

**Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia**

**Resposta do feijão e da soja à inoculação com rizóbios e submetidos a
diferentes níveis de sombreamento.**

Daiana Pereira Fernandes

Goiânia - GO

2009

Fernandes, Daiana Pereira.
F362r Resposta do feijão e da soja à inoculação com rizóbios e submetidos a diferentes níveis de sombreamento [manuscrito] / Daiana Pereira Fernandes. – 2009.
83 f. : il. ; figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2009.

Bibliografia: f. 69-77.

1. Feijão e Soja – Inoculação – Rizóbios 2. *Phaseolus vulgaris* 3. Fixação Biológica de Nitrogênio 4. Sombreamento I. Portes, Tomás de Aquino II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Ciências Biológicas**. III. Título.

CDU: 635.652

“A Deus, por seu amor incondicional, pela sua presença constante ao longo da minha caminhada, por ter me concedido a sabedoria para desfrutar dos momentos alegres e superar os momentos de dificuldades e por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida.”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade única de aprendizado e crescimento...

À Universidade Federal de Goiás e ao Departamento de Biologia Geral pela estrutura oferecida para realização deste trabalho e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Tomás de Aquino, pela orientação, incentivo e confiança.

Aos colegas de laboratório Maloni, Bárbara, Olívia, Rodrigo, Saulo, Maria Tereza, Daiana, Carolina e Márcia, pela amizade, convívio intenso, auxiliar no desenvolvimento deste trabalho e por compartilharem dos momentos felizes e também pela força nas horas difíceis.

Ao técnico de laboratório, Paulo Farias, pelo auxílio no laboratório.

Ao Riccely, doutorando da escola de agronomia, pelo auxílio na utilização do programa estatístico.

As professoras Heloisa, Letícia, Maria Helena, Moemy e Lee Chen Chen pela amizade e pelos ensinamentos e discussões que fundamentaram a minha formação profissional.

A todos os meus mestres, que contribuíram na minha formação e realização dos meus créditos com êxito;

Aos meus pais Liondenise e Selma, pela minha formação, a minha irmã Denise, ao meu noivo Douglas e demais familiares que sempre me apoiaram, incentivaram e torceram pela obtenção deste título.

E a todos que contribuíram de alguma forma na minha caminhada e, em especial, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

"Se nunca abandonas o que é importante para ti, se te importas tanto a ponto de estares disposto a lutar para obtê-lo, asseguro-te que tua vida estará plena de êxito.

Será uma vida dura, porque a excelência não é fácil, mas valerá a pena."

Richard Bach

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Importância do nitrogênio e Fixação Biológica do nitrogênio.....	3
2.2 Formação dos nódulos.....	4
2.3 Fatores que afetam a nodulação	6
2.4 Influência da luz na fixação simbiótica de nitrogênio	7
2.5 Partição de fotoassimilados ao longo da ontogenia da planta.....	9
2.6 Feijão	10
2.7 Soja	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Delineamento experimental	15
3.2. Sombreamento	17
3.3. Semeio e tratos culturais	17
3.4. Análise estatística	17
3.5. Coleta das amostras vegetais	17
3.6. Parâmetros avaliados	18
3.6.1. Método usado para as medições da respiração dos nódulos.....	19
3.6.2. Determinação da Atividade Respiratória nos Nódulos	19
3.6.3. Número e Massa fresca de nódulos.....	20
3.6.4. Volume dos nódulos	20
3.6.5. Classificação dos nódulos em ativos e inativos quanto a sua coloração.....	20
3.6.6. Secagem e obtenção de massa seca dos nódulos.....	21
3.6.7. Preparo da parte aérea para determinação da massa seca	21
3.6.8. Medidas de temperatura e umidade	21
3.6.9. Determinação do nitrogênio total foliar	21
3.6.10. Determinação da concentração de clorofila	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Experimento 1: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivado em casa de vegetação.....	23
4.2. Experimento 2: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, submetidos a diferentes níveis de sombreamento, em condições de casa de vegetação.....	29

4. 3.	Experimento 3: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivada em casa de vegetação.....	33
4. 4.	Experimento 4: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, submetidas a diferentes níveis de sombreamento, em condições de casa de vegetação.	38
4. 5.	Experimento 5: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivado em ambiente externo à casa de vegetação..	42
4. 6.	Experimento 6: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, submetidos a diferentes níveis de sombreamento, cultivado em ambiente externo à casa de vegetação.....	48
4. 7.	Experimento 7: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivada em ambiente externo à casa de vegetação.....	51
4. 8.	Experimento 8: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, submetidas a diferentes níveis de sombreamento, em ambiente externo à casa de vegetação.....	58
5.	CONCLUSÃO.....	67
6.	SUGESTÕES.....	68
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	69
	ANEXOS	78
	Anexo I	79

RESUMO

A soja e o feijão são leguminosas de grande importância econômica e social para o Brasil. Do ponto de vista nutricional, são muito exigentes em nitrogênio e para suprir esta demanda ambas às espécies são hábeis em fixá-lo simbioticamente. Mas, para fixar simbioticamente o nitrogênio, os rizóbios necessitam de energia de carboidratos proveniente da fotossíntese. Por esta razão a disponibilidade de fotossintato é o maior fator limitante na Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Este trabalho se propôs a avaliar a influência da inoculação com rizóbios em dois estádios fenológicos de plantas submetidas a diferentes níveis de sombreamento. Neste contexto foi avaliada a inoculação mediante os seguintes tratamentos: duas espécies de leguminosas (*Phaseolus vulgaris*, L. e *Glycine max*, L.) estando elas inoculadas e não inoculadas (Fi, Fni, Si e Sni) com estirpes específicas (*Rhizobium tropici* e *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*) em dois estádios fenológicos (antes, Ep1, e após a floração, Ep2) e submetidas à três níveis de sombreamento (sem sombreamento, 70% e 80% de sombra). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições para os experimentos 1, 2, 3 e 4 conduzidos em casa de vegetação e três repetições para os experimentos 5, 6, 7 e 8 conduzidos em ambiente externo a casa de vegetação. Nos experimentos 1 e 3, ambas as espécies continuaram formando nódulos após a floração, nestes as plantas dos tratamentos Fni Ep2, Sni Ep2 e Si Ep2 apresentaram as maiores médias para o número, volume, massa fresca e massa seca de nódulos. Quanto à atividade dos nódulos, as plantas dos tratamentos Fi Ep1 e Si Ep1 apresentaram o maior número de nódulos ativos comparados aos tratamentos Fni Ep2 e Sni Ep2. Avaliando o efeito do sombreamento nos experimentos 2 e 4, observou-se que as plantas de feijão e soja se comportaram de forma diferente. O sombreamento de 80% favoreceu a formação de nódulos no feijoeiro inoculado deferindo entre os tratamentos de sombreamento, ao contrário das plantas de soja que não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos. Não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto ao número de nódulos ativos para o feijão; as plantas do tratamento Sni 80% obtiveram o menor número de nódulos ativos comparado às plantas do tratamento Si 0%. Nos experimentos 5 e 7 as plantas de feijão e soja reduziram o número de nódulos após a floração, e assim como no experimento 1 e 3, observou-se maior número de nódulos ativos durante o período vegetativo comparado ao período reprodutivo. O sombreamento aplicado nas plantas de feijão (Experimento 6) não foi suficiente para causar nenhuma diferença entre os tratamentos quanto ao número e atividade dos nódulos; no experimento 8 com soja, o sombreamento alterou os padrões de nodulação e atividade dos nódulos ($p \geq 0,05$). Conclui-se neste trabalho, que a formação e manutenção da atividade dos nódulos ocorreram de maneira distinta nos estádios vegetativos e reprodutivos, contudo o sombreamento de 70 e 80% aplicado não foi suficiente para causar alteração notável na atividade dos nódulos, sugerindo que a redução na disponibilidade de fotossintatos não é o fator limitante na eficiência de fixação do N, principalmente no feijoeiro.

