

# AValiação DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM FEIJÃO<sup>1</sup>

ALÁIDES PUPPIN RUSCHEL<sup>2</sup> e RENATO RUSCHEL<sup>3</sup>

**SINOPSE.**— Em experimento conduzido em casa de vegetação, em Itaguaí, RJ, com plantas cultivadas em solo, foi avaliada a fixação simbiótica de nitrogênio em feijão, utilizando-se o método da redução do acetileno pelos nódulos e as análises de nitrogênio total e peso seco das plantas. As modificações da nodulação foram observadas através do peso seco e número de nódulos. As cultivares de feijão utilizadas foram Rico 23 e Preto 143. Foram feitas determinações aos 35, 50 e 65 dias após o plantio.

Notou-se que a cultivar pode modificar a massa dos nódulos, tendo a Preto 143 aumentado o número de nódulos de maneira linear, porém, o peso dos nódulos diminuiu após os 50 dias de idade da planta. Foi constatada a eficiência da inoculação através do aumento do peso e do nitrogênio total da planta, evidenciando um acréscimo de proteína na planta como resultante da fixação simbiótica do nitrogênio. Ficou demonstrado que a fixação simbiótica de nitrogênio poderá ser avaliada no feijoeiro através do peso seco em plantas com 65 dias de idade, ou, utilizando-se o teor de nitrogênio total da parte aérea, em plantas com 50 dias.

Medindo-se a redução do acetileno nas diferentes épocas, pôde-se estimar a fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. Foi determinado um fator de conversão igual a 2 com relação a moles de etileno evoluído para moles de N<sub>2</sub> fixado ou reduzido através da nitrogenase nos nódulos, usando-se as condições ambientes normais de temperatura, pressão de oxigênio, etc. no aferimento da redução do acetileno pelos nódulos.

*Palavras chaves adicionais para índice:* Redução de acetileno, nodulação em feijoeiro, inoculação, *Rhizobium phaseoli*, nitrogenase.

## INTRODUÇÃO

Apesar de ter sido a fixação simbiótica de nitrogênio em feijão alvo de discussões, sabe-se que esta planta se beneficia da simbiose uma vez que Raggio *et al.* (1959) constataram a fixação de nitrogênio em nódulos de feijão usado <sup>15</sup>N. Brakel (1966) notou, porém, que nem sempre o feijoeiro se beneficia com a bactéria, havendo casos em que a produção é prejudicada e outros em que uma interação adequada entre o *Rhizobium* e o feijoeiro traz resultados benéficos à planta. Brakel e Manil (1965), inoculando a semente, observaram aumentos significativos na produção de feijão os quais puderam ser comparados a plantios que receberam 50 kg de nitrogênio por hectare, enquanto que Guss e Döbereiner (1972), em experimento em casa de vegetação, usando vasos com solo em temperatura mais baixa que a ambiente, notaram que algumas estirpes de *Rhizobium phaseoli* inoculadas em feijão fixavam nitrogênio equivalente a uma adição de 46 ppm ao solo. Neste mesmo trabalho foi noticiada a compensação aos efeitos prejudiciais de altas temperaturas do solo por um maior número e peso de nódulos que algumas estirpes tinham a capacidade de produzir. No entanto, Pessanha *et al.* (1972), levam-

do em consideração somente o peso dos nódulos, notaram correlação negativa da nodulação com a produção de feijão em solos onde o nitrogênio não era o fator limitante para o desenvolvimento das plantas, mostrando desta forma um efeito negativo da inoculação em condições de campo.

Medir a atividade fixadora de nitrogênio da bactéria em plantas cultivadas no solo foi sempre um problema, já que os métodos conhecidos para tal avaliação (peso seco ou nitrogênio total da planta) nem sempre oferecem uma medida exata, sendo, além do mais, impossível distinguir-se o nitrogênio fixado daquele obtido do solo, executando-se quando aplicada a técnica do isótopo <sup>15</sup>N. Atualmente, com o emprego do método da redução do acetileno, que permite medir a atividade da nitrogenase nos nódulos (Koch & Evans 1966, Hardy *et al.* 1968, Schwinghamer *et al.* 1970), pode-se melhor avaliar o nitrogênio fixado. Ruschel e Reuszer (1973a), usando o método da redução do acetileno, encontraram correlações positivas entre o etileno evoluído dos nódulos e o teor de nitrogênio (total e percentual) do feijoeiro aos 45 dias de idade; porém, não observaram nenhuma correlação entre o acetileno reduzido pelos nódulos e o peso da planta. Em outro trabalho, os mesmos autores (1973b), estudando o desenvolvimento da nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em variedades precoces e tardias de soja, notaram que em ambas a nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio eram funções do desenvolvimento da planta.

O presente trabalho, conduzido no Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), em Itaguaí, RJ, teve por objetivo o estudo da nodulação e fi-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 25 de abril de 1974.

