

ISSN 0104-866X

Agosto, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio-Norte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## **Documentos 197**

# **Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos**

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara  
Adelson Paulo de Araújo  
Gustavo Ribeiro Xavier  
Maurisrael de Moura Rocha  
Norma Gouvêa Rumjanek*

Embrapa Meio-Norte  
Teresina, PI  
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Meio-Norte**

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires,  
Caixa Postal: 01  
CEP 64006-220 Teresina, PI.  
Fone: (86) 3089-9100  
Fax: (86) 3089-9130  
Home page: [www.cpamn.embrapa.br](http://www.cpamn.embrapa.br)  
Email: [sac@pamn.embrapa.br](mailto:sac@pamn.embrapa.br)

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Flávio Flavaro Blanco*,  
Secretária Executiva: *Luísa Maria Resende Gonçalves*  
Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio Mendonça Diniz, Cristina  
Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro  
Azevêdo, Carlos Antônio Ferreira de Sousa, José Almeida Pereira e Maria  
Teresa do Rêgo Lopes*

Supervisor editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*  
Revisor de texto: *Lígia Maria Rolim Bandeira*  
Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*  
Editoração eletrônica: *Jorimá Marques Ferreira*  
Foto da capa: *Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara*

**1ª edição**

1ª impressão (2009): 300 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Meio-Norte

---

Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos / Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara ... [et al.] - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2009.  
27 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 197).

1. Leguminosa com grão. 2. Genótipo. 3. Nódulo. 4. Fixação de nitrogênio. I. Alcantara, Rosa Maria Cardoso Mota de. II. Embrapa Meio-Norte. III. Série.

CDD 633.3 (21. ed.)

© Embrapa, 2009

---

## **Autores**

### **Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara**

Engenheira agrônoma, M.Sc. em Agronomia,  
pesquisadora da Embrapa Meio-Norte e doutoranda  
do Curso de Agronomia, Ciência do Solo - UFRRJ,  
Teresina, PI  
rmaria@cpamn.embrapa.br

### **Adelson Paulo de Araújo**

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Agronomia, Ciência  
do Solo, professor da Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro.  
aparaujo@ufrj.br

### **Gustavo Ribeiro Xavier**

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Ecologia Microbiana  
Molecular, pesquisador da Embrapa Agrobiologia,  
Seropédica, RJ  
gustavo@cnpab.embrapa.br

---

---

---

### **Maurisrael de Moura Rocha**

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas,  
pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI  
mmrocha@cpamn.embrapa.br

### **Norma Gouvêa Rumjanek**

Bioquímica farmacêutica, Ph.D. em Clínica Farmacêutica, pesquisadora da  
Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ  
norma@cnpab.embrapa.br



---

# Apresentação

O nitrogênio é um nutriente que está presente em várias reações metabólicas do ciclo de vida de todos os seres vivos, o que lhe confere o status de altamente imprescindível a animais e vegetais.

Grande parte das espécies de plantas da família Fabaceae (Leguminosae) associa-se a um tipo especial de bactéria e desenvolve a atividade de fixação do nitrogênio da atmosfera, onde ele se encontra em proporção relativamente alta, incorporando-o à biomassa vegetal. Esse fenômeno tem grande importância para os sistemas agrícolas, pois reduz a dependência de insumos externos e contribui para a melhoria da qualidade ambiental.

Para se ter uma ideia da importância da fixação de nitrogênio atmosférico, estudos demonstram que em feijão-caupi o processo responde por cerca de 40 % a 90 % do total de nitrogênio presente nas plantas, onde forma as proteínas e, posteriormente, será incorporado às proteínas dos animais. No entanto, alguns fatores limitam a eficiência do processo de fixação do nitrogênio, como fatores climáticos, fatores do solo e fatores relacionados às plantas, com destaque para o ciclo das culturas. Esta publicação enfatiza a relação entre o ciclo das culturas e a vida útil dos nódulos, ou seja, a eficiência do processo de fixação de nitrogênio.

*Hoston Tomás Santos do Nascimento*

Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

---

# Sumário

<b>Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos ....</b>	9
<b>Introdução .....</b>	9
<b>Contribuição da FBN por culturas de diferentes ciclos .....</b>	11
<b>A senescência dos nódulos como fator limitante da FBN em genótipos de ciclo curto .....</b>	14
<b>Mecanismos da senescência precoce dos nódulos</b>	17
<b>Considerações finais .....</b>	23
<b>Referências .....</b>	24

# Relações entre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e a duração do ciclo de diferentes genótipos de cultivos de leguminosas de grãos<sup>1</sup>

---

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara  
Adelson Paulo de Araújo  
Gustavo Ribeiro Xavier  
Maurisrael de Moura Rocha  
Norma Gouvêa Rumjanek*

## Introdução

As principais reações bioquímicas que ocorrem nas plantas envolvem a presença do nitrogênio (N), elemento constituinte de vários compostos vegetais, como os aminoácidos, os ácidos nucleicos e a clorofila. Pela grande versatilidade nas reações de oxirredução, estando presente em vários estados de oxidação, desde formas reduzidas como o  $\text{NH}_4^+$  até oxidadas como o  $\text{NO}_3^-$ , o N possui especial importância nos ciclos biogeoquímicos e no metabolismo das plantas.

