

FATORES QUE AFETAM A SIMBIOSE *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris*¹

ALAIDES PUPPIN RUSCHEL² e HERBERT W. REUSZER³

SINOPSE. - O trabalho traz uma contribuição ao estudo da simbiose *Rhizobium*-feijão, tendo como objetivos pesquisar: os efeitos causados à simbiose pela omissão de molibdênio e magnésio e adição de nitrogênio mineral na solução nutritiva e os efeitos causados pela inoculação do feijão com diferentes estirpes de *Rhizobium*. Coeficientes de correlação entre as diferentes variáveis foram calculados com a finalidade principal de relacionar o novo método de medir a atividade da nitrogenase nos nódulos pela redução do acetileno com o teor de nitrogênio da planta e o peso seco da mesma.

Foram feitos três experimentos em casa de vegetação, usando-se areia com solução nutritiva. De modo geral, os tratamentos consistiam na omissão de molibdênio, magnésio, ou ambos, com e sem nitrogênio na solução nutritiva de Crone. Foi usada a variedade Rico 23 em todos os experimentos.

Nos tratamentos em que foi omitido o molibdênio na solução nutritiva as plantas não apresentaram nenhuma modificação no peso seco, ou no peso de nódulos, porém, o nitrogênio percentual da parte aérea das mesmas foi menor em um experimento. A omissão de magnésio influenciou diminuindo o peso seco da parte aérea das plantas. As prováveis deficiências de molibdênio e magnésio no meio de cultura não mostraram nenhum efeito na atividade da nitrogenase medida através da redução do acetileno.

Correlação positiva foi encontrada entre os métodos da redução do acetileno e o teor de nitrogênio (total e percentual) da parte aérea, porém, não foi observada nenhuma correlação entre o acetileno reduzido pelos nódulos e o peso seco das plantas.

INTRODUÇÃO

O desconhecimento de fatores que afetam a fixação simbiótica de nitrogênio em feijão impede uma maior difusão da prática da inoculação nesta cultura. Controvérsias em torno desta simbiose praticamente cessaram quando Raggio *et al.* (1959), usando ¹⁵N, constataram a presença deste isótopo em nódulos mesmo depois de pequenos períodos de exposição àquele elemento (60 minutos), demonstrando que a fixação de nitrogênio realmente ocorria. Brakel e Manil (1965), estudando a inoculação de diferentes variedades de feijão em três solos, notaram um aumento de produção semelhante à adição de 50 kg/ha de nitrogênio em solo com baixo teor daquele elemento e observaram ainda que a nodulação foi abundante em todos os solos, não encontrando nenhum efeito significativo para variedades. O mesmo trabalho ainda demonstrou um efeito do nitrato na fixação simbiótica, porém, não na nodulação. O sucesso da inoculação depende da estirpe de *Rhizobium* e algumas vezes a inoculação com estirpes não eficientes pode prejudicar a produção (Brakel 1966), o que vem a sugerir ser o *Rhizobium*, às vezes, parasitário.

Freire *et al.* (1968) notaram que a inoculação trouxe benefícios à cultura do feijão em experimentos

de casa de vegetação, porém, pequena variação foi encontrada em condições de campo, o que vem a sugerir a existência de problemas na adaptação do *Rhizobium* às condições naturais.

A influência de micronutrientes é marcante não só no desenvolvimento da planta e bactéria como também na simbiose e tem sido estudada por diversos autores. Hewitt (1958), estudando nutrição mineral em leguminosas, mostrou que existe influência do molibdênio na planta hospedeira, havendo necessidade deste elemento para que se dê a fixação simbiótica de nitrogênio. Franco e Döbereiner (1967) observaram que o excesso de molibdênio reduziu mais a fixação de nitrogênio e a nodulação do que desenvolvimento da planta. O efeito do magnésio é mais acentuado sobre o *Rhizobium* do que sobre a simbiose propriamente dita. Burton *et al.* (1961) notaram que o feijão requer grande quantidade de cátions divalentes na adubação para um máximo de crescimento e uma melhor resposta à inoculação com o *Rhizobium*; no entanto, de acordo com Loneragan (1960), o magnésio limita o crescimento do *Rhizobium* no solo, exceto quando em concentrações que estão abaixo do limite para as necessidades da própria planta.