<sup>2</sup> Eng.º Agrônomo, M.Sc., Pesquisador em Agricultura, Chefe da Seção de Solos do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e Pesquisador B, bolsista, do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

<sup>3</sup> Eng.º Agrônomo, Ph.D., Pesquisador em Agricultura da Seção de Fitotecnia do IPEACS e Pesquisador A, bolsista, do CNPq.

ração simbiótica de nitrogênio em três diferentes idades do feijoeiro e a comparação dos métodos de avaliação da eficiência da simbiose *Rhizobium-planta*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Num experimento em casa de vegetação foram estudadas a nodulação e a fixação simbiótica de feijão usando-se os seguintes tratamentos: Testemunha sem inoculação (T), Inoculação (I) e Adição de nitrogênio ao solo (N). Duas cultivares de feijão foram usadas: Rico 23 e Preto 143, sendo a primeira conhecida por apresentar nodulação normal e a segunda, nodulação deficiente em condições normais. As plantas foram colhidas em três épocas (35, 50 e 65 dias após o plantio). O esquema experimental adotado foi inteiramente casualizado com três repetições.

Três plantas foram cultivadas em vasos com capacidade para 1,5 kg com solo da série Itaguaí, o qual revelou os seguintes valores de nutrientes: 0 ppm de P; 54 ppm de K; 4,1 mE de  $Ca^{++} + Mg^{++}/100\text{ cm}^3$  de solo; 0 mE de  $Al^{+++}/100\text{ cm}^3$  de solo e pH 5,8. Além de calagem foi aplicada, em todos os vasos, uma adubação básica de 200 ppm de P (superfosfato simples) e 50 ppm de K (cloreto de potássio), e 1 ml da solução de magnésio e micronutrientes:

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O,	150,0 g;
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O,	15,8 g;
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O,	8,9 g;
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ,	0,5 g;
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O,	1,0 g;
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O,	25,8 g;
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O,	7,3 g;
água destilada, 1.000 ml.	

Nos vasos que receberam nitrogênio, este foi adicionado seis vezes, de 10 em 10 dias, a partir do 8.º dia após o plantio, à razão de 50 ppm, sob forma de nitrato de amônio. As quantidades de nitrogênio adicionadas ao

solo antes das colheitas foram as seguintes: 1.ª colheita, 150 ppm; 2.ª colheita, 250 ppm; 3.ª colheita, 300 ppm.

Imediatamente após a colheita das plantas nas diferentes épocas, efetuada em torno das nove horas da manhã, foi separada e lavada em água comum a parte do sistema radicular das plantas que continham nódulos, a qual foi colocada em vidros de 58,5 ml para análise de redução do acetileno. A incubação do acetileno foi feita durante uma hora e a seguir foi medido o etileno evoluído com o auxílio de um cromatógrafo de gás Perkin Elmer F11, coluna de 0,003 m x 2 mm com Poropak R a 90°C, usando-se chama de ionização de hidrogênio e gás nitrogênio como transportador de gases. Nódulos e raízes foram separados, secados e pesados, sendo os dados dos primeiros usados para cálculos de etileno formado por grama de nódulos.

As plantas foram secadas, assim como os nódulos, em estufa a 60°C e a seguir foram determinados o número e o peso de nódulos, assim como o peso das plantas (raiz + parte aérea). O nitrogênio total da parte aérea das plantas foi analisado, fazendo-se digestão pelo método de semimicro-Kjeldhal, e determinado colorimetricamente usando-se reagente de Nessler.

Análises de variância foram feitas considerando-se a variável cultivar como aleatória, sendo fixas as variáveis tratamentos e épocas de colheita. Para as observações referentes à nodulação e evolução de etileno apenas o tratamento inoculação foi considerado para análise de variância.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias observadas para as diferentes variáveis estudadas encontram-se nos Quadros 1 e 2. Os resultados serão discutidos em subcapítulos incluindo-se um no qual é feita uma tentativa de avaliação do nitrogênio fixado pela bactéria, comparando-se o volume do etileno evoluído pelo método da redução do acetileno com o nitrogênio total das plantas nas diferentes épocas.