O N é um elemento químico abundante na atmosfera, onde é encontrado na sua forma mais estável ( $\text{N}_2$ ) e, portanto, indisponível para a maioria dos organismos, animais e vegetais. Essa estabilidade deve-se à presença de uma forte ligação tríplice entre as duas moléculas de N. Apenas algumas

---

<sup>1</sup>Trabalho de revisão apresentado pela primeira autora, no exame de qualificação do Curso de Doutorado em Agronomia Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

espécies de bactérias, que formam um grupo de organismos unicelulares e procariotos que possuem a enzima nitrogenase, são capazes de realizar a redução do  $N_2$  a  $NH^{+3}$ , forma inorgânica combinada. Esse processo biológico é denominado de fixação biológica do nitrogênio - FBN.

A FBN desempenha um papel importante no aporte de nitrogênio nos sistemas agrícolas. Existem estimativas de que, no mundo, esse processo contribua com 32 Tg ano<sup>-1</sup> de N em áreas cultivadas. No Brasil, a FBN contribui com cerca de 7,3 Tg ano<sup>-1</sup> de N, ou seja, quase três vezes a quantidade de N de fertilizantes industriais (2,5 Tg ano<sup>-1</sup>), sendo que só a cultura da soja representa 3,2 Tg ano<sup>-1</sup> de N (FILOSO et al., 2006).

O processo de FBN pode ser afetado por fatores biológicos, químicos e físicos, que interferem na simbiose mutualista. Dessa forma, a ausência de nodulação ou nodulação ineficiente em determinada espécie sob determinadas condições edáficas e ambientais, é proveniente de fatores que limitam o estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nas leguminosas, os fatores limitantes da simbiose estão relacionados às características intrínsecas da espécie hospedeira, aos fatores climáticos, às condições edáficas e à população nativa de rizóbios.

Com relação à espécie hospedeira, entre as espécies nodulíferas existe ampla variação com relação ao potencial de fixação biológica, que pode ser classificado como baixo, médio e alto. Há relatos de que em condições idênticas *Leucaena leucocephala* pode fixar 400 a 900 kg de N ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup> enquanto que *Canavalia ensiformis* apenas 57 a 190 kg de N ha<sup>-1</sup>ano<sup>-1</sup> (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa diferente proporção de N fixado pode ser afetada pelo genótipo da planta, duração do ciclo da cultura, nodulação tardia e senescência precoce dos nódulos.



## Contribuição da FBN por culturas de diferentes ciclos

Em contraste com outras leguminosas, como o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e a soja (*Glycine max* (L.) Merr.), o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta uma baixa capacidade de fixação biológica de N, sendo geralmente recomendada a fertilização com adubos químicos. O baixo desempenho simbiótico do feijão-comum tem sido atribuído às características inferiores de fixação de N das cultivares modernas e a limitação de estabelecer nódulos efetivos nas condições ambientais em que é cultivado (VARGAS et al., 2004).

O processo da FBN no feijão difere em alguns aspectos daquele observado na soja, principalmente considerando-se que sendo o feijoeiro uma planta originária das Américas, é natural que sejam encontradas, no solo, estirpes nativas de rizóbio que competem com os sítios de infecção nodular com as estirpes introduzidas. Esse fato contribui para a limitação do sucesso da inoculação do feijão (URQUIAGA et al., 2005).

Outros fatores limitantes observados para a FBN no feijão têm sido a baixa fertilidade dos solos, as altas temperaturas dos trópicos e o curto ciclo da cultura. O feijão se caracteriza pela rápida senescência dos nódulos com consequente redução significativa da FBN logo após a floração. Nesse aspecto, a pesquisa científica vem selecionando novas estirpes de *Rhizobium* de nodulação mais lenta e senescência de nódulos mais tardias (URQUIAGA; ZAPATA, 2000).

Com relação à limitação da FBN no feijão, outro fator limitante comprovado é que a planta hospedeira não afeta apenas a atividade da nitrogenase, mas também a velocidade da senescência dos nódulos. As cultivares Carioca e Negro Argel, muito plantadas no Brasil por apresentarem alto rendimento e alta eficiência de FBN, têm apresentado os mais longos períodos de fixação (URQUIAGA et al., 2005).