A presente pesquisa teve por finalidade estudar o efeito do nitrogênio, molibdênio e magnésio na inoculação de diferentes estirpes de *Rhizobium phaseoli* e consequentemente o efeito na fixação simbiótica de nitrogênio no feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitos três experimentos (Exp. 1, 2 e 3), em areia com solução nutritiva em casa de vegetação da Universi-

¹ Aceito para publicação em 11 abr. 1973.

² Trabalho realizado como parte da tese de M.Sc. do primeiro autor, na Universidade de Purdue, Indiana, E.U.A., em janeiro de 1972.

³ Eng.º Agrônomo, M.Sc., Chefe da Seção de Solos do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e Pesquisador B, bolsista, do Conselho Nacional de Pesquisas.

⁴ Professor, Ph. D., do Departamento de Agronomia da Universidade de Purdue, West Lafayette, Indiana, E.U.A.

dade Purdue, Indiana, E.U.A. Em linha geral foram adotados os mesmos métodos para os diferentes experimentos.

As sementes de feijão, da variedade Rico 23, procedentes de Vicosá, MG, foram inoculadas com as seguintes estirpes de *Rhizobium* mantidas em meio de cultura líquido: 127K14 e 127K17, da coleção da Cia. Nitragin (USA); F310 e F413, da coleção do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS); e Bean 84, da coleção da Urbana Laboratories (USA).

Dadas as dificuldades de serem feitas todas as análises de cromatografia de gás para todos os tratamentos no mesmo dia, as três repetições foram plantadas em três dias consecutivos, uma cada dia.

As plantas se desenvolveram em vasos com 2,5 kg de areia de sílica pura mais solução nutritiva de Crone modificada: cloreto de potássio (KCl) 10,0 g; sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2,5 g; sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2,5 g; e fosfato de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2,5 g. A diluição usada foi de 1,5 g da mistura de sais por 1.000 ml de água deionizada. 500 ml desta solução foram adicionados por vaso por ocasião do plantio e 250 ml aplicados 15 e 30 dias após. Depois de incorporados os macronutrientes, os vasos foram esterilizados em autoclave durante 6 horas consecutivas e após o resfriamento foi adicionado por vaso 1 ml da solução de Hoagland modificada, contendo os seguintes micronutrientes: ácido bórico (H_3BO_3) 2,86 g; sulfato de manganês ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1,55 g; sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,022 g; sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,08 g; ácido molibdic ($\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,008 g; cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,0008 g e água deionizada, 1.000 ml.

No centro de cada vaso havia um tubo de vidro (2 cm de diâmetro x 20 cm de altura) através do qual era feita a irrigação, sendo que a água chegava às diferentes partes do vaso por capilaridade.

Em todos os experimentos, os cotilédones foram removidos imediatamente após a germinação, cerca de quatro dias após o plantio, prática esta que teve o intuito de eliminar a contribuição de nutrientes dos cotilédones à planta.

Nos tratamentos com nitrogênio, 0,1 g de sulfato de amônio foi usado em solução aplicada três vezes, com um intervalo de 10 dias.

Todos os experimentos foram colhidos 40 dias após o plantio de cada repetição. As plantas eram retiradas cuidadosamente, lavadas as raízes, destacados e pesados os nódulos. Foram determinados o peso seco total e o peso seco da parte aérea após a secagem das plantas em estufa a 60°C. A análise de nitrogênio foi feita somente na parte aérea das plantas, usando-se o método de micro Kjeldahl: digestão em tubos de Pirex (18 x 2 cm de diâmetro), com 3,0 ml de ácido sulfúrico, 1,5 g de mistura catalítica 10:1:0,1 de sulfato de sódio, sulfato de cobre e selênio em pó, usando 0,3 g de material finamente pulverizado. O destilado foi recebido em ácido bórico e titulado com ácido sulfúrico.

A atividade da nitrogenase, enzima responsável pela fixação de nitrogênio no nódulo, foi medida pelo método da redução do acetileno, através da cromatografia de gás (Koch & Evans 1966, Hardy *et al.* 1968, Schwinghamer *et al.* 1970). Um grama de nódulos foi colocado em tubo de ensaio, onde o acetileno era injetado. Após

incubação de 50 minutos a quantidade de etileno era avaliada e comparada com curvas padrões previamente preparadas.

O delineamento experimental adotado para todos os ensaios foi o de blocos ao acaso.