QUADRO 1. Peso seco e nitrogênio total de três plantas (médias de três repetições)

Tratamentos	Cultivares	Peso seco das plantas (g)				Nitrogênio total das plantas (mg)			
		35 dias	50 dias	65 dias	Médias gerais*	35 dias	50 dias	65 dias	Médias gerais*
Testemunha	Rico 23	3,99	6,15	3,93		42,03	36,85	30,90	
	Preto 143	6,00	7,13	6,97		58,30	61,66	69,74	
	Médias	4,95	6,64	5,45	5,68 c	50,16	49,25	50,32	49,91 c
Inoculação	Rico 23	4,16	4,44	9,53		41,59	73,24	124,70	
	Preto 143	6,31	6,28	9,13		56,57	90,65	139,30	
	Médias	5,23	5,36	9,33	6,64 b	49,08	81,94	132,00	87,67 b
Adição de nitrogênio ao solo	Rico 23	6,31	12,58	16,13		57,82	131,05	198,84	
	Preto 143	8,17	14,41	13,90		86,77	155,77	127,13	
	Médias	7,24	13,50	15,02	11,92 a	72,29	143,41	162,98	126,23 a
	Médias gerais*	5,81 c	8,50 b	9,93 a		57,18 c	91,54 b	115,10 a	

\* Médias gerais seguidas de diferentes letras diferem a 5% de probabilidade. Para comparação entre médias, a d.m.s. é 1,36 para peso seco de plantas e 12,83 para nitrogênio total das plantas.

QUADRO 2. *Peso e número de nódulos em três plantas, e  $\mu$ l de etileno evoluído por grama de nódulos e por peso de nódulos de três plantas do tratamento Inoculação (médias de três repetições)*

Variáveis analisadas	Idade da planta (dias)	Rico 23	Preto 143	Médias
Peso dos nódulos (mg)	35	45	198	121
	50	251	301	276
	65	487	226	357
Número de nódulos	35	42	153	98
	50	217	174	195
	65	298	241	268
Etileno evoluído ( $\mu$ l/g de nódulos)	35	173,3	246,9	211,1
	50	1.279,8	699,6	989,7
	65	1.273,4	3.212,8	2.243,1
Etileno evoluído ( $\mu$ l/nódulos de 3 plantas)	35	10,4	40,8	25,6
	50	252,8	197,0	224,9
	65	567,5	509,5	538,5

*Peso seco das plantas*

A análise estatística indicou diferenças entre tratamentos, porém, o desdobramento por época acusou diferenças significativas entre tratamentos apenas na segunda e terceira época, isto é, aos 50 e 65 dias de idade da planta (Quadro 3). Somente aos 65 dias as plantas dos três tratamentos diferiram entre si em peso (Fig. 1). As plantas dos tratamentos Inoculação e Adição de nitro-

QUADRO 3. *Análise de variância (quadrados médios) do peso seco das plantas e nitrogênio total com desdobramento dos graus de liberdade correspondentes a tratamentos e tratamentos x épocas*

Fontes de variação	G.L.	Peso seco	Nitrogênio total
Épocas	2	78,59++	15,271++
Cultivares	1	20,53++	1,975+
Tratamentos	2	203,61++	26,211+
Tratamentos x épocas	4	29,87+	4,428
Tratamentos/1.ª época	2	9,58	1,030
Tratamentos/2.ª época	2	114,89++	13,711+
Tratamentos/3.ª época	2	138,90++	20,326++
Cultivares x épocas	2	4,33	1,122
Cultivares x tratamentos	2	2,78	1,242+
Cult. x épocas x trat.	4	4,18+	1,969++
Resíduo	36	1,35	0,363

+ e ++ indicam diferenças a 0,05 e 0,01 P.

QUADRO 4. *Quadrados médios das análises de variância considerando-se apenas o tratamento Inoculação*

Fontes de variação	G.L.	Peso seco das plantas (g)	Nitrogênio total (mg)	Peso dos nódulos (mg)	Número de nódulos	Etileno ( $\mu$ l/g nód.)	Etileno ( $\mu$ l/nód. 3 pl.)
Cultivares	1	6,43	1.104	1.644	98	1.023.551	3.479
Épocas	2	32,59++	10.461++	85.702	43.995+	6.306.322	401.171++
Épocas (L)	1	31,30++	20.625++	166.145++	87.381++	12.389.112+	780.291++
Épocas (Q)	1	9,18++	296	5.379	609	223.532	13.050
Épocas x cultivares	2	2,90	7	69.646+	12.854	2.565.272	3.806
Épocas/Rico 23	2	—	—	146.974++	—	1.212.456	—
Épocas/Rico 23 (L)	1	—	—	293.483++	—	—	—
Épocas/Rico 23 (Q)	1	—	—	460	—	—	—
Épocas/Preto 143	2	—	—	8.434	—	7.658.654+	—
Épocas/Preto 143 (L)	1	—	—	—	—	13.194.814+	—
Épocas/Preto 143 (Q)	1	—	—	—	—	2.122.494	—
Resíduo	12	1,40	2.285	11.036	6.269	1.896.371	32.198

gênio ao solo foram respectivamente 1,8 e 2,8 vezes mais pesadas do que as plantas testemunhas.

Confrontando-se as médias do tratamento Inoculação com as médias do tratamento Testemunha nas três épocas, constata-se que o efeito da inoculação no peso seco da planta somente se evidenciou na terceira época de colheita (Fig. 1), concluindo-se que 65 dias foi a melhor idade para avaliar o efeito da inoculação em feijão através do peso seco da planta.