PALAVRAS CHAVES: *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, Fixação Biológica de Nitrogênio, estágio de desenvolvimento e sombreamento.

ABSTRACT

The soybeans and beans are of great economic and social importance to Brazil. From the nutritional point of view, they are very demanding in nitrogen and to supply its demand both species are able Biological Nitrogen Fixation (BNF). However, for the BNF, rhizobia require energy supply by the carbohydrates from photosynthesis. For this reason the availability of fotossintato is the biggest limiting factor in BNF. This work had as propose to evaluate the influence of inoculation with rhizobia in two phenological stages of plants under different levels of shading. In this context the inoculation was assessed by the following treatments: two species of legume (*Phaseolus vulgaris*, L. and *Glycine max*, L.) inoculated and not inoculated (Fi, Fni, Si and Sni) with specific strains (*Rhizobium tropici* and *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*) in two phenological stages (before, Ep1, and after flowering, Ep2) and subjected to three shadow levels (no shade, 70% and 80% of shade). The experimental design was completely randomized in four replicates on the experiments 1, 2, 3 and 4 conducted in a greenhouse and three replicates for the experiments 5, 6, 7 and 8 in the external environment to a greenhouse. In experiments 1 and 3, both species have continued forming nodules after flowering, the plants of these treatments Fni Ep2, Sni Ep2 and Si Ep2 had the highest average for the number, volume, fresh weight and dry weight of nodules. As the activity of the nodules, the plants of treatments Fi Ep1 and Si Ep1 had the highest number of active nodules compared to treatments Fni Ep2 and Sni Ep2. Assessing the effect of shading in experiments 2 and 4, it was found that bean and soybean plants have behaved differently. The shading of 80% favored the formation of nodules in inoculated bean deferring between treatments of shading, in contrast to the soybean plants that there was no difference ($p \geq 0.05$) among treatments. There was no statistical difference between treatments in the number of active nodes for the beans; the plants of the Sni treatment 80% had the lowest number of active nodules compared to the plants of treatment Si 0%. In experiments 5 and 7 plants of soybeans and reduced the number of nodules after flowering, and as in Experiment 1 and 3 there was a higher number of active nodes during the growing season compared to the reproductive period. The shading applied in bean plants (Experiment 6) was not enough to cause no difference between treatments on the number and activity of nodules; in the experiment with 8 soybean, the shading changed patterns of nodulation and activity of nodules ($p \geq 0.05$). It is this work that the formation and maintenance of activity of the nodules were so distinct in vegetative and reproductive stages, but the shading of 70 and 80% applied was not sufficient to cause significant change in activity of the nodules, suggesting that the reduction the availability of fotossintatos is not the limiting factor in determining the efficiency of N, mainly in the bean.

KEY WORDS: *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, Biological Nitrogen Fixation, stage of development and shading.

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 – Plantas de feijão e soja cultivadas em casa de vegetação no período referente ao pós-florescimento estando algumas unidades experimentais sombreadas.....	15
Figura 2 – Plantas de feijão e soja, no período vegetativo, cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	16
Figura 3 – Aparelho utilizado na determinação da respiração dos nódulos pelo Método Potenciométrico.....	19
Figura 4 – Número de nódulos por planta de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliada em dois períodos fenológicos, antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivada em casa de vegetação.....	24
Figura 5 – Volume de nódulos por planta de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliado antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivado em casa de vegetação.....	24
Figura 6 – Número de nódulos ativos por planta em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliado antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivado em casa de vegetação.....	25
Figura 7 – Ontogênese de nódulos em feijoeiro cultivado em casa de vegetação. A: nódulos ativos (rosados) e inativos (verdes); B: nódulo em estágio senescente.....	25
Figura 8 – Quantidade de CO ₂ liberado por massa seca de nódulos em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em casa de vegetação.....	26
Figura 9 – Teor de nitrogênio total foliar em relação ao número de nódulos ativos por planta em feijoeiro inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivado em casa de vegetação.....	28
Figura 10 – Número de nódulos em plantas de feijão cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento avaliados após a floração (Ep2), em casa de vegetação.....	30
Figura 11 – Número de nódulos em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) cultivada em casa de vegetação avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2).....	34

Figura 12 –	Número de nódulos ativos por plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) cultivada em casa de vegetação.....	35
Figura 13 –	Massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRn) e folha (MSF) por planta de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivada em casa de vegetação.....	37
Figura 14 –	Número de nódulos ativos por plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas sob diferentes níveis de sombreamento durante o estágio reprodutivo (Ep2) cultivadas em casa de vegetação.....	39
Figura 15 –	Massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2) em casa de vegetação.....	41
Figura 16 –	Número de nódulos ativos de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliados na antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.....	43
Figura 17 –	Nódulos em raízes de feijão avaliados antes (esquerda) e após (direita) o florescimento e cultivado em ambiente externo à casa de vegetação.....	43
Figura 18 –	Quantidade de CO ₂ liberado por massa seca de nódulos em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.....	44
Figura 19 –	Quantidade de CO ₂ liberado por volume de nódulos em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.....	45
Figura 20 –	Plantas de feijão inoculado (esquerda) e não inoculado (direita), cultivada sob luz plena durante o período reprodutivo (Ep2) em ambiente externo a casa de vegetação.....	46
Figura 21 –	Número de nódulos por plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	52
Figura 22 –	Raízes de soja referentes aos tratamentos que não receberam inoculante. Raiz de soja desprovida de nódulos (Esquerda) e raiz de soja contendo apenas um nódulo (Direita).....	52