No Exp. 1 os efeitos do molibdênio, magnésio e nitrogênio foram estudados, nos seguintes tratamentos repetidos três vezes: solução nutritiva mais micronutrientes sem nitrogênio (T); T menos molibdênio; T menos magnésio; T menos molibdênio e menos magnésio; T mais nitrogênio. Cada tratamento foi repetido com inoculação de duas estirpes (127K14 e F413).

No Exp. 2, somente a deficiência de molibdênio foi estudada em presença e ausência de nitrogênio. A inoculação foi feita com duas estirpes (127K17 e 127K14) nos seguintes tratamentos repetidos três vezes: solução nutritiva mais micronutrientes e sem nitrogênio (T); T menos molibdênio; T mais nitrogênio; T menos molibdênio mais nitrogênio.

No Exp. 3 foi estudado o efeito do nitrogênio e da inoculação com diferentes estirpes de *Rhizobium* nos seguintes tratamentos com três repetições: solução nutritiva mais micronutrientes e sem nitrogênio (T); T mais inoculação com estirpe 127K14; T mais inoculação com estirpe 127K17; T mais inoculação com estirpe F310; T mais inoculação com estirpe Bean 84.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Peso seco das plantas e peso vivo dos nódulos

Os Quadros 1, 2 e 3 mostram o peso seco das plantas (total e da parte aérea) e o peso vivo dos nódulos, respectivamente para os Experimentos 1, 2 e 3.

No Exp. 1, a adição de nitrogênio aumentou significativamente o peso seco das plantas (Quadro 1). O peso seco total das plantas não foi influenciado pela omissão de molibdênio e magnésio na solução nutritiva, no entanto, diferenças apareceram nos mesmos tratamentos com relação ao peso seco da parte aérea, sendo que a omissão de magnésio prejudicou mais a parte vegetativa das plantas que a omissão do molibdênio. Uma vez que não houve diferenças para o peso total das plantas, mas houve diferenças no peso seco da parte aérea, pode-se concluir que era mais desenvolvido o sistema radicular das plantas dos tratamentos com solução em que foram omitidos molibdênio e magnésio.

O peso de nódulos diminuiu na presença de nitrogênio, não havendo diferenças para os tratamentos em que foram omitidos o molibdênio e o magnésio (Quadro 1). Esta última observação está em desacordo com Hewitt (1968) e Anderson e Spencer (1950), os quais demonstraram que deficiências destes elementos resultavam na diminuição do número e do peso dos nódulos por planta. No presente caso, é possível que as plantas tenham absorvido molibdênio dos cotilédones embora estes tenham sido cortados logo após a germinação, ou então o absorveram de traços deste elemento incluídos nos demais componentes da solução nutritiva usada. Não foram observadas diferenças entre as estirpes inoculadas para nenhum dos fatores estudados.

QUADRO 1. *Peso seco das plantas e peso vivo dos nódulos de feijão inoculado com duas estirpes de Rhizobium e cultivado em solução nutritiva com variações de molibdênio, magnésio e nitrogênio (valores médios de três repetições do Exp. 1)*

Solução nutritiva	Peso seco das plantas						Peso vivo dos nódulos (g)		
	Raiz + p. aérea (g)			Parte aérea (g)					
	Estirpes		Médias ^a	Estirpes		Médias	Estirpes		Médias
	127K14	F413		127K14	F413		127K14	F413	
T ^b	2,96	3,20	3,08 b	1,64	1,94	1,79 b	1,17	1,38	1,27 a
T menos Mo	2,86	2,71	2,78 b	1,73	1,50	1,62 c	1,42	1,35	1,38 a
T menos Mg	3,15	2,88	3,01 b	1,40	1,56	1,48 d	1,21	1,19	1,20 a
T menos Mo e Mg	2,85	2,90	2,88 b	1,40	1,39	1,39 d	1,29	1,33	1,31 a
T mais N	3,70	3,96	3,83 a	1,87	2,17	2,02 a	0,38	0,46	0,42 b
Médias	3,10	3,12		1,61	1,71		1,09	1,14	

^a Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keul.

^b Solução de Crona sem nitrogênio e com micronutrientes.