VARGAS et al. (2004) citam ainda como fatores limitantes do processo da FBN em feijão, além da grande variabilidade genética que existe entre as

cultivares do feijão em relação ao potencial de FBN, as características genéticas da bactéria fixadora de  $N_2$ . Essas características podem levar à perda da capacidade de fixar e até mesmo de nodular da bactéria.

A combinação de todos esses fatores resulta no fato de que no feijoeiro, a inoculação com bactérias fixadoras de  $N_2$  nem sempre é suficiente para fornecer todo o N exigido pela cultura. No entanto, apesar de todas as limitações, vários resultados recentes indicam que o feijão pode beneficiar-se consideravelmente do processo biológico, sobretudo porque os inoculantes incluem estirpes mais eficientes que as nativas (VARGAS et al., 2004).

Trabalhos realizados na década de 80 (HUNGRIA; THOMAS, 1987; PIHA; MUNNS 1987a, 1987b; SPRENT; THOMAS, 1984;), sobre a avaliação do potencial de fixação do N em feijão-comum, indicaram que havia um período inicial de deficiência de N, devido à falta de sincronização do esgotamento das reservas dos cotilédones da planta hospedeira e o início da fixação e exportação do  $N_2$  fixado pelos nódulos. Consideraram também que apesar do ciclo curto, o feijoeiro nodulado poderia acumular N em quantidades comparáveis às plantas que recebiam N mineral.

Os resultados de pesquisa recentes com FBN em feijão-comum têm revelado a possibilidade de melhoramento da cultura e seleção de estirpes de *Rhizobium* para nodulação lenta e senescência tardia dos nódulos. Essa possibilidade vislumbra o sucesso da fixação aliado ao curto ciclo da cultura (URQUIAGA; ZAPATA, 2000).

A cultura da soja, em contraste ao feijão, apresenta resultados satisfatórios em relação à FBN. Os fatores que limitam a FBN no feijoeiro não se manifestam com a cultura da soja, principalmente aqueles relacionados ao ciclo da cultura. Os melhores resultados com a FBN em soja têm sido obtidos no Brasil, onde são cultivados 18 Mha, com rendimento de 2.798 kg  $ha^{-1}$  de grãos, sem aplicação de N-fertilizante (URQUIAGA et al., 2005).

Para alcançar os níveis esperados de FBN no cultivo da soja, intensos trabalhos de pesquisa foram realizados e o maior desafio foi expandir seu

cultivo para a região dos Cerrados, onde os solos são ácidos e pobres em nutrientes. Esse desafio foi superado, graças ao melhoramento genético e à obtenção de novas estirpes de *Bradyrhizobium* e atualmente, a região produz cerca de 43 % do que é produzido em todo o Brasil (URQUIAGA et al., 2005).

Em virtude do lançamento de novas variedades de soja de alta capacidade produtiva, um dos principais objetivos dos programas de pesquisa em FBN tem sido a seleção de estirpes com elevados níveis de eficiência fixadora, capazes de aumentar a produtividade da cultura por meio da fixação de quantidades mais elevadas de  $N_2$  (VARGAS et al., 2004).

Com relação ao feijão-caupi, a FBN é reconhecidamente eficiente, sendo que este quando bem nodulado dispensa outras fontes de N, podendo atingir altos níveis de produtividade. Segundo Rumjanek et al. (2005), estimativas da contribuição da FBN no campo são bastante variáveis, tendo sido obtidos valores numa faixa de 40 % a 90 % do total de N acumulado pelo feijão-caupi. Essa variabilidade pode ser atribuída aos níveis de N disponível no solo, bem como às diferenças tanto no genótipo da planta, como no do rizóbio.

De acordo com Araújo, Carvalho e Alcantara (2006), trabalhos realizados em países tropicais mostraram a ocorrência da variação na eficiência das estirpes de rizóbio quanto à capacidade de fixar N no feijão-caupi. No Brasil, as informações também são divergentes, em razão das diferentes condições de clima e solo, as quais afetam a estirpe, a planta hospedeira, a nodulação e a própria fixação de  $N_2$ .

A eficiência da fixação de N depende muito do genótipo da planta, portanto, a seleção e o melhoramento de cultivares de feijão-caupi para otimizar a FBN pode proporcionar aumentos de produtividade, principalmente quando realizada com estirpes selecionadas quanto à eficiência e à competitividade (RUMJANEK et al., 2005).

## **A senescência dos nódulos como fator limitante da FBN em genótipos de ciclo curto**

A senescência precoce dos nódulos é um fator limitante da fixação de  $N_2$ . Considera-se que logo após o florescimento ocorre uma queda na atividade da nitrogenase e que os fatores ambientais, como temperatura e umidade, exercem um papel muito importante na senescência. Existe, porém, uma grande variabilidade no grau de senescência dos nódulos que depende do ciclo da cultura.