Figura 23 –	Nodulação na região do colo em raízes primárias de soja inoculada.....	53
Figura 24 –	Nódulos ativos em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	54
Figura 25 –	Quantidade de nitrogênio total em folhas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivada em ambiente externo a casa de vegetação.....	56
Figura 26 –	Efeito do sombreamento no número de nódulos por planta em raízes de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	58
Figura 27 –	Efeito do sombreamento na massa seca de nódulos por plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni) avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	59
Figura 28 –	Efeito do sombreamento no número de nódulos ativos em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni) avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	60
Figura 29 –	Efeito do sombreamento na concentração de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> em folhas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	63
Figura 30 –	Efeito do sombreamento na concentração de clorofila total (<i>Cl_{tot}</i>) em folhas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas após a floração (Ep2), cultivada em ambiente externo a casa de vegetação.....	64
Figura 31 –	Influência da luz e inoculação com bactérias fixadoras de N ₂ no teor de clorofila e crescimento da planta de soja. A esquerda, Sni 0%, e a direita, Sni 80%.....	64
Figura 32 –	Planta de soja não inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> sp. com abortamento de flores.....	65
Figura 33 –	Efeito do sombreamento na produção de fitomassa em soja cultivada em campo aberto avaliadas após a floração (Ep2).....	65

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 – Características químicas do solo avaliadas na camada de 0,0m – 0,2m de profundidade antes do plantio do primeiro semestre.....	14
Tabela 2 – Características químicas do solo avaliadas na camada de 0,0m – 0,2m de profundidade antes do plantio do primeiro semestre.....	15
Tabela 3 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS), e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	23
Tabela 4 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	26
Tabela 5 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	27
Tabela 6 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (PF), massa seca de nódulos (PS) e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) submetidos a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	29
Tabela 7 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) submetidos a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	31

Tabela 8 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm), folha (MSF) e vagen (MSV) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), submetidos a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	32
Tabela 9 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em casa de vegetação.....	33
Tabela 10 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) cultivadas em casa de vegetação.....	36
Tabela 11 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF)) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.....	36
Tabela 12 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume de nódulos por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), cultivadas em casa de vegetação após a floração (Ep2), submetidas a diferentes níveis de sombreamento.....	38
Tabela 13 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em soja inoculada e não inoculada, avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em casa de vegetação.....	40

Tabela 14 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm), folha (MSF) e vagem (MSV) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), submetidas à diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2) e cultivadas em casa de vegetação.....	40
Tabela 15 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), em ambiente externo à casa de vegetação.....	42
Tabela 16 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2) cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.....	44
Tabela 17 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF)) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.....	45
Tabela 18 – Média da clorofila <i>a</i> (Cla), <i>b</i> (Clb), razão (Cla/Clb) e total (Cltot) em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	47
Tabela 19 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), submetidas a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	48

Tabela 20 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em feijão inoculado e não inoculado, submetidas a diferentes níveis de sombreamento avaliados após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.....	48
Tabela 21 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm), folha (MSF) e vagem (MSV) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), submetidas a diferentes níveis de sombreamento, avaliadas após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	49
Tabela 22 – Média da clorofila <i>a</i> (Cla), <i>b</i> (Clb), razão (Cla/Clb) e total (Cl _{tot}) em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), submetidas a diferentes níveis de sombreamento, avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	50
Tabela 23 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	51
Tabela 24 – Efeito da inoculação no CO ₂ liberado por planta (CO ₂), CO ₂ liberado por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹), CO ₂ liberado por massa seca de nódulo (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	55
Tabela 25 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	55

Tabela 26 – Média da clorofila <i>a</i> (Cla), <i>b</i> (Clb), razão (Cla/Clb) e total (Cltot) em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	57
Tabela 27 – Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) submetidos a diferentes níveis de sombreamento, avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	58
Tabela 28 – Média de CO ₂ liberado pelos nódulos por planta (CO ₂), por volume de nódulo (CO ₂ /V.nod ⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO ₂ /MS.nod ⁻¹) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), submetidas à diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	61
Tabela 29 – Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), submetidas à diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	61
Tabela 30 – Média da clorofila <i>a</i> (Cla), <i>b</i> (Clb), total (Cltot) e razão (Cla/Clb) em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.....	63

INTRODUÇÃO

Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill) são leguminosas de grande importância social e econômica para o país pois fazem parte da dieta diária e da grande cadeia produtiva agroindustrial. Essas leguminosas, embora alcancem produtividades elevadas quando cultivadas em condições de alta tecnologia, em se tratando de produtividade média nacional, elas são relativamente baixas. Entre os fatores responsáveis pelas baixas produtividades, a deficiência de nitrogênio é relevante na produção de feijão comum e soja.

Feijão e soja são culturas que apresentam elevada demanda por nitrogênio, podendo este ser fornecido via fertilizante nitrogenado ou Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). O fornecimento de fertilizantes nitrogenados para a cultura da soja, como também para a maioria das espécies cultivadas, apresentam baixa eficiência de utilização por parte da planta devido às elevadas perdas que ocorrem, principalmente por lixiviação e volatilização, além da sua aplicação se tornar onerosa quando se trata de grandes áreas. Plantas como o feijão, a soja, assim como outras leguminosas quando em simbiose com bactérias da família Rhizobiaceae são capazes de fixar o nitrogênio presente na atmosfera podendo dispensar totalmente ou parcialmente a utilização de fertilizantes nitrogenados. Assim, a FBN contribui para minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes da utilização destes insumos, além de ser muito importante tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico.

Dentre os fatores limitantes na associação simbiótica da fixação do N₂ em plantas leguminosas destaca-se a disponibilidade de fotossintato, carbono reduzido fotossinteticamente.

A fotossíntese, assim como a FBN, são considerados mecanismos fisiológicos fundamentais para a manutenção da vida nos ecossistemas os quais estão em contínua dependência. Estima-se que, para cada grama de N₂ fixado 3 a 7 g de carbono, na forma de carboidratos, são oxidados nos nódulos. Assim, qualquer fator que diminua a quantidade de fotossintetizado disponível ao nódulo, conseqüentemente reduzirá a fixação do N₂ podendo prejudicar o rendimento de grãos.