QUADRO 2. *Peso seco das plantas e peso vivo dos nódulos de feijão inoculado com duas estirpes de Rhizobium e cultivado em solução nutritiva com variações de molibdênio e nitrogênio (valores médios de três repetições do Exp. 2)*

Solução nutritiva	Peso seco das plantas						Peso vivo dos nódulos (g)		
	Raiz + p. aérea (g)			Parte aérea (g)					
	Estirpes		Médias ^a	Estirpes		Médias	Estirpes		Médias
	127K17	127K14		127K17	127K14		127K17	127K14	
T ^b	2,10	1,93	2,01 b	1,15	1,03	1,09 b	1,43	1,14	1,28 a
T menos Mo	1,96	2,03	2,00 b	0,97	1,00	0,99 b	1,29	1,02	1,15 a
T mais N	3,00	3,30	3,21 a	1,82	2,03	1,92 a	0,23	0,26	0,24 b
T menos Mo mais N	3,46	3,33	3,40 a	2,12	1,95	2,03 a	0,36	0,45	0,40 b
Médias	2,65	2,66		1,51	1,50		0,83	0,72	

^a Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keul.

^b Solução de Crona sem nitrogênio e com micronutrientes.

QUADRO 3. *Peso seco das plantas por vaso e peso vivo dos nódulos de feijão inoculado, com quatro estirpes de Rhizobium e cultivado em solução nutritiva com e sem nitrogênio (valores médios de três repetições do Exp. 3)^a*

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Peso seco das plantas						Peso vivo dos nódulos (g)		
	Raiz + p. aérea (g)			Parte aérea (g)					
	Sem N	Com N	Médias	Sem N	Com N	Médias	Sem N	Com N	Médias
127K17	3,60	4,76	4,18	2,01	2,93	2,49	1,99 a	0,77 cd	1,48 a
127K14	3,13	4,53	3,83	2,08	2,88	2,48	1,77 ab	0,85 cd	1,31 a
F310	3,73	4,90	4,31	2,03	2,81	2,42	0,13 c	0,22 cd	0,18 b
Bean 84	3,93	5,36	4,65	2,24	3,21	2,72	2,42 a	1,23 bc	1,84 a
Médias	3,60 b	4,89 a		2,09 b	2,97 a		1,59 a	0,82 b	

^a Valores seguidos das mesmas letras não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keul.

QUADRO 4. Etileno produzido após exposição dos nódulos ao acetileno e níveis de nitrogênio, total e percentual, na parte aérea da planta do feijão inoculado com duas estirpes de *Rhizobium* e cultivado em solução nutritiva com variações de molibdênio, magnésio e nitrogênio (valores médios de três repetições do Exp. 1)^a

Solução nutritiva	Etileno/g de nódulos (μl)			Nitrogênio (%)			Nitrogênio total (mg)		
	Estirpes		Médias	Estirpes		Médias	Estirpes		Médias
	127K14	F413		127K14	F413		127K14	F413	
Tb	2,98	1,49	2,23	1,42	1,30	1,36 b	23,80 c	24,99 c	24,41 b
T menos Mo	4,65	4,89	4,77	1,19	1,49	1,34 b	21,04 c	22,23 c	21,63 b
T menos Mg	4,82	1,97	3,40	1,65	1,43	1,54 ab	22,76 c	22,77 c	22,76 b
T menos Mo e Mg	5,49	1,66	3,57	1,75	1,58	1,66 ab	24,84 c	22,38 c	23,61 b
T mais N	5,76	1,92	3,84	1,74	2,01	1,88 a	32,47 b	43,94 a	38,31 a
Médias	4,74 a	2,39 b		1,55	1,56		24,66	27,26	

^a Valores seguidos das mesmas letras não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keul.

^b Solução de Crone sem nitrogênio e com micronutrientes.

No Exp. 2, novamente a adição de nitrogênio aumentou o peso seco total e da parte aérea das plantas (Quadro 2). Não houve diferenças entre os tratamentos com omissão de molibdênio na solução nutritiva em presença ou ausência de nitrogênio. O peso vivo dos nódulos só foi menor nos tratamentos com nitrogênio, não havendo também diferenças entre as estirpes inoculadas.