A senescência dos nódulos tem sido estudada sob diferentes condições ambientais adversas tais como desfoliação (MÜLLER; BOLER; WIEMKEN, 2001), supressão de luz (GOGORCENA et al., 2005), presença de nitrato (VOISIN et al., 2002), alta concentração de NaCl (TRINCHANT et al., 2004), excesso de contaminantes (BALESTRASSE; GALLEGRO; TOMARO, 2004), deficiência de água e inundação (GOGORCENA et al., 2005).

Segundo Alessandrini et al. (2003a), a senescência dos nódulos compreende um período no qual a atividade da nitrogenase residual é perdida, ocasionando um rápido declínio na FBN. É considerada como um processo bioquímico e fisiológico que requer transcrição de novos genes iniciando com o estágio final de maturação e concluindo com a degeneração dos nódulos (HOWARD et al., 2003).

Tem sido sugerido que a senescência dos nódulos poderia ser uma reação da planta hospedeira contra o estabelecimento do rizóbio (PUPPO et al., 2005). Alguns autores indicam que a senescência dos nódulos coincide com a senescência das raízes (FISHER; EISSENSTAT; LYNCH, 2002), ou com a senescência da planta (TIMMERS et al., 2000).

Conforme Puppo et al., (2005), em algumas espécies, sob condições estressantes, a senescência dos nódulos ocorre naturalmente no começo

da antese devido à síntese de sinais generalizados na parte aérea ou durante o enchimento dos grãos. O que sugere que em genótipos de ciclo curto a senescência ocorre mais cedo diminuindo o período ativo da FBN.

No entanto, estudos realizados com feijão-comum revelaram que o início da senescência dos nódulos varia entre cultivares e não está relacionado com o estágio fenológico da planta hospedeira (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2008a). Dados similares já haviam sido anteriormente obtidos por Espinosa-Victoria, Vance e Graham (2000) com soja, os quais concluíram que o início da senescência poderia também variar em função da estirpe da bactéria.

Em estudo anterior foi considerado que a estirpe de rizóbio poderia também afetar a taxa de senescência pela produção de substâncias promotoras de crescimento, compostos nitrogenados e polissacarídeos, transportados para a célula hospedeira (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2000).

Particularmente, os nódulos das raízes das leguminosas são caracterizados pela senescência precoce em relação a outros órgãos e essa senescência em genótipos de ciclo curto ocorre mais precocemente (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2008b). A senescência ocorre de forma heterogênea em razão da população de nódulos apresentar heterogeneidade em relação à idade. No caso da soja, os nódulos mais velhos são aqueles formados na raiz principal e, portanto, são os primeiros a senescerem (ESPINOSA-VICTORIA; VANCE; GRAHAM, 2000).

A senescência dos nódulos é geneticamente controlada, no entanto os programas de melhoramento genético estão focados mais em variedades mais produtivas, o que origina uma lacuna no desenvolvimento de cultivares com senescência tardia, principalmente em cultivares de ciclo curto (MITRA; SHAW; LONG, 2004).

Existem poucos estudos para o entendimento da genética do controle da senescência dos nódulos (FEDOROVA et al., 2002). Em estudos realizados sobre os fatores responsáveis pela senescência (HERNANDEZ-JIMENEZ; MERCEDES LUCAS; ROSARIO DE FELIPE, 2002; MATAMOROS et al., 2003), foi constatado que o controle do período ativo do nódulo é realizado por sinais moleculares da parte aérea e da raiz.

Esse período depende do ciclo da cultura e da precocidade da senescência. Em ervilha, a taxa máxima da fixação de nitrogênio ocorre muito cedo, em torno de três semanas, enquanto que a diminuição da leghemoglobina e a degradação da proteína com conseqüente senescência dos nódulos, ocorrem mais tarde, em torno de nove a doze semanas. De forma similar, em feijão comum a senescência ocorre em torno de 11 semanas (PUPPO et al., 2005).

Além da relação com o ciclo da cultura, a senescência está associada à capacidade da cultura em resistir aos estresses ambientais. Essa evidência sugere que o balanço simbiótico existente nos nódulos das leguminosas é tão susceptível aos estresses abióticos, quanto menor for a resistência da planta a esses fatores.

## **Mecanismos da senescência precoce dos nódulos**

A senescência precoce dos nódulos com o consequente rápido declínio na fixação de  $N_2$ , coincidindo com o começo do enchimento das vagens, tem sido observada em várias leguminosas, tais como soja, ervilha e feijão-comum.