O presente trabalho teve por objetivo verificar o comportamento de nódulos fixadores de nitrogênio em feijão e soja em dois estádios fenológicos das plantas, em condições de plena luz e submetidos a dois níveis de sombreamento.

1. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. Importância do nitrogênio e Fixação Biológica do nitrogênio.

O nitrogênio (N) é o quarto elemento mais abundante nas plantas após o carbono, hidrogênio e oxigênio, constituindo 0,5 – 5% da sua massa seca (Taiz; Zeiger, 2004; Lindblad; Guerrero, 1993).

Considerado como elemento essencial, ele faz parte da estrutura de moléculas importantes como clorofilas, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas além de muitas outras substâncias do metabolismo secundário (Scheible et al., 2004; Kerbaudy, 2004; Epstein, 1975).

O N é requerido em grandes quantidades pelos vegetais e sua disponibilidade insuficiente é um dos principais fatores limitantes para a agricultura por ser o nutriente que mais interfere no crescimento e produção da fitomassa em regiões tropicais (Zilli et al., 2006; Cookson et al., 2005; Trevaskis et al., 2002; Blumenthal et al., 1997).

Excetuando-se a água, nenhuma outra deficiência é tão acentuada como a de N. Os principais sintomas de deficiência em plantas são clorose generalizada, estiolamento, crescimento lento e plantas com aparência raquítica. A carência deste nutriente causa diminuição de proteínas e enzimas como a RUBISCO, catalizadora da fixação fotossintética do CO₂, e da clorofila resultando na redução da fotossíntese e eficiência da carboxilação (Sinclair et al., 2000; Lam et al., 1996; Epstein, 1975).

As principais fontes de nitrogênio para as plantas são o solo, através da decomposição da matéria orgânica, os fertilizantes comerciais e a atmosfera, após o N₂ ser fixado biologicamente em amônia (Vance, 2001).

Apesar de abundante na atmosfera (concentração em torno de 78%), as plantas e demais organismos eucariotos não são capazes de utilizar diretamente o gás N₂ a fim de suprir as suas necessidades. Para ser assimilado, ele deve estar na forma fixada e sua fixação se dá com a quebra da tripla ligação covalente e de grande estabilidade existente entre os dois átomos de N, produzindo amônia (NH₃) (Taiz; Zeiger, 2004; Raven et al., 2001).

A fixação do N₂ pode ocorrer de duas formas: fixação industrial e fixação biológica. Na fixação industrial, sob altas temperaturas e pressão, a queima do petróleo fornece energia para a reação do nitrogênio (N₂) com hidrogênio (H₂) para formar amônia. É considerado um processo caro em função de utilizar fontes energéticas não renováveis. Na síntese de uma tonelada de amônia calcula-se que são gastos seis barris de petróleo (Hungria et al., 1994). A fixação biológica consiste na fixação do nitrogênio em amônia pela atividade de alguns microrganismos procariotos. Esta fixação pode ocorrer de forma assimbiótica ou simbiótica.

Na forma assimbiótica os organismos vivem livres no solo e não mantêm relação simbiótica com a planta. Na fixação simbiótica o organismo simbiote fornece o N₂ fixado na forma de NH₃ diretamente à planta e em troca, a planta fornece carboidratos provenientes da fotossíntese (Taiz; Zeiger, 2004; Postgate, 1989). Estimativas apontam que a fixação industrial do N₂ rende aproximadamente 60 x 10⁶ toneladas métricas de N fixado por ano, já a fixação biológica contribui com 100 x 10⁶ a 180 x 10⁶ toneladas métricas por ano (Burris; Roberts, 1993).

Uma vez fixado em amônia, a mesma é assimilada em aminoácidos pela via glutamato desidrogenase (GDH) e via glutamina sintetase e glutamato sintase (GS/GOGAT) tornando-se disponível para ser metabolizado pelo vegetal. A via GS/GOGAT é muito eficiente na captação da amônia, mas tem a desvantagem de gastar um ATP para cada molécula de glutamina formada. A GDH não é uma via eficiente devida à baixa afinidade que a enzima possui pela amônia, contudo não gasta ATP. Nesta via apenas um NADPH é requerido na assimilação da amônia a glutamato (Postgate, 1989). As enzimas aspartato aminotransferase (AspAT) e asparagina sintase (AS) também atuam na biossíntese destes aminoácidos (Lam et al., 1996).

Estudos sobre Fixação Biológica do Nitrogênio e desenvolvimento de inoculantes vem sendo desenvolvidos e aplicados na produção agrícola obtendo bastante sucesso e desempenhando função ecológica e agrícola importantíssima. Estima-se que quase 50% de toda a entrada de N na Terra seja devido a este processo (Hungria et al., 2007).

As vantagens da FBN são várias, dentre elas destacam-se: o baixo custo, que a torna acessível aos produtores, a inexistência de problemas ambientais, é um processo biológico realizado pela associação simbiótica entre leguminosas e organismos procariotos, e a abundância de nitrogênio gasoso na atmosfera, uma fonte praticamente inesgotável (Raymond et al., 2004; Trevaskis et al., 2002; Sharma et al., 1997; Udvard; Day, 1997; Peters et al., 1995).

2. 2. Formação dos nódulos

A FBN é um processo complexo caracterizado pela formação de associações simbióticas entre raízes de plantas leguminosas e bactérias fixadoras de N₂, pertencentes à família Rhizobiaceae (Trevaskis et al., 2002). Estas bactérias, também denominadas rizóbio, são representadas pelos gêneros *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* sendo estes dois últimos considerados os mais eficientes no fornecimento adequado de nitrogênio (Mercante et al., 2002; Zahran, 1999). Os rizóbios quando associados

com raízes de plantas hospedeiras formam os nódulos radiculares, os quais também podem ser formados no caule, como é o caso de bactérias pertencentes ao gênero *Azorhizobium* (Mercante et al., 2002; Udvard; Day, 1997).

O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias caracteriza-se como um evento dinâmico que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira como na bactéria (Hungria et al., 1994).

Inicialmente o rizóbio é atraído até as raízes da planta hospedeira, numa série de eventos iniciais chamados de estágio pré-infecção. Neste estágio, inicia-se a comunicação molecular entre a planta e o simbiote. As raízes liberam carboidratos, aminoácidos e compostos fenólicos os quais atraem a bactéria à superfície radicular. Além de quimioatraentes, os flavonóides induzem a formação dos nódulos desde que respeitada a especificidade entre o hospedeiro e a bactéria. A quantidade e a natureza dos compostos exsudados pela raiz dependem da planta e do seu estágio de desenvolvimento (Reis, 2005; Straliozzo; Teixeira, 2000).