É interessante notar que as plantas do tratamento Testemunha não mostraram desenvolvimento no período

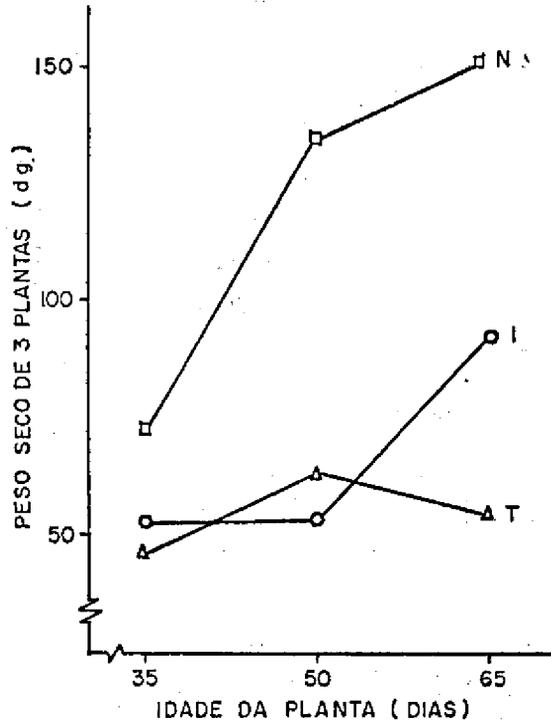


FIG. 1. *Efeito médio dos tratamentos Adição de nitrogênio ao solo (N), Inoculação (I) e Testemunha (T) no peso seco da planta.*

compreendido entre 35 e 65 dias de idade, enquanto que as do tratamento Adição de nitrogênio ao solo tiveram crescimento constante, sendo este relativamente maior entre 35 e 50 dias (Fig. 1). A análise do desenvolvimento das plantas inoculadas acusou um efeito quadrático entre épocas (Quadro 4), que pode ser constatado pela observação da Fig. 1.

#### Nitrogênio total na parte aérea da planta

A análise de variância para nitrogênio na planta indicou a existência de diferenças entre tratamentos, porém, quando estes foram analisados dentro de cada época, observou-se que apenas nas duas últimas colheitas (50 e 65 dias de idade) os três tratamentos diferiram entre si (Quadro 3 e Fig. 2). As plantas do tratamento Testemunha não apresentaram diferenças para o teor de nitrogênio, devido à falta de crescimento, o qual evidentemente foi limitado por deficiência daquele nutriente no solo. Analisando-se apenas o tratamento Inoculação (Quadro 4), houve uma alta significância para épocas, efeito linear, que pode ser apreciado na Fig. 2.

Confrontando-se os gráficos para peso seco e nitrogênio total (Fig. 1 e 2), percebe-se que as linhas do

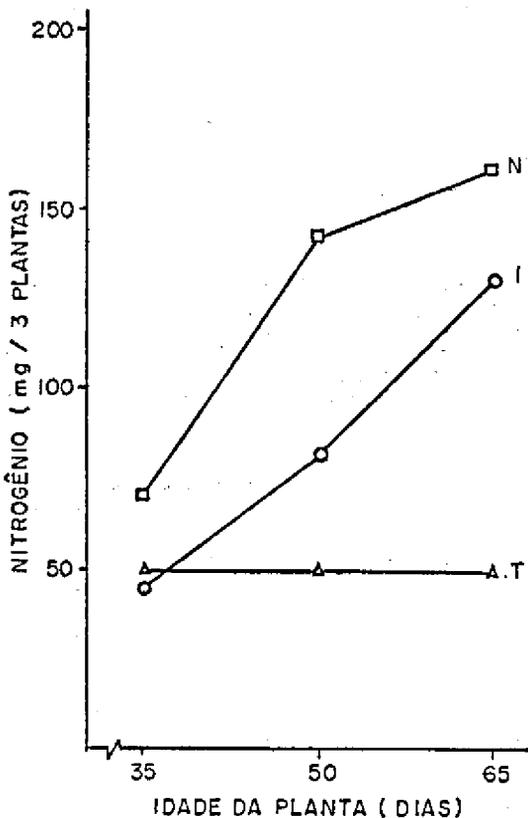


FIG. 2. Efeito médio dos tratamentos Adição de nitrogênio ao solo (N), Inoculação (I), e Testemunha (T) no nitrogênio total da planta.