Da mesma forma que a senescência das folhas, a senescência dos nódulos, é um processo altamente organizado e dependente dos fatores relacionados à idade. Porém a longevidade dos nódulos é também determinada por fatores ambientais e estressantes. A elevada disponibilidade de nitrato, altas temperaturas, solos ácidos, ação de patógenos nas raízes e seca induzem à ocorrência precoce da senescência (GROTEN et al., 2006).

A senescência dos nódulos tem grande similaridade com o processo de senescência das folhas, sendo ambas influenciadas por estresses e por desbalanço hormonal. No entanto, a senescência da folha é reversível de acordo com a necessidade da planta (FERGUSON; MATHESIUS, 2003).

Nesse contexto, existem evidências de que reguladores de desenvolvimento e diferenciação das plantas estejam relacionados com o desenvolvimento e senescência dos nódulos, da mesma forma que ocorre com as folhas (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO et al., 2008b).

Durante o processo de senescência ocorrem mudanças visíveis nos nódulos, como por exemplo, a mudança de cor dos tecidos que passam de vermelho (indicativo da presença de leghemoglobina) para verde. Ocorrem também mudanças na organização das estruturas celulares. Em soja, aparecem numerosas vesículas no citoplasma dos nódulos senescentes, enquanto que os simbiossomas mudam de tamanho e forma com a deterioração dos bacteróides (PUPPO et al., 2005).

A degradação das proteínas nos nódulos durante a senescência ocorre primeiramente no tecido simbiótico da planta. As enzimas proteolíticas estão geralmente associadas com o processo de morte da célula durante a senescência e na diferenciação dos componentes celulares (JONES, 2001).

A membrana peribacteróide é quem regula as trocas metabólicas entre os parceiros da simbiose leguminosa-rizóbio. Tem sido observado que durante os estádios iniciais da senescência dos nódulos ou quando a planta nodulada é submetida a estresse de nitrato a membrana peribacteróide é uma das primeiras estruturas a ser degradada. Essa degradação ocorre paralelamente à perda da capacidade de fixação de nitrogênio. A senescência seria consequência da falta de regulação da troca de sinais e metabólitos entre os parceiros (PUPPO et al., 2005).

Segundo Hernandez-Jimenez, Mercedes Lucas e Rosario de Felipe (2002) a primeira evidência da senescência dos nódulos, em soja, feijão-francês e alfafa é a degradação da membrana peribacteróide, porém em outras leguminosas, como tremoço, a ruptura da membrana só ocorre em um estágio mais avançado da senescência.

A perda da atividade de fixação de N ocorre em paralelo com a diminuição da leghemoglobina durante a senescência natural dos nódulos de soja, feijão-francês e feijão-mungo. Porém, em ervilha, foi observado que um rápido decréscimo da fixação de N ocorre antes da diminuição da leghemoglobina, quando a cultura é submetida a um fator de estresse (PUPPO et al., 2005).

Segundo Muglia et al. (2008) durante a senescência, ocorre diminuição dos níveis de fixação de nitrogênio e aumento das reações oxidativas, devido ao decréscimo dos antioxidantes e da leghemoglobina, que em virtude da oxidação apresenta pigmentos verdes. Além disso, são observados danos oxidativos dos lipídios, DNA e proteínas (MATAMOROS et al., 2003).



Durante o final do processo da senescência dos nódulos ocorrem mudanças na atividade das proteínas, por causa da intensa remobilização. Da mesma forma que a senescência das folhas e flores, a senescência dos nódulos é caracterizada por uma diminuição de proteínas solúveis. Conforme Palma et al. (2002) com a evolução da senescência, várias enzimas hidrolíticas são ativadas e a cisteína protease tem importante papel no processo.

A relação entre estresse oxidativo e senescência dos nódulos foi observada por Balestrasse, Gallego e Tomaro (2004) em soja. Os autores verificaram que a indução de altas concentrações de cádmio resultou em estresse oxidativo, o qual foi identificado pelo aumento do ácido tiobarbitúrico e pela diminuição dos níveis de leghemoglobina. Consequentemente, a atividade da nitrogenase foi reduzida e os parâmetros da senescência dos nódulos, como produção de etileno, incremento do nível de amônio e aumento da atividade da cisteína protease foram simultaneamente observados.

ALESSANDRINI et al. (2003a), estudando a função da cisteína protease e do peróxido de hidrogênio no desenvolvimento e senescência dos nódulos de soja, observaram que após cinco semanas de emergência das plantas, quando a fixação de N<sub>2</sub> começou a diminuir, o gene da cisteína protease começou a se expressar na periferia e no centro do tecido infectado.