Em resposta aos flavonóides liberados pela planta hospedeira, os rizóbios ligados aos pêlos radiculares produzem e secretam os fatores Nod (fatores de nodulação) que funcionam como sinais de nodulação. Este fator é responsável pelo reconhecimento entre a bactéria e a planta hospedeira, enrolamento das células do pêlo radicular e indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz. Aderidas à superfície do pêlo radicular, as enzimas bacterianas degradam parte da parede celular e adentram o pêlo radicular, formando um cordão de infecção. O rizóbio se multiplica no interior do cordão de infecção que se alonga até a região do córtex. Liberadas no citoplasma das células corticais, as bactérias induzem a divisão destas células formando o nódulo. Com a formação do nódulo, a bactéria passa por uma série de transformações morfológicas e fisiológicas incluindo a síntese de enzimas como a nitrogenase, catalisadora da reação de fixação do N_2 , e proteínas como a leg-hemoglobina (Hungria et al., 2007; Taiz; Zeiger, 2004; Müller et al., 2000; Straliozzo; Teixeira, 2000).

A leg-hemoglobina é uma proteína responsável pelo transporte de O_2 para as células fixadoras de N_2 nos nódulos. A presença da leg-hemoglobina nos nódulos aumenta a eficiência da fixação do N_2 por suprir o simbiote com o O_2 necessário a sua respiração e, ao mesmo tempo, evitar a inativação da nitrogenase pelo oxigênio (Kerbauy, 2004).

A coloração rósea dos nódulos é devido a leg-hemoglobina, caracterizando eles como ativos fixadores de nitrogênio. O declínio da fixação do nitrogênio inicia-se a partir do início da formação de vagens, indicando o início de senescência dos nódulos. Esse declínio na atividade da nitrogenase começa antes que o processo de senescência dos nódulos,

caracterizado pelo surgimento de nódulos verdes, seja aparente (Vargas; Suhel, 1982) e parece estar associado a um suprimento inadequado de produtos da fotossíntese aos nódulos (Lawn; Brun, 1974). Ao entrar em senescência, a Leg-hemoglobina vermelha dos nódulos ativos se altera para leg-hemoglobina verde e, numa fase mais avançada, os nódulos entram em decomposição (Vargas et al., 1993).

Diversos métodos podem ser utilizados na avaliação da eficiência do processo de fixação biológica do N_2 . Por exemplo, em plantas de soja a distribuição e a coloração dos nódulos das raízes podem dar uma indicação do sucesso da inoculação. Os nódulos presentes na região do colo da raiz principal são formados logo após a emergência das plantas, e provavelmente são provenientes das estirpes inoculadas. Ao contrário dos nódulos presentes nas raízes secundárias e na parte inferior do sistema radicular, os quais indicam que a nodulação ocorreu tardiamente, e provavelmente com as estirpes que já se encontravam no solo. A ausência de nódulos pode indicar inibição devido à presença de N mineral no solo (plantas apresentam-se bem desenvolvidas) ou má qualidade do inoculante (plantas com clorose). Por outro lado, um sistema radicular contendo muitos nódulos pequenos e com o interior esbranquiçado é um indício de deficiência nutricional ou acidez do solo, ou ainda, que os nódulos foram formados por estirpes ineficientes (Hungria et al., 1994; Vargas et al., 1993).

2. 3. Fatores que afetam a nodulação

O estabelecimento da simbiose e a capacidade do endossimbionte em fixar o N_2 é crítica para a produtividade da planta e depende de ambas as partes simbióticas (Christiansen; Dean, 2001; Hungria; Bohrer, 2000). A associação simbiótica irá se desenvolver apenas quando raízes de leguminosas forem infectadas com bactérias capaz de converter o N_2 a amônia (Christeller et al., 1977).

A combinação de fatores internos, ligados a simbiose e, externos de ordem nutricional e ambiental, atuam no estabelecimento de populações de rizóbios inoculadas no solo. Fatores como altas temperaturas, estresse hídrico, acidez do solo, herbicidas, geadas, parasitismo microbiano, predação e competição com populações indígenas estabelecida no solo, deficiência nutricional como cálcio, fósforo e micronutrientes e toxicidade por alumínio são determinantes na nodulação e fixação do N_2 por leguminosas (Araújo et al., 2007; Straliootto; Rumjanek 1999; Epstain, 1975).

Dentre estes fatores altas temperaturas e deficiência hídrica são as maiores causas de ausência de nodulação afetando todos os estágios de simbiose e limitando o crescimento e

sobrevivência do rizóbio no solo. A temperatura elevada pode afetar a síntese de leg-hemoglobina, desnaturar a nitrogenase, acelerar a senescência de nódulos e reduzir a atividade das enzimas que assimilam a amônia resultante da fixação do N₂ (Hungria; Vargas, 2000; Hungria et al., 1994).

A presença e ausência de nitrogênio no solo afeta a simbiose de várias formas. Quando em excesso o N mineral pode causar diminuição da eficiência simbiótica, porém quando em pequenas quantidades aplicadas na cultura do feijão, por exemplo, permite um aumento no crescimento dos nódulos e maior fixação de nitrogênio (Ferreira et al., 2000).

2. 4. Influência da luz na fixação biológica de nitrogênio

A luz, água, temperatura, nutrientes e condições edáficas são componentes ambientais que influenciam de maneira decisiva no desenvolvimento vegetal. Condições inadequada de um desses componentes pode limitar o desenvolvimento da planta.

A disponibilidade de luz é um dos fatores que contribui de forma efetiva no desenvolvimento e crescimento das plantas orientando os movimentos de crescimento, controlando processos de desenvolvimento como a germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas e floração, e participa diretamente na fotossíntese (Douseau et al., 2007; Lima Jr et al., 2006; Kendrick; Frankland, 1981).

A fotossíntese consiste na conversão do CO₂ atmosférico a carboidrato utilizando a luz como fonte de energia. Inicialmente, a radiação luminosa fotossinteticamente ativa, é capturada por pigmentos envolvidos na fotossíntese como as clorofilas, carotenóides e ficobilinas, situados no complexo antena, tornando-se excitados e os elétrons direcionados para os centros de reações (Fotossistema I/P700 e Fotossistema II/P680). A clorofila excitada, concomitante à fotólise da água, doam elétrons e a energia transferida destes resulta na formação de ATP e NADPH utilizados na redução do CO₂ (Ciclo de Calvin e Benson) produzindo açúcares e/ou cadeias de carbono para as rotas de biossíntese (Streit et al., 2005; Larcher, 2000).