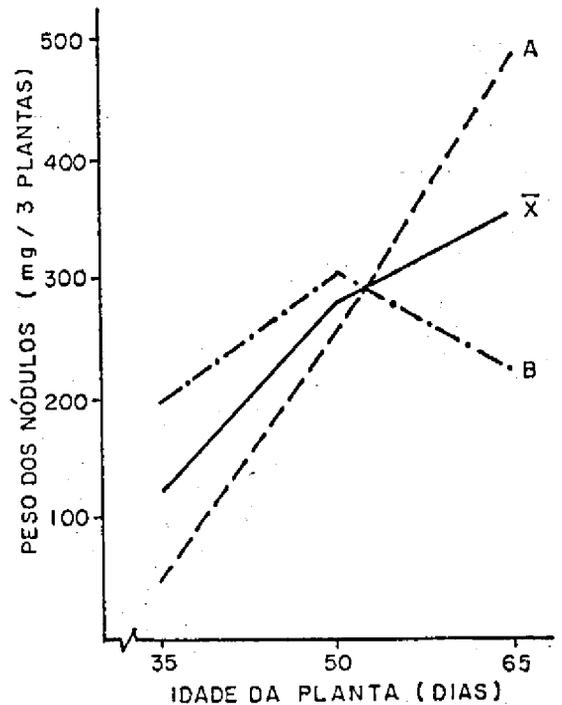


FIG. 3. Peso de nódulos em feijoeiros das cultivares Rico 23 (A) e Preto 143 (B) inoculados com *Rhizobium phaseoli*.

tratamento Adição de nitrogênio ao solo seguem a mesma tendência nas duas variáveis, o mesmo acontecendo com o tratamento Testemunha, porém, com menor exatidão, enquanto que para o tratamento Inoculação o confronto das linhas sugere um enriquecimento maior de nitrogênio após os 35 dias de idade da planta, evidenciando um efeito da inoculação no aumento do teor de proteína da planta. É interessante notar que as plantas inoculadas apresentaram aos 50 dias peso igual àquelas do tratamento Testemunha, porém, nesta idade havia mais nitrogênio nas plantas inoculadas, sugerindo este fato um acúmulo deste elemento antes que as plantas inoculadas mostrassem maior crescimento em relação à testemunha. Este fato foi corroborado pela observação das folhas das plantas inoculadas que apresentavam coloração verde mais intensa quando comparadas com as testemunhas, naquela idade da planta.

Do discutido conclui-se que a medição do nitrogênio total serve como uma maneira de aferir a simbiose *Rhizobium*-feijão em plantas com 50 dias de idade, antes pois de ser possível fazê-lo através do peso seco.

#### Peso dos nódulos

A análise de variância mostrou significância na componente linear de épocas, e dentro da cultivar Rico 23 (Quadro 4). Pela observação da Fig. 3 é possível constatar que a cultivar Preto 143 apresentou um decréscimo na massa nodular aos 65 dias de idade, no entanto,

ambas as cultivares mostraram uma tendência de aumento entre 35 e 50 dias. A interação constatada indica um efeito da cultivar sobre o desenvolvimento da massa nodular durante o crescimento da planta.

*Número de nódulos*

A análise desta variável acusou um efeito linear entre as três épocas (Quadro 4). Confrontando-se o número de nódulos com o peso dos mesmos (Quadro 2), verifica-se que na cultivar Rico 23 o tamanho dos nódulos aumentou à medida que a planta crescia, enquanto que na cultivar Preto 143 os nódulos aumentaram de tamanho entre 35 e 50 dias, porém, diminuíram depois dos 50 dias. A observação das Fig. 3 e 4 sugere que a cultivar Preto 143 inicialmente possuía nódulos mais pesados que a Rico 23, porém, após os 50 dias de idade, apesar de a infecção das raízes pelo *Rhizobium* continuar a produzir nódulos, estes não mais se desenvolviam tanto quanto na cultivar Rico 23, onde a nodulação evoluiu de forma constante entre os 35 e 65 dias de idade da planta.

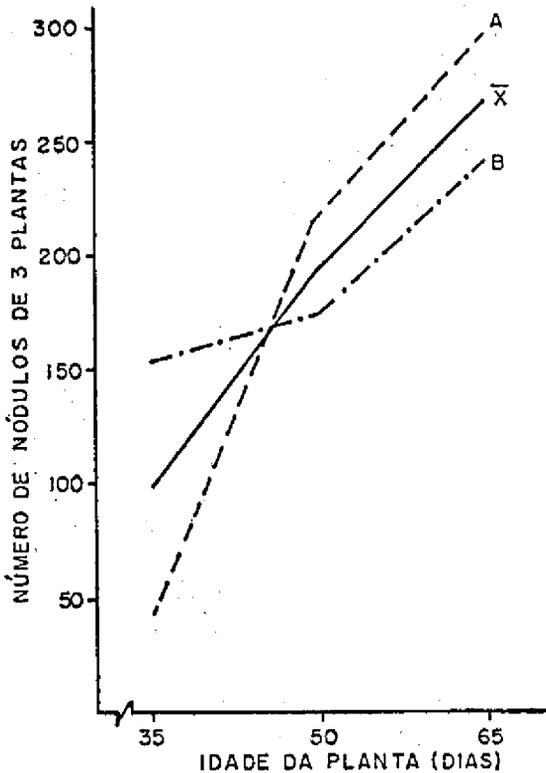


FIG. 4. Número de nódulos em feijoeiros das cultivares Rico 23 (A) e Preto 143 (B) inoculados com *Rhizobium phaseoli*.