Esses autores verificaram também que, concomitantemente ao aumento da cisteína protease, havia acúmulo de peróxido de hidrogênio na periferia e no centro do tecido infectado. Com sete semanas, a zona de expressão da cisteína protease e o acúmulo do peróxido de hidrogênio haviam aumentado no centro do nódulo e na décima semana, a expressão do gene da cisteína protease foi observada em todo tecido infectado central, associada ao acúmulo de peróxido de hidrogênio no citoplasma e nos compartimentos do apoplasto.

Essas observações indicaram uma possível ligação entre a cisteína protease e a senescência de nódulos, considerando que a expressão do gene estava associada à zona de necrose (ALESSANDRINI et al., 2003a).

Groten et al. (2005) observaram em ervilha que a senescência dos nódulos ocorreu três semanas após a germinação, ao mesmo tempo em que diminuíram os níveis de ascorbato, glutatona e de leghemoglobina nos nódulos. As diminuições nas proteínas dos nódulos ocorreram ao mesmo tempo em que houve diminuição de proteínas nas folhas, sugerindo que existe uma coordenação de eventos nas raízes e na parte aérea.

Os resultados obtidos por Groten et al. (2006) ilustram que a senescência é regulada pelo declínio de antioxidantes celulares, tais como o ascorbato e que estes devem ter um papel regulatório no desenvolvimento dos nódulos. Puppo et al. (2005) já haviam concluído que a exposição ao estresse resulta em mudanças nos níveis de antioxidantes, particularmente glutatona e ascorbato, os quais afetam o número e a estabilidade dos nódulos.

De acordo com Muglia et al. (2008) a glutatona contribui com os mecanismos de proteção contra a senescência precoce dos nódulos, limitando o acúmulo de superóxidos.

Diversos mecanismos de proteção das reações oxidativas nos nódulos têm sido descritos, os quais incluem enzimas como dismutases, catalases e peroxidases (MUGLIA; GRASSO; AGUILAR, 2007). O ascorbato e a glutatona desempenham ação específica na senescência. Diferentes linhas de pesquisas demonstraram que a glutatona produzida tanto pela bactéria, como pela planta desempenham importante papel no estabelecimento da manutenção da simbiose e conseqüentemente

contribuem para a senescência tardia (FRENO et al., 2005; GROTEN et al., 2005; HARRISON et al., 2005; MATAMOROS et al., 2003; MORAN et al., 2000).

Alessandrini et al., (2003b) observaram, também, que em espécies com nódulos determinados, como soja, feijão comum e feijão-caupi, a senescência começa no centro do nódulo. Durante a senescência do nódulo ocorre um estresse oxidativo com aumento de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos de lipídios.

O envolvimento das poliaminas no desenvolvimento e funcionamento dos nódulos tem sido verificado em várias leguminosas. No entanto, apesar de ser conhecido o papel das poliaminas na fixação de  $N_2$ , por meio de sua associação com a membrana simbiótica (WISNIEWSKI et al., 2000), as informações sobre sua função na senescência dos nódulos ainda são escassas, embora esteja comprovado que o conteúdo de aminas varia entre os diferentes genótipos das espécies durante a senescência.

Lahiri, Chattopadhyay e Ghosh (2004) compararam, em condições de campo, os níveis de poliaminas endógenas livres, nitrogenase e leghemoglobina em cinco genótipos de *Vigna mungo*, durante o desenvolvimento dos nódulos. Observaram que a nitrogenase e a leghemoglobina atingiam nível máximo no estágio de floração e gradualmente começavam a decrescer após esse período.

Idêntico padrão foi apresentado, nesse estudo, para conteúdo de poliaminas, os quais apresentaram correlações significativas com os níveis de nitrogenase e leghemoglobina. Os autores concluíram que havia uma forte relação entre a senescência dos nódulos e o teor de poliaminas e sugeriram que o acentuado decréscimo poderia ser uma razão para o aparecimento da síndrome de senescência dos nódulos.

Tem sido observado que leguminosas de ciclo curto desenvolvem nódulos com pequeno período de vida ativo (PUPPO et al., 2005). No entanto, segundo Barsch et al. (2006), o intrincado mecanismo que controla a manutenção da simbiose, bem como a senescência dos nódulos não são ainda bem compreendidos.

Em contraste com a senescência foliar e cotiledonar, onde numerosos genes com função conhecida já foram caracterizados, na senescência do nódulo até 2001 não havia ainda um marcador molecular específico (YOSHIDA et al., 2001). Alessandrini et al. (2003b) em estudo de isolamento de um marcador molecular da senescência de nódulos de soja, confirmaram com expressão diferencial três clones (DD8, DD10 e DD15) e concluíram que o DD15 poderia se constituir em um bom marcador da senescência dos nódulos.