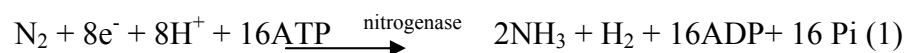
O excesso de luz pode inibir a fotossíntese através de dois processos: foto-inibição e foto-oxidação. A foto-inibição envolve dano aos centros de reação, especialmente P680, quando eles são superexcitados. A foto-oxidação é um processo irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz, os quais, ao absorverem luz em excesso, permanecem excitados por maior tempo e interagem com o O₂ produzindo radicais livres podendo levar a destruição dos pigmentos. Em condições ótimas de luz, a clorofila é constantemente sintetizada (Streit et al., 2005).

Toda energia requerida na realização da fotossíntese é proveniente da radiação solar. Entretanto, apenas 5% da radiação solar total que chega à superfície da Terra é utilizada pelas plantas na formação de carboidratos, o restante é re-emitida em comprimentos de onda maiores, refletida ou perdidas na forma de calor (Taiz; Zeiger, 2004).

A radiação fotossinteticamente ativa absorvida está relacionada com a fixação biológica do nitrogênio em plantas leguminosas, pois este processo depende do produto final da fotossíntese e, a assimilação de nitrogênio é necessária para sustentar a produção de carbono orgânico e nitrogênio (Foyer et al., 2003). Logo, a produção de carboidrato esta intimamente relacionada com a fixação biológica do nitrogênio. A energia e a estrutura molecular para incorporação do N são fornecidas pelo metabolismo dos carboidratos, e os carboidratos são oriundos da fotossíntese. Fechando um ciclo de interdependência metabólica, a fotossíntese depende de compostos contendo nitrogênio, por exemplo, a clorofila e a RUBISCO; e, a assimilação do N necessita da energia e de esqueletos de carbonos oriundos da fotossíntese (Larcher, 2000).

A FBN é considerada uma reação endergônica devido a considerável quantidade de energia requerida na quebra da ligação existente entre os átomos de N₂. A reação de fixação do nitrogênio atmosférico só é possível com auxílio da enzima nitrogenase presente nas bactérias fixadoras de N₂ capaz de romper a tripla ligação covalente de grande estabilidade existente entre os dois átomos de nitrogênio (Kerbaudy, 2004; Larcher, 2000).

O complexo nitrogenase, formado por duas subunidades Fe-proteína e MoFe-proteína, é responsável pela redução do N₂ a duas moléculas de amônia (equação 1).



Para que o processo de redução ocorra são necessárias condições anaeróbicas, enzima nitrogenase, ATP como fonte de energia e um redutor como fonte de elétrons, os quais são oriundos da fotossíntese (Lindblad; Guerrero, 1993; Postgate, 1989).

A disponibilidade de carbono reduzido fotossinteticamente é considerada o maior fator limitante na FBN, pois, grande parte do fotossintato produzido pelas leguminosas são translocados para os nódulos e consumidos garantindo a manutenção do nódulo, a fixação do nitrogênio e a assimilação da amônia (Millhollon; Williams, 1986; Coker; Shubert, 1981; Streeter, 1980; Mahon, 1979). Estimativa anual com leguminosas sugere que 30% do carbono obtido da fotossíntese são utilizados no funcionamento e na manutenção do nódulo e,

aproximadamente 60% do carbono direcionado ao nódulo a partir da partição são perdidos como CO₂ através da respiração (Vance et al., 1983).

Os carboidratos formados na fotossíntese são translocados das folhas para os nódulos, na forma de sacarose. Sua oxidação leva a produção de redutores, NADH⁺ ou NADPH⁺, que são fontes de elétrons para a fixação do nitrogênio (Kerbaudy, 2004).

A produção de carbono reduzido na fotossíntese e sua reoxidação na respiração são etapas necessárias para a produção de energia e esqueletos de carbono necessários para a síntese de formas orgânicas de nitrogênio, as quais são exportadas rapidamente do nódulo para a parte aérea (folhas e vagens) dos hospedeiros, via xilema, pelo fluxo da transpiração (Arruda et al., 2001; Coker; Shubert, 1981).

2. 5. Partição de fotoassimilados ao longo da ontogenia da planta

A produção e a concentração de carboidratos solúveis nos tecidos e órgãos das plantas dependem de inúmeros fatores, tais como aqueles ligados às condições do ambiente (água, luz e temperatura), ao estado nutricional e fisiológico da planta, assim como a disponibilidade de nutrientes presentes no solo (Hermans, et al., 2006; Carvalho et al. 2001). Dentre os nutrientes, o nitrogênio influencia fortemente os processos de assimilação, alocação e partição de carbono no interior da planta (Druege et al., 2004).

A partição de carboidratos entre os diversos órgãos da planta é diferente e varia ao longo de sua ontogenia, regulando seu desenvolvimento e crescimento (Martins, 2007; Sandrin et al., 2006; Roitsch; González, 2004; Larcher, 2000; Willians et al., 2000; Jang; Sheen, 1994; Tanaka; Fujita, 1979), tornando-se mais complexa assim que os vegetais avançam para os estádios sucessivos de crescimento como plântula, planta adulta e senescente (Bloom et al., 1985). Por exemplo, durante a fase vegetativa a maioria dos carboidratos são transportados para as raízes e folhas jovens (Dantas et al., 2007); na antese, a translocação é direcionada para as estruturas reprodutivas onde a atividade metabólica é intensa ficando os outros órgãos deficitários (Tanaka; Fujita, 1979) e, após o florescimento, os carboidratos são direcionados prioritariamente para os frutos, tubérculos e raízes de reserva (Dantas et al., 2007). Entretanto, quando há deficiência em fotoassimilados nesta fase de desenvolvimento a resposta da planta poderá resultar em abortamento de flores e frutos comprometendo a produção. Caso a planta tenha habilidade de acumular reservas em seus órgãos ela pode evitar esse abortamento prevenindo assim a perda da produtividade (Tanaka; Fujita, 1979).

No feijoeiro, o fluxo de carboidratos varia de acordo com seu estágio de desenvolvimento e, até certo ponto, com seu hábito de crescimento (Tanaka; Fujita, 1979).