*Etileno evoluído por grama de nódulos*

A análise de variância acusou um efeito linear entre épocas para esta variável (Quadro 4), o que pode ser

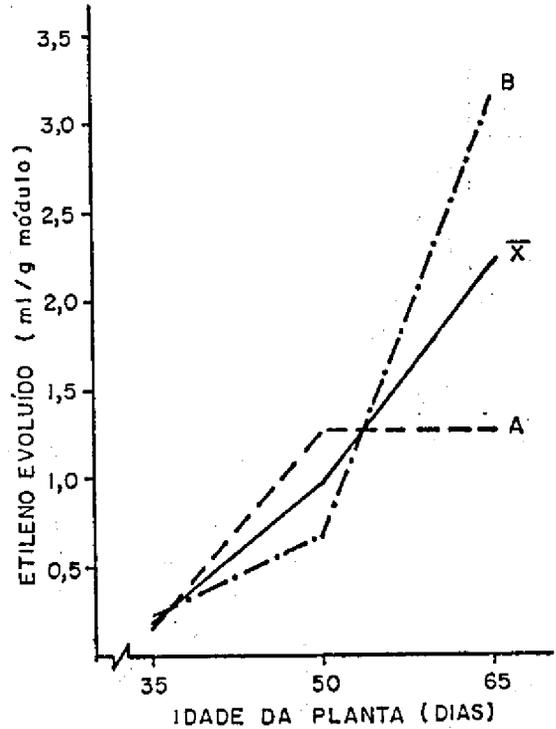


FIG. 5. Etileno evoluído por grama de nódulos de feijoeiros das cultivares Rico 23 (A) e Preto 143 (B) inoculados com *Rhizobium phaseoli*.

constatado pelo exame da Fig. 5. As épocas de colheita diferiram de forma significativa e linear dentro da cultivar Preto 143, cultivar esta que teve o peso e o tamanho dos nódulos em evolução errática. Pelo Quadro 2 é possível constatar que os nódulos em ambas as cultivares mostraram um aumento na atividade da nitrogenase, medida pelo etileno evoluído, entre 35 e 50 dias, porém, entre 50 e 65 dias houve um estacionamento da atividade nos nódulos da cultivar Rico 23 e um aumento muito maior nos nódulos da Preto 143, justamente aquela que apresentou nódulos menores aos 65 dias, sugerindo no presente caso, que por apresentarem maior atividade da nitrogenase, os nódulos pequenos em plantas com mais de 50 dias fixaram mais nitrogênio.

*Etileno evoluído por massa de nódulos de três plantas*

A análise desta variável acusou alta significância na componente linear entre épocas (Quadro 4). A Fig. 6 mostra que, em ambas as cultivares, os volumes totais de etileno evoluíram de forma ascendente com a idade da planta. Conclui-se que a menor atividade relativa de nitrogenase dos nódulos da cultivar Rico 23 aos 65 dias foi compensada pela grande massa nodular, resultando para ambas as cultivares um volume similar de etileno evoluído.

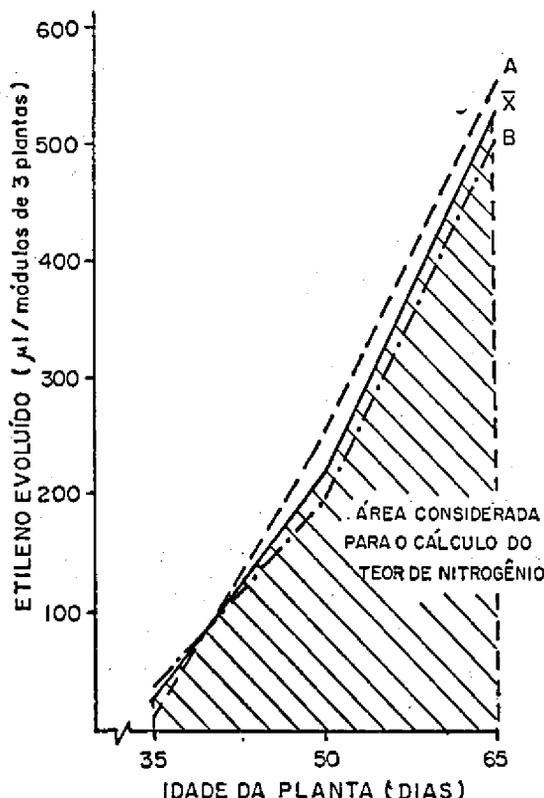
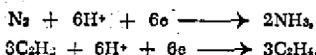


FIG. 6. Etileno evoluído por peso total de nódulos de feijoeiros das cultivares Rico 23 (A) e Preto 143 (B) inoculados com *Rhizobium phaseoli*.