No Exp. 3, o peso seco das plantas (peso total ou sem raízes) foi maior nos tratamentos com nitrogênio (Quadro 3). Diferença significativa entre estirpes de *Rhizobium* para a variável peso de nódulos foi constatada. O feijão inoculado com a estirpe F310 mostrou o menor desenvolvimento nodular, tanto na presença como na ausência de nitrogênio. A interação nitrogênio x estirpe foi significativa indicando um comportamento relativo diferente entre as estirpes na nodulação em presença ou ausência de nitrogênio. A diferença significativa para a variável massa nodular, entre os tratamentos com e sem nitrogênio refletiu a tendência de uma maior nodulação na ausência deste elemento.

Fixação simbiótica de nitrogênio

A fixação de N₂ foi estudada através de efeitos na redução de acetileno e teor de nitrogênio da planta.

Os Quadros 4, 5 e 6 mostram os resultados obtidos na redução do acetileno por grama de nódulos e as análises do nitrogênio percentual e total da parte aérea da planta, respectivamente para os Experimentos 1, 2 e 3.

Embora tenham sido observadas diferenças na quantidade de etileno produzido por grama de nódulos nos diversos tratamentos do Exp. 1, estas não foram estatisticamente significativas, devido ao elevado coeficiente de variação do mesmo (Quadro 4). Observou-se, porém, que os nódulos foram capazes de reduzir o acetileno, mesmo em tratamentos nos quais o nitrogênio esteve presente. Até tempos recentes a observação da fixação de N através da simbiose e em presença de nitrogênio mineral somente era possível através de técnicas refinadas qual seja o uso de ¹⁵N. Entretanto, o resultado aqui apresentado evidencia que o método de redução do acetileno pode bem avaliar o nitrogênio fixado simbioticamente mesmo na presença de nitrogênio. O experi-

mento possibilitou ainda a conclusão de que os nódulos da estirpe 127K14 produziram mais etileno do que aqueles da F413.

Havendo mais nitrogênio total das plantas no tratamento com adição de nitrogênio mineral, conclui-se que o nitrogênio fixado simbioticamente não foi suficiente para elevar o teor de nitrogênio da planta a níveis comparáveis com aqueles proporcionados pela adubação nitrogenada. Desde que não houve diferenças para os tratamentos nos quais o molibdênio e o magnésio foram omitidos, quando comparados com o tratamento testemunha, na ausência de nitrogênio, pode-se concluir que aquelas deficiências não foram totalmente severas para afetar a fixação de nitrogênio neste experimento.

A diferença para o nitrogênio total observada entre as plantas inoculadas com as estirpes 127K14 e F413, embora não significativa, mostrou uma tendência para maior teor de nitrogênio nas plantas com a estirpe F413. No entanto, foi a estirpe 127K14 que apresentou maior redução de acetileno por grama de nódulos.

Embora diferenças fossem observadas para o etileno produzido nos diferentes tratamentos no Exp. 2, estas não foram estatisticamente significativas devido ao alto coeficiente de variação deste ensaio (Quadro 5). Mais uma vez foi observado que nódulos destacados da planta em desenvolvimento em tratamentos com nitrogênio tiveram capacidade de reduzir o acetileno. Para nitrogênio percentual e total na planta somente foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com e sem nitrogênio, não havendo diferenças significativas para as comparações com e sem molibdênio na solução nutritiva.

No Exp. 3, adições de nitrogênio diminuíram o etileno produzido e aumentaram o nitrogênio da planta (Quadro 6), o que era de se esperar, uma vez que o nitrogênio mineral inibe parcialmente o processo da fixação simbiótica e é facilmente absorvido pelas plantas. Houve um efeito altamente significativo para o tratamento com a estirpe 127K14, o qual apresentou maior quantidade de etileno e maior teor de nitrogênio total e percentual na planta, porém, não apresentou maior peso seco (Quadro 3), o que pode sugerir que o nitrogênio fixado simbioticamente não foi eficientemente aproveitado no aumento do peso seco da planta.

