport in nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 62:143-5, 1981.
- SKOT, L. Relationship between  $C_2H_2$  reduction,  $H_2$  evolution and  $^{15}N_2$  fixation in root nodules of pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 52:581-4, 1983.
- SKOT, L.; HIRCH, P.R. & WITTY, J.F. Genetic factors in *Rhizobium* affecting the symbiotic carbon costs of  $N_2$  fixation and host plant biomass production. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 61:239-46, 1986.
- SKRDLETA, V.; NASINEC, V.; LISÁ, L.; GAUDINOVA, A. & NEMCOVA, M. Gross carbon respiratory costs of symbiotic dinitrogen fixation in peas (*Pisum sativum* L.). *Zentralblatt für Mikrobiologie*, Jena, 132:147-55, 1984.
- SKRDLETA, V.; NASINEC, V.; SINDELAR, L.; GAUDINOVA, A. & LISÁ, L. Relationships among nitrogenase activity, dihydrogen evolution and root nodule respiration in peas (*Pisum sativum* L.). In: MEETING OF THE SECTION OF SOIL

- BIOLOGY OF THE HUNGARIAN SOCIETY OF SOIL SCIENCE, 8, G6d6116, 1983. Proceedings... G6d6116, House of the Hungarian Academy of Sciences, 1983. p. 463-72.
- SKRDLETA, V.; NEMCOVÁ, M.; LISÁ, L. & GAUDINOVÁ, A. Root respiration and potential  $N_2$  fixation in Pea in relation to the source of nitrogen nutrition. Rostlinná Vyroba, Praha, 30:1171-8, 1984b.
- SORENSEN, G.M. & WINDAELE, R. Effect of transfer of symbiont plasmid and of hydrogenase genes (hup) on the symbiont efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains. The Journal of General Microbiology, Cambridge, 132:317-24, 1986.
- STIEFEL, E.I. The mechanisms of nitrogen fixation. In: NEWTON, W.; POSTGATE, J.K. & RODRIGUEZ-BARRUECO, C., eds. Recent Developments in Nitrogen Fixation. London, Academic Press, 1977. p. 69-108.
- STOWERS, M.D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 39:89-108, 1985.
- SUGANUMA, N. & YAMAMOTO, Y. Carbon metabolism related to nitrogen fixation in soybean root nodules. Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, 33:79-91, 1987.
- SWEENEY, G.C. Technology and economics of ammonia production. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J., eds. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation. Pullman, Washington State University Press, 1976. V.2., p. 648-55.
- THIBODEAU, P.S. & JAWORSKI, E.G. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. Planta, Berlin, 122:133-47,



- 1975.
- TJEPKEMA, J.D. & WINSHIP, L. Energy requirements for nitrogen fixation in actinohizal and legume root nodules. *Science*, London, 202:279-81, 1980.
- TJEPKEMA, J.D. & YOCUM, C.S. Respiration and oxygen transport in soybean nodules. *Planta*, Berlin, 115:59-72, 1973.
- TRUELSEN, T.A. & WINDAELE, R. Recycling efficiency in hydrogenase uptake positive strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 62:45-50, 1984.
- VAN STRATEN, J. & SCHMIDT, E.L. Diminution of acetylene reduction during assay of detached soybean nodules. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, 6:231-4, 1974.
- VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. p.3-6 (IBP Handbook, 15).
- VISSER, R. de. Efficiency of respiration and energy requirements of N assimilation in roots of *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 65:209-19, 1985.
- WALKER, C.C.; PARTRIDGE, C.D.P. & YATES, M.G. The effect of nutrient similation on hydrogen production by nitrogenase in continuous cultures of *Azotobacter chroococcum*. *The Journal of General Microbiology*, Cambridge, 124:317-27, 1981.
- WALKER, C.C. & YATES, M.G. The hydrogen cycle in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. *Biochimie*, Paris, 60:225-

- 31, 1978.
- WAREMBOURG, F.R. Estimating the true cost of dinitrogen fixation by nodulated plants in undisturbed conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 22:930-7, 1983.
- WAREMBOURG, F.R.; MONTANGE, D. & BARDIN, R. The simultaneous use of  $^{14}\text{CO}_2$  and  $^{15}\text{N}_2$  labelling techniques to study the carbon and nitrogen economy of legumes grown under natural conditions. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 56:46-55, 1982.
- WAREMBOURG, F.R. & ROUMET, C. Why and how to estimate the cost of symbiotic  $\text{N}_2$  fixation? A progressive approach based on the use of  $^{14}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  isotopes. *Plant and Soil*, Dordrecht, 115:167-77, 1989.
- WEIZ, P.R. & SINCLAIR, T.R. Regulation of soybean nitrogen fixation in response to rhizosphere oxygen. I. Role of nodule respiration. *Plant Physiology*, Rockville, 84:900-5, 1987a.
- WEIZ, P.R. & SINCLAIR, T.R. Regulation of soybean nitrogen fixation in response to rhizosphere oxygen. II. Quantification of gas permeability. *Plant Physiology*, Rockville, 84:906-10, 1987b.
- WINSHIP, L.J. & TJEPKEMA, J.D. Simultaneous measurement of acetylene reduction and respiratory gas exchange of attached root nodules. *Plant Physiology*, Rockville, 20:361-5, 1982.
- WINTER, H.C. & BURRIS, R.H.J. Stoichiometry of the adenosine

- triphosphate requirement for  $N_2$  fixation and  $H_2$  evolution by a partially purified preparation of *Clostridium pasteurianum*. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 243:940-4, 1968.
- WINTER, H.C. & BURRIS, R.H. Nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, 45:409-26, 1976.
- WITTY, J.F. & DAY, J.M. Use of  $^{15}N_2$  in evaluating symbiotic  $N_2$  fixation. In: *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation*. Vienna, IAEA, 1978. p.135-50. (Panel Proceedings Series).
- WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R. & SHEEHY, J.E. Carbon costs of nitrogenase activity in legume root nodules determined using acetylene and oxygen. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 34:951-63, 1983.
- WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E. & MINGUEZ, M.I. Acetylene induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase activity of legume root nodules. *Annals of Botany*, London, 53:13-20, 1984.
- WITTY, J.F.; SKOT, L. & REVSBECH, N.P. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to  $O_2$  diffusion. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 38:1129-40, 1987.
- WYCH, R.D. & RAINS, D.W. Nitrate absorption and acetylene reduction by soybeans during reproductive development. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 47:200-4, 1979.
- YATES, M.G. Biochemistry of nitrogen fixation. In:

- Biochemistry of plants, vol 5. New York, Academic Press, 1980. p. 1-63.
- YATES, M.G. The role of oxygen and hydrogen in nitrogen fixation. IN: COLE, J.A. & FERGUSON, S., eds. The nitrogen and sulfur cycles. Cambridge, Cambridge University Press, 1988. p. 383-416. (Society for General Microbiology Symposium, 42)
- ZABLOTOWICZ, R.M.; RUSSELL, S.A. & EVANS, H.J. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. *Agronomy Journal*, Madison, 22:555-9, 1980.