#### Avaliação da fixação de nitrogênio

Numa tentativa de obter-se uma avaliação do teor de nitrogênio fixado na planta entre os 35 e 65 dias de idade, através do método da redução do acetileno, foi calculada a área existente sob o gráfico das médias de evolução de etileno por massa nodular de três plantas (Fig. 6), tendo-se antes transformado dias em horas uma vez que o etileno evoluído foi obtido incubando-se os nódulos durante uma hora em presença de acetileno. Levando-se em consideração as equações de redução de nitrogênio ( $N_2$ ) e do acetileno:



pode-se concluir que, teoricamente, para cada 3 moles de acetileno reduzido ou etileno evoluído, 1 mol de  $N_2$  é fixado pela nitrogenase. A seguir transformou-se o etileno calculado pelo gráfico em moles de  $N_2$ , usando-se a proporção mencionada (3:1), e obteve-se  $274 \times 10^{-5}$  moles de  $N_2$ , ou seja, 76,69 mg de nitrogênio por vaso ou ainda por três plantas. Este total, quando distribuído por épocas, está representado na Fig. 7 pelo gráfico do nitrogênio obtido pelo método da redução do acetileno, linha A.

Com os valores médios do nitrogênio total por épocas (Quadro 1), subtraindo-se o tratamento Testemunha das

médias do tratamento Inoculação e/ou do tratamento Adição de nitrogênio ao solo foram obtidos, respectivamente, as linhas I e N da Fig. 7, que correspondem ao nitrogênio acumulado na planta proveniente, respectivamente, da simbiose e do fertilizante nitrogenado. Nota-se que a linha obtida, usando-se o método da redução do acetileno, apresentou pontos mais baixos do que os reais obtidos pelo nitrogênio total da planta do tratamento Inoculação, fator este que poderia ser atribuído à perda de parte da atividade da nitrogenase devido ao manuseio das amostras, uma vez que o experimento foi conduzido em casa de vegetação e com plantas cultivadas em solo. Calculando-se as áreas sob as linhas I e A (nitrogênio total das plantas do tratamento Inoculação e nitrogênio medido pela redução do acetileno) observou-se que a relação entre as duas áreas está na proporção de 2 para 1, determinando desta forma um fator de conversão de 2 moles de etileno evoluído para cada mol de  $N_2$  fixado. Esta relação concorda com resultados recentes de Hardy *et al.* (1971), os quais, observando todo o desenvolvimento da soja, obtiveram um fator igual a 2,3; Olghorghorie e Pate (1971) observaram variações de 1,7 a 3,5 para *Pisum arvense* e Roughley e Dart (1967); variações de 1,5 a 3,7 para *Trifolium subterraneum*.

Os resultados obtidos na presente avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio vieram mostrar que o au-

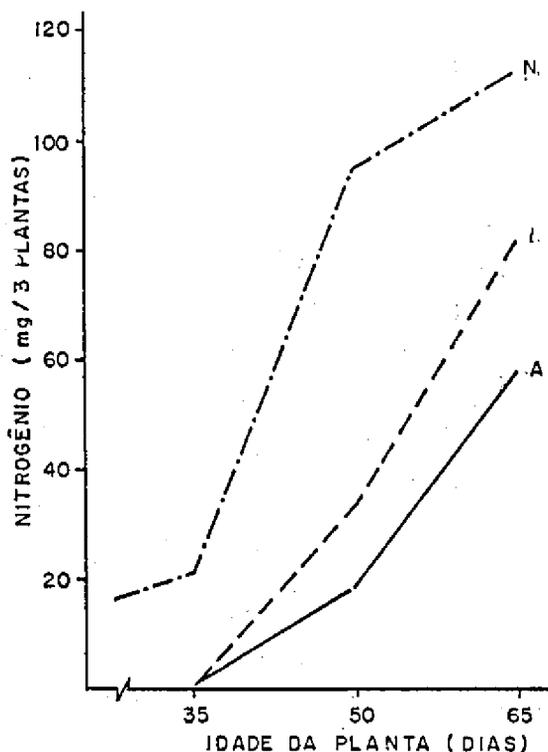


FIG. 7. Nitrogênio fixado em feijoeiro e avaliado pelo método da redução do acetileno (A) e pelo nitrogênio total da planta (I) (diferença entre tratamentos Inoculação e Testemunha). A linha N representa o nitrogênio total da planta do tratamento Adição de nitrogênio ao solo (diferença em relação à Testemunha).

mento do nitrogênio na planta em relação à testemunha foi equivalente a  $681 \times 10^{-6}$  moles de  $N_2$  por três plantas nos tratamentos que receberam nitrogênio mineral, enquanto que a inoculação proporcionou um aumento de  $274 \times 10^{-6}$  moles de  $N_2$ .

CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem os seguintes destaques:

1) medindo-se a redução do acetileno em diferentes idades da planta pode-se perfeitamente avaliar a fixação simbiótica de nitrogênio em feijão; esta pode ser também avaliada através do peso seco da planta com 65 dias ou pelo nitrogênio total da parte aérea da mesma com 50 dias de idade;

2) foi observada concordância entre os métodos de redução do acetileno e do nitrogênio total da parte aérea da planta na avaliação do nitrogênio fixado simbioticamente em feijoeiro;

3) foi encontrado um fator de conversão igual a 2 com relação a moles de etileno evoluído para moles de  $N_2$  fixado, usando condições ambientais normais de temperatura e pressão de oxigênio no aferimento da redução do acetileno pelos nódulos de plantas de feijão cultivadas em solo, em casa de vegetação;

4) foi constatada a eficiência da inoculação do feijão com *Rhizobium phaseoli* através do aumento do peso da planta e do nitrogênio total da planta, evidenciando um acréscimo de proteína na planta como resultante da fixação simbiótica de nitrogênio;

5) foi notado um efeito da cultivar sobre o desenvolvimento da massa nodular durante o crescimento da planta.

REFERÊNCIAS

Brakel, J. 1966. Symbiotic nitrogen fixation in beans (*Phaseolus vulgaris*). A comparison of the fixing activity of various *Rhizobium* strains. Bull. Rech. Agron. Gembloux 1:525-533.

ABSTRACT.- Ruschel, A.P.; Ruschel, R. [Evaluation of nitrogen fixation in bean (*Phaseolus vulgaris*)]. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia (1975) 10, 11-17 [Pt, en] EMBRAPA/RJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26, Brazil.

Rates of nitrogen fixation by 2 bean varieties, Rico 23 and Preto 143, grown in soils in the greenhouse, were determined 35, 50 and 65 days after planting using the acetylene reduction method as a measure of nitrogenase activity and by measuring total nitrogen and plant dry weight. Changes in nodulation were followed by measuring nodule numbers and dry weights of nodules.

Nodule mass was effected by variety, Preto 143 increasing nodule number linearly. However, nodule weight decreased in plants older than 50 days. Inoculation with *Rhizobium phaseoli* increased weight and total nitrogen of bean plants, denoting a protein increase in the plant as a result of fixation.

It was demonstrated that symbiotic nitrogen fixation caused an increase in dry weight of 65 - day - old plants and an increase in the total nitrogen level of above ground plant parts in 50 - day - old plants. Acetylene reduction measurements were good estimations of nitrogen fixation in beans. A conversion factor of two (2) was determined relating ethylene moles to dinitrogen moles fixed, under the conditions of this experiment.

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.

Guss, A. & Döbereiner, J. 1972. Efeito da adubação nitrogenada e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio em feijão. Pesq. agropec. bras., Sér. Agron., 7:87-93.

Koch, B. & Evans, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybeans root nodules. Pl. Physiol., Lancaster, 41:1748-1749.

Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. 1968. The acetylene ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation. Pl. Physiol., Lancaster, 43:1185-1207.

Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Fry, K.T. & Holsten, R.D. 1971. Biological nitrogen fixation: a key to world protein. In Lie, T.A. & Mulder, E.G. (ed.) Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. Pl Soil, Special Volume: 561-590.

Olgroghorie, C.G.O. & Pate, J.S. 1971. The effects of nitrate stress on the nitrogen metabolism of the field pea (*Pisum arvense*, L.). In Lie, T.A. & Mulder, E.G. (ed.) Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. Pl. Soil, Special Volume:185-202.

Pessanha, G.C., Franco, A.A., Döbereiner, J., Groszmann, A. & Britto, D.P.P.de S. 1972. Correlação negativa de nodulação com a produção de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em solos onde o nitrogênio não é fator limitante. Pesq. agropec. bras., Sér. Agron., 7:49-56.

Raggio, N., Raggio, M. & Burris, R.H. 1959. Nitrogen fixation by nodules formed on isolated bean roots. Biochem. Biophys. Acta 32:274-275.

Roughley, R.J. & Dart, J.P. 1967. Reduction of acetylene by nodules of *Trifolium subterraneum* as affected by root temperature, *Rhizobium* strain and host cultivar. Arch. Microbiol. 69:171-179.

Ruschel, A.P. & Reuszer, H.W. 1973a. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris*. Pesq. agropec. bras., Sér. Agron., 8:287-292.

Ruschel, A.P. & Reuszer, H.W. 1973b. Desenvolvimento da nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em variedades de soja, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Pesq. agropec. bras., Sér. Agron., 8:251-256.

Schwinghamer, E.A., Evans, H.J. & Dawson, M.D. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of  $N_2$  fixation. Pl. Soil 33:192-212.