QUADRO 5. Etileno produzido após exposição dos nódulos ao acetileno e teor de nitrogênio, total e percentual, na parte aérea da planta do feijão inoculado com duas estirpes de *Rhizobium* e cultivado em solução nutritiva com variações de molibdênio e nitrogênio (valores médios de três repetições do Exp. 2)^a

Solução nutritiva	Etileno/g de nódulos (μl)			Nitrogênio (%)			Nitrogênio total (mg)		
	Sem N	Com N	Médias	Sem N	Com N	Médias	Sem N	Com N	Médias
T ^b	6,34	11,08	8,72	1,76	2,03	1,90 b	20,49	21,60	21,04 b
T menos Mo	7,60	10,99	9,34	2,02	1,89	1,93 b	20,07	18,44	19,25 b
T mais N	9,50	4,02	6,76	2,50	2,53	2,51 a	45,21	51,56	48,39 a
T menos Mo mais N	2,84	3,09	2,96	2,43	2,42	2,43 a	51,35	46,87	49,11 a
Médias	6,57	7,29		2,18	2,20		34,28	34,62	

^a Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keul.
^b Solução de Crone sem nitrogênio e com micronutrientes.

QUADRO 6. Etileno produzido após exposição dos nódulos ao acetileno e teor de nitrogênio, total e percentual, na parte aérea da planta do feijão inoculado com quatro estirpes de *Rhizobium* e cultivado em solução nutritiva com e sem nitrogênio (valores médios de três repetições do Exp. 3)^a

Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Etileno/g de nódulos (μl)			Nitrogênio (%)			Nitrogênio total (mg)		
	Sem N	Com N	Médias	Sem N	Com N	Médias	Sem N	Com N	Médias
127K17	8,16	4,68	6,42 b	1,41 c	1,70 b	1,56 b	28,30 b	51,96 a	41,13 b
127K14	17,27	10,63	13,95 a	2,69 a	1,97 b	2,33 a	64,84 a	56,72 a	55,33 a
F310	4,61	0,81	2,71 b	1,30 c	1,81 b	1,56 b	38,10 b	51,15 a	38,63 b
Bean 84	1,77	0,96	1,36 b	1,34 c	1,82 b	1,58 b	30,16 b	58,50 a	48,84 b
Médias	7,95 a	4,27 b		1,69 b	1,82 a		34,85 b	54,11 a	

^a Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Student-Newman-Keul.

Comparações entre métodos na avaliação do nitrogênio fixado

O método da redução do acetileno apresentou grande sensibilidade, medindo diferenças na atividade da nitrogenase. Por outro lado, a medição da atividade da nitrogenase pouco pôde informar sobre o nitrogênio total fixado simbioticamente. De acordo com Schwinghamer *et al.* (1970), esta técnica poderia ser considerada como suplementar, não substituindo as medidas convencionais, tais como o teor de nitrogênio total e peso seco das plantas.

A análise dos coeficientes de correlação entre algumas das variáveis estudadas em todos os tratamentos sem nitrogênio dos Experimentos 1 a 3 acrescidos de dados de mais nove repetições com o mesmo sistema de cultivo e nas mesmas condições, perfazendo um total de 72 tratamentos (Quadro 7), veio demonstrar correlações positivas entre produção de etileno e nitrogênio encontrado

nas plantas (percentual e total); no entanto, correlação negativa foi constatada entre produção de etileno e o peso seco da parte aérea das plantas, não sendo observada nenhuma correlação entre etileno e peso seco total das plantas. Sendo negativa também a correlação entre o peso seco total e aquele da parte aérea da planta, pode-se concluir que o sistema radicular do feijão foi maior nas plantas maiores, daí a relação etileno vs peso seco da parte aérea ser negativa. Analisando-se o peso seco da planta em relação às demais variáveis estudadas, notou-se que apenas houve uma correlação significativa e negativa com o peso seco da parte aérea. Considerando-se que o peso seco da planta pode ser tomado como uma das medidas convencionais da eficiência da fixação simbiótica, os resultados do presente trabalho sugerem não ser a matéria seca do feijoeiro um fator que possa demonstrar qualquer efeito da fixação simbiótica de nitrogênio.

QUADRO 7. Correlação entre as diferentes variáveis estudadas nos tratamentos sem nitrogênio de todos os experimentos (57 repetições)^a

Variáveis	N total da p. aérea	Peso seco da p. aérea ^b	Peso seco da pl. inteira	Peso vivo dos nódulos	Etileno/g de nódulos
N % (parte aérea planta)	0,485	-0,370**	0,166	0,198	0,758**
N total (parte aérea planta)		0,579**	-0,206	-0,141	0,385**
Peso seco (parte aérea planta)			-0,352*	-0,381*	-0,283*
Peso seco (planta inteira)				-0,064	-0,088
Peso vivo dos nódulos					0,261*

^a Foram acrescidas 9 repetições cultivadas em idênticas condições.
^b * = significante a P = 0,05, ** = significante a P = 0,01.