Vários são os mecanismos envolvidos na senescência precoce dos nódulos e aliada à nodulação tardia, a senescência dos nódulos constitui-se em um dos fatores que mais limitam a fixação de  $N_2$ , principalmente nas culturas de ciclo curto. A maioria dos estudos indica que a senescência precoce está relacionada principalmente ao hospedeiro, mas há relatos de que o rizóbio também possa influenciar o processo.

## **Considerações finais**

O processo de fixação biológica do nitrogênio pode ser afetado por fatores biológicos, químicos e físicos que interferem na simbiose. Nas leguminosas, os fatores limitantes da simbiose estão relacionados às características intrínsecas da espécie hospedeira, à população nativa de rizóbios e aos fatores bióticos e abióticos.

Com relação às características da espécie hospedeira, existe ampla variação no potencial da FBN. Entre as características do hospedeiro que afetam a fixação biológica do nitrogênio, a duração do ciclo da cultura tem sido apontada como um fator limitante.

Genótipos de ciclo longo (maturação tardia) são mais eficientes na fixação de N do que aqueles de ciclo curto (maturação precoce) e nestes últimos, a nodulação tardia e a senescência precoce dos nódulos parecem ser as principais causas da menor contribuição da FBN.

Para essa limitação tem sido sugerido o prolongamento do período ativo de fixação por meio da busca de combinações simbióticas com nodulação e fixação precoces e retardamento da senescência dos nódulos.

## Referências

ALESANDRINI, F.; FREND, P.; PUPPO, A.; HÉROUART, D. Isolation of a molecular marker of soybean nodule senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, n. 8, p. 727-732, Aug. 2003a.

ALESANDRINI, F.; MATHIS, R.; SYPE, G. V. de.; HÉROUART, D.; PUPPO, A. Possible roles for a cysteine protease and hydrogen peroxide in soybean nodule development and senescence. **New Phytologist**, Cambridge, Inglaterra, v. 158, n. 1, p. 131-138, 2003b.

ARAÚJO, A. S. F. de; CARVALHO, E. M. S.; ALCANTARA, R. M. C. M. de. Fixação biológica do nitrogênio nas culturas da soja e do feijão-caupi. In: LEITE, L. F. C.; OLIVEIRA, F. das C.; ARAÚJO, A. S. F. (Ed.) **Tópicos em manejo e fertilidade do solo com ênfase no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006. p. 167-194.

BALESTRASSE, K. B.; GALLEGRO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 262, n. 1-2, p. 373-381, May 2004.

BARSCHE, A.; TELLSTROM, V.; PATSCHKOWSKI, T.; KUSTER, H.; NIEHAUS, K. Metabolite profiles of nodulated alfalfa plants indicate that distinct stages of nodule organogenesis are accompanied by global physiological adaptations. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 9, p. 998-1013, Sep. 2006.

ESPINOSA-VICTORIA, D.; VANCE, C. P.; GRAHAM, P. H. Host variation in traits associated with crown nodule senescence in soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 103-109, 2000.

FEDOROVA, M.; MORTEL, J. van de; MATSUMOTO, P. A.; CHO, J.; TOWN, C. D.; VANDENBOSCH, K. A.; GANTT, J. S.; VANCE, C. P. Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, n. 2, p. 519-537, Oct. 2002.

FERGUSON, B. J.; MATHESIUS, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 22, n. 1, p. 47-72, Sep. 2003.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; DENDOOVEN, L.; MUNIVE, A.; CORLAY-CHEE, L.; SERRANO-COVARRUBIAS, L. M.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Micro-morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules undergoing senescence. **Acta Physiologiae Plantarum**, Dordrecht, v. 30, n. 4, p. 545-552, July 2008a.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; ESPINOSA-VICTORIA, D.; MUNIVE, A.; CORLAY-CHEE, L.; SERRANO-COVARRUBIAS, L. M. Nodule senescence and biomass components in common bean cultivars. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 31, n. 3, p. 195-201, 2008b.

FILOSO, S.; MARTINELLI, L. A.; HOWARTH, R. W.; BOYER, E. W.; DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 79, n. 1-2, p. 61-89, May 2006.

FISHER, M. C. T.; EISSENSTAT, D. M.; LYNCH, J. P. Lack of evidence for programmed root senescence in common bean (*Phaseolus vulgaris*) grown at different levels of phosphorus supply. **New Phytologist**, Oxford, v. 153, n. 1, p. 63-71, Jan. 2002.

FRENDO, P.; HARRISON, J.; NORMAN, C.; HERNANDEZ-JIMÉNEZ, M. J.; VAN DE SYPE, G.; GILABERT, A.; PUPPO, A. Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, v. 18, n. 3, p. 254-259, Mar. 2005.

GOGORCENA, Y.; ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P. R.; BECANA, M. Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, n. 2, p. 753-759, 2005.