Antes do florescimento, os fotoassimilados são distribuídos a partir das folhas inferiores e superiores para as raízes e folhas jovens respectivamente; no florescimento, aproximadamente 80% dos assimilados presentes nas folhas intermediárias permanecem na própria folha e nos tecidos circunvizinhos (pecíolos, pecíolulos, flores, vagens pequenas) havendo, nesta fase, pouco direcionamento de carboidratos para as raízes. Quando as vagens já estão desenvolvidas, ou no início do crescimento dos grãos, a maior parte dos fotoassimilados produzidos pelas folhas medianas é destinada aos frutos, sendo que nesta fase as raízes recebem menos assimilados do que no florescimento (Portes, 1996). Lucas et al., (1976) afirmam que a principal fonte de matéria seca para a produção de sementes em leguminosas é obtida durante o período de pós-florescimento não sendo procedente de material acumulado no caule e nas raízes como reserva durante o período vegetativo.

2. 6. Feijão

O feijão (*Phaseolus* spp. L.) é uma das mais antigas culturas do Novo Mundo (Broughton et al., 2003).

Este gênero se originou nas Américas, com centro de origem e domesticação na Mesoamérica (México-Guatemala) e na zona Leste dos Andes (Hungria et al., 1997). Atualmente, é cultivado em aproximadamente 100 países em todo o mundo envolvendo grande número de gêneros e espécies (Araújo et al., 2007). *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus* e *P. lunatus* se destacam como as poucas espécies domesticadas e utilizadas na alimentação, sendo o *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum) a espécie mais cultivada no mundo, e o Brasil se destaca como o maior produtor mundial (Farinelli et al., 2006; Martínez-Romero, 2003).

Phaseolus vulgaris L. é uma leguminosa de alto valor nutricional por se destacar como uma excelente fonte de carboidratos, fibras, vitaminas e alguns minerais (Fialho et al., 2006; Mejia et al., 2005). A grande importância dada a este gênero é devido ao fato deste representar uma importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, particularmente nas Américas e no Leste e Sul da África (Yokoyama 2002). Em alguns países, como México e Brasil, o feijão é a fonte primária de proteínas na dieta humana sendo que, 20% da proteína disponível nos países em desenvolvimento é proveniente do feijão (Sánchez et al., 2005; Broughton et al., 2003).

O feijoeiro é uma leguminosa de ciclo curto, muito sensível a fatores climáticos extremos como alta ou baixa umidade do solo, alta ou baixa temperatura do ar, ventos fortes, além de ser muito suscetível a pragas e doenças (Almeida et al., 2000; Portes, 1996). Devido,

principalmente ao seu sistema radicular reduzido e pouco profundo e ser muito exigente em nutrientes, estes devem ser colocados à disposição da planta de forma que fiquem próximos ao sistema radicular para serem absorvidos no momento em que a planta os necessitar (Meira et al., 2005).

O nitrogênio é um elemento essencial às plantas e sua carência é observada em quase todos os solos (Carvalho et al., 2003). Na cultura do feijoeiro é o nutriente exigido em maior quantidade, devendo este ser aplicado no florescimento, época de maior demanda (Meira et al., 2005; Carvalho et al., 2003).

A adubação nitrogenada é uma prática cultural, normalmente, utilizada pelos produtores de feijão. Na cultura da soja, como na maioria das espécies cultivadas, o fornecimento de fertilizantes nitrogenados apresenta baixa eficiência de utilização por parte da planta devido às perdas elevadas que ocorrem, principalmente, por lixiviação e volatilização, não chegando a ultrapassar 50% de aproveitamento do nitrogênio aplicado na cultura na forma de adubação nitrogenada (Silveira et al., 2003; Araújo; Hungria, 1999; Lima et al., 1998).

Assim, como outras leguminosas, o feijoeiro apresenta a propriedade de fixar o nitrogênio presente na atmosfera quando em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, contribuindo para a economia de nitrogênio mineral (Romanini Junior et al., 2007). A inoculação é muitas vezes limitada, devido as características intrínsecas da planta, como a baixa capacidade de FBN de algumas cultivares, a alta suscetibilidade a estresses ambientais, ao ataque de pragas e doenças, as características intrínsecas das estirpes do rizóbio, como baixa capacidade competitiva e eficiência no processo de FBN (Hungria et al., 1997).

A inoculação das sementes do feijoeiro com bactérias do gênero *Rhizobium* apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo para fornecimento de nitrogênio às plantas podendo contribuir para reverter o quadro de queda da produtividade no país (Hungria et al., 1997). No entanto, essa tecnologia possui, ainda, descrédito quanto à capacidade do feijoeiro em fixar nitrogênio atmosférico em quantidades suficientes para suprir suas exigências de produção em associação simbiótica, a ponto de recomendar o uso de fertilizantes nitrogenados para a cultura (Vargas e al., 1990 apud Romanini Junior et al., 2007). Logo, como a prática de inoculação do feijoeiro é ainda recente, fazem-se necessárias informações mais precisas sobre o assunto para que a mesma possa ser difundida e utilizada rotineiramente (Ferreira et al., 2000).

2. 7. Soja

A soja, é uma planta herbácea, pertencente à família das Leguminosas (Gomes, 1986) introduzida no Brasil e que tem sido cultivada desde 1960 (Hungria et al., 2001).

Dentre as oleaginosas cultivadas como algodão, amendoim e girassol, a soja é a mais cultivada no mundo estando a produção mundial de soja restrita, principalmente, aos Estados Unidos, ao Brasil e a Argentina. Esses países participam com 80% da produção e 90% da comercialização mundial de soja (Roessing; Guedes, 1993).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de soja (Lima et al., 1998), sendo superado apenas pelos Estados Unidos em termos de área cultivada e de produção total (Braccini et al., 2003). O Brasil é responsável pela produção de cerca de 20% da soja mundial (Miranda et al., 2006), cuja produção se concentra nas regiões Centro-Oeste e Sul (Ribeiro; Costa, 2000).

A importância da cultura da soja, no Brasil, é cada vez maior, não só pelo seu grande valor sócio-econômico, o qual é determinado pelas inúmeras aplicações de seus produtos e subprodutos e expressão no mercado interno e exportação (Braccini et al., 2003), mas pela elevada taxa de proteína em seus grãos, cerca de 40%, o que torna seu uso cada vez mais freqüente, direta ou indiretamente, na alimentação (Vargas; Hungria, 1997).

O nitrogênio proveniente da mineralização do N nos solos dos cerrados é geralmente, insuficiente para as culturas que apresentam grande demanda desse nutriente, como a soja, que chega a acumular mais de 150 Kg/ha de N nos grãos (Vargas; Hungria, 1997). Assim o uso de fertilizantes nitrogenados para complementar o N fornecido pelo solo torna-se praticamente inviável. Dessa forma, o sucesso da cultura está estreitamente relacionado à eficiência da associação com o seu microssimbionte (Vargas; Hungria, 1997).