REFERÊNCIAS

- Anderson, A.J. & Spencer, D. 1950. Molybdenum in nitrogen metabolism of legumes and non-legumes. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B. Sci.* 3:414-430.
- Brakel, J. 1966. La fixation symbiotique de l'azote chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bull. Res. Agron Gembloux* 1:525-533.
- Brakel, J. & Manil, P. 1965. Symbiotic fixation of nitrogen by the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). Inoculation trials with *Rhizobium phaseoli*. *Bull. Inst. agron. Stns Rech. Gembloux* 33:3-25.
- Burton, J.C., Vallen, O.N. & Berger, K.C. 1961. Effect of certain mineral nutrients on growth and nitrogen fixation of inoculated beans plants, *Phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Fd Chem.* 9:187-190.
- Franco, A.A., & Döbereiner, J. 1967. Especificidade da hospedeira na simbiose do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e a influência de diferentes nutrientes. *Pesq. agropec. bras.* 2:467-474.
- Freire, J.R.J., Goepfert, C.P. & Vidor, C. 1968. Alguns fatores limitantes da fixação de nitrogênio e produtividade das leguminosas do Rio Grande do Sul, p. 9-16. In Primavesi, A. (coord.) *Progressos em Biodinâmica e Produtividade do Solo*. Univ. Fed. Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- Hardy, R.W.F., Holtein, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assays for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Pl. Physiol., Lancaster*, 43:1183-1207.
- Hewitt, E.J. 1958. Some aspects of mineral nutrition in legumes. p. 15-43. In Hallsworth, E.G. (ed.), *Nutrition of legumes*. Academic Press, New York.
- Koch, B., & Evans, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Pl. Physiol., Lancaster*, 41: 1748-1750.
- Loneragan, J. 1960. Pasture legume in Tasmania. The legume *Rhizobium* symbiosis. *J. aust. Inst. agric. Sci.* 26:26-31.
- Raggio, N., Raggio, M. & Burris, R.H. 1959. Nitrogen fixation by nodules formed on isolated bean roots. *Biochim. biophys. Acta* 32:274-275.
- Schwinghamer, E.A., Evans, H.J. & Dawson, M.D. 1970. Evaluation of the effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of N_2 fixation. *Pl. Soil* 33:192-212.

ABSTRACT.- Ruschel, A.P.; Reuszer, H.W. [*Factors affecting Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris symbiosis.*]. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia* (1973) 8, 287-292 [Pt, en] IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil.

The objectives of this study were to determine the effect of molybdenum and magnesium removal from nutrient solution and combined nitrogen additions on the *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris* symbiosis; to study the effect of different *Rhizobium* strain inoculants; to identify any possible correlation between different variables studied; and to relate the acetylene reduction assay to the common method of evaluating nitrogen fixation by legumes by measuring total nitrogen in plants using the Kjeldahl method, and through dry weight of plants.

The study was conducted in a greenhouse (3 experiments) at Purdue University, Indiana, U.S.A. The main treatment consisted of withholding molybdenum, magnesium, or both, from free Crone's solution plus micronutrients, or adding combined nitrogen to culture media. The variety "Rico 23", from Brazil, was used. Plants 40 days old were harvested in all experiments.

Combined nitrogen added to nutrient media in the different experiments increased the dry weight of plants, percent and total nitrogen in the plant tops, but decreased the weight of nodules and the amount of acetylene reduced to ethylene by excised nodules. Nodules produced by one strain of *Rhizobium* demonstrated high nitrogenase activity even in treatments with nitrogen.

Removal of molybdenum from nutrient solution did not affect dry weight of plant, or nodule weight, but decreased percent of nitrogen of plant tops. Neither molybdenum nor magnesium removal from nutrient solution influenced nitrogen fixation by different strains of *Rhizobium* used when measured by the acetylene reduction assay or amount of nitrogen in plant tops.

In the absence of combined nitrogen the ethylene produced by nodules was positively correlated with both total and percent nitrogen in plant tops, and with the fresh nodule weight, while negative correlations between dry weight of plant tops and other variables (dry weight of entire plant, fresh nodule weight, and acetylene reduced) were found. There was no correlation between acetylene reduction by nodule tissue and the dry weight of entire plant.