GROTEN, K.; DUTILLEUL, C.; HEERDEN, P. D. R. van; VANACKER, H.; BERNARD, S.; FINKEMEIER, I.; DIETZ, K. J.; FOYER, C. H. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, n. 5, p. 1269-1276, Feb. 2006.

GROTEN, K.; VANACKER, H.; DUTILLEUL, C.; BASTIAN, F.; BERNARD, S.; CARZANIGA, R.; FOYER, C. H. The roles of redox processes in pea nodule development and senescence. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 1293-1304, Oct. 2005.

HARRISON, J.; JAMET, A.; MUGLIA, C. I.; VAN DE SYPE, G.; AGUILAR, O. M.; PUPPO, A.; FRENDO, P. Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 187, n. 1, p. 168-174, Jan. 2005.

HERNANDEZ-JIMENEZ, M. J.; MERCEDES LUCAS, M.; ROSARIO DE FELIPE, M. Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 6-8, p. 645-657, June/Aug. 2002.

HOWARD, T.; OUGHAM, H. J.; WAGSTAFF, C.; STEAD, A. D. Defining senescence and death. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 385, p. 1127-1132, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja. In: WORKSHOP NITROGÊNIO NA SUSTENTABILIDADE DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA, 2000, Dourados. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. p. 51-75. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 26; Embrapa Agrobiologia. Documentos, 128).

HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J. Effects of cotyledons and nitrate on the nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 411-419, Dec. 1987.

JONES, A. M. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 125, n. 1, p. 94-97, Jan. 2001.

LAHIRI, K.; CHATTOPADHYAY, S.; GHOSH, B. Correlation of endogenous free polyamine levels with root nodule senescence in different genotypes in *Vigna mungo* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 5, p. 563-571, 2004.

MATAMOROS, M. A.; DALTON, D. A.; RAMOS, J.; CLEMENTE, M. R.; RUBIO, M. C.; BECANA, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 2, p. 499-509, 2003.

MITRA, R. M.; SHAW, S. L.; LONG, S. R. Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 101, n. 27, p. 10217-10222, 2004.

MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I.; MATAMOROS, M. A.; RUBIO, M. C.; CLEMENTE, M. R.; BREWIN, N. J.; BECANA, M. Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules: cloning, expression, and subcellular localization. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, n. 3, p. 1381-1392, 2000.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. atual. ampl. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MUGLIA, C. I.; COMAI, G.; SPEGAZZINI, E.; RICCILLO, P. M.; AGUILAR, O. M. Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 286, n. 2, p. 191-198, Sep. 2008.

MUGLIA, C. I.; GRASSO, D. H.; AGUILAR, O. M. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. **Microbiology**, Reading, v. 153, n. 4, p. 1286-1296, Apr. 2007.

MÜLLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 943-947, 2001.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, N. 6-8, p. 521-530, 2002.

PIHA, M. I.; MUNNS, D. N. Nitrogen fixation capacity of field-grown bean compared to other grain legumes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 79, n. 4, p. 690-696, 1987a.

PIHA, M. I.; MUNNS, D. N. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 169-182, 1987b.

PUPPO, A.; GROTEN, K.; BASTIAN, F.; CARZANIGA, R.; SOUSSI, M.; MERCEDES LUCAS, M.; ROSARIO DE FELIPE, M.; HARRISON, J.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. **New Phytologist**, Oxford, v. 165, n. 3, p. 683-701, 2005.



RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 281-335.

SPRENT, J. I.; THOMAS, R. J. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 637-645, 1984.

TIMMERS, A. C. J.; SOUPENE, E.; AURIAC, M. C.; DE BILLY, F.; VASSE, J.; BOISTARD, P.; TRUCHET, G. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, n. 11, p. 1204-1213, 2000.

TRINCHANT, J. C.; BOSCARI, A.; SPENNATO, G.; VAN DE SYPE, G.; LE RUDULIER, D. Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 3, p. 1583-1594, 2004.

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produtividade dos sistemas agrícolas na América Latina. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. cap. 7. p. 181-200.

URQUIAGA, S.; ZAPATA, F. (Ed.). **Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe**. Porto Alegre: Genesis; Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2000. 110 p.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. de C.; CARVALHO, A. M. de; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. p. 97-127.

VOISIN, A. S.; SALON, C.; MUNIER-JOLAIN, N. G.; NEY, B. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 243, n. 1, p. 31-42, 2002.

WISNIEWSKI, J. P.; RATHBUN, E. A.; KNOX, J. P.; BREWIN, N. J. Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, n. 4, p. 413-420, 2000.

YOSHIDA, S.; ITO, M.; NISHIDA, I.; WATANABE, A. Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 2, p. 170-178, Feb 2001.