A soja é a cultura anual de maior expressão econômica no Brasil, sendo que o seu cultivo no país se tornou viável, em grande parte, devido à sua capacidade de, em associação com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, fixar o nitrogênio atmosférico para a sua nutrição (Vargas et al., 1993).

A nodulação adequada de soja, avaliada no início da floração, situa-se em torno de 100 mg e 15 nódulos por planta. Uma vez estabelecida a nodulação, em níveis adequados, a soja é capaz de obter toda a quantidade de nitrogênio que necessita para seu desenvolvimento através da fixação simbiótica com bactéria do gênero *Bradyrhizobium* (Vargas et al., 1993). Por isso, deve-se evitar a adubação com nitrogênio mineral, pois além dele inibir a nodulação e reduzir a eficiência da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, esta técnica não aumenta a produtividade (Hungria et al., 2007).

Como é uma leguminosa introduzida e originária do leste da Ásia, é uma das poucas espécies que se associa com *Bradyrhizobium japonicum* (Lima et al., 1998; Marr et al., 1997). Portanto, é pouco provável a ocorrência natural dessa bactéria em nossos solos, entretanto há possibilidades de que algumas das estirpes introduzidas no solo, juntamente com as sementes ou através de inoculação artificial, sobrevivam e se “naturalizem” (Lima et al., 1998). O processo de FBN atinge seu ponto máximo no estágio de floração plena e declina a partir do enchimento dos grãos participando no suprimento de N durante todo o ciclo da cultura (Vargas et al., 1993).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram conduzidos oito experimentos no ano de 2008, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, localizado na cidade de Goiânia, Goiás, cujas coordenadas são: 16° 36' 12" S e 49° 15' 35" O. Para efeito de descrição dos experimentos eles foram numerados de 1 a 8.

Em todos os experimentos foram utilizados, como material vegetal, duas espécies de leguminosas, – feijão (*Phaseolus vulgaris* L., cv Rudá) e soja (*Glycine max* (L.) Merr., cv. M-soy – 7908), gentilmente cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás e, Sementes Adriana - localizada na Serra da Petrovina – Alto Garças – MT, respectivamente.

O solo utilizado como substrato nos experimentos 1, 2, 3 e 4 foi coletado próximo à casa de vegetação. Para tal foi retirada uma camada até a profundidade de 0,20 m, devidamente misturada e então utilizada no enchimento dos vasos. Uma amostra de 300 g foi coletada e conduzida ao Laboratório de Análises de Solo e Foliar (LASF) da Escola de Agronomia (EA/UFG) para análise química (Tabela 1).

Tabela 1 - Características químicas do solo avaliadas na camada de 0,0m – 0,2m de profundidade antes do plantio do primeiro semestre.

MO %	pH (CaCl ₂)	P (disponível) ------(mg/dm ³)-----	K	Ca	Mg	Al	CTC
3	5	6,2	67	3,5	0,4	0	7,6

MO: matéria orgânica; CTC: Capacidade de Troca de Cátions.

Foi feita adubação de correção segundo a análise química do solo. Os vasos, contendo 7kg de solo cada um, destinados ao semeio das sementes de feijão e soja, foram adubados com 1,225 g da mistura 4-30-10 e 5,25g da 2-20-10 de NPK/vaso, respectivamente.

O solo utilizado como substrato nos experimentos 5 a 8 conduzidos em ambiente externo à casa de vegetação foi coletado nas proximidade da mesma, porém em local diferente dos experimentos 1, 2, 3 e 4. A análise química deste solo está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Características químicas do solo avaliadas na camada de 0,0m – 0,2m de profundidade antes do plantio do primeiro semestre.

MO	pH	P disponível	K	Ca	Mg	Al	CTC
----	----	--------------	---	----	----	----	-----

%	(CaCl ₂)	------(mg/dm ³)-----		-----cmolc/dm ³ -----			
2,8	5,2	2,3	44	5,7	0,5	0	9,4

MO: matéria orgânica; CTC: Capacidade de Troca de Cátions.

Nestes experimentos (5 a 8), os vasos destinados ao cultivo de feijão e soja, contendo 10 kg de solo, foram adubados com 4,77 g da mistura 4-30-15 e 6,36 g da 2-20-20 de NPK/vaso, respectivamente.

Após a adubação, o solo foi umedecido e após três dias efetuou-se a semeadura. O solo utilizado em todos os experimentos não foi esterilizado objetivando simular condições naturais de campo.

A inoculação de sementes de feijão com estirpes de *Rhizobium tropici*, e sementes de soja com *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* procedeu de acordo com as prescrições do fabricante.

3. 1. Delineamento experimental.

Os experimentos 1, 2, 3 e 4 foram conduzidos em casa de vegetação (Figura 1), no período de 23 de maio a 07 de julho de 2008 utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições.



Figura 1 - Plantas de feijão e soja cultivadas em casa de vegetação no período referente ao pós-florescimento estando algumas unidades experimentais sombreadas.

Experimento 1- Consistiu de 4 tratamentos (2 x 2). Avaliaram-se os nódulos em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni) com rizóbios (*Rhizobium tropici* - Semia 4088), em duas épocas fenológicas, antes (Ep1) e após à floração (Ep2).

Experimento 2 - Neste experimento foram conduzidos 6 tratamentos (2 x 3). Avaliou-se os nódulos em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), submetidas a três níveis de intensidade luminosa (sem sombreamento, 70% e 80% de sombra).

Experimento 3 - Consistiu de 4 tratamentos (2 x 2). Avaliou-se os nódulos em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5079) e *Bradyrhizobium elkanii* (Semia 587), em duas épocas fenológicas, antes (Ep1) e após à floração (Ep2).

Experimento 4 – Consistiu de 6 tratamentos (2 x 3). Avaliou-se os nódulos em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni) submetidas a três níveis de intensidade luminosa, igual ao experimento 2, (sem sombreamento, 70% e 80% de sombra).

Em função do número elevado de vasos e do tamanho reduzido da estufa acredita-se ter ocorrido contaminação entre os tratamentos dos experimentos 1, 2, 3 e 4. Por tal razão, conduziu-se os experimentos em ambiente externo à casa de vegetação (Figura 2), objetivando reduzir o máximo possível de contaminação bacteriana entre os tratamentos.



Figura 2 - Plantas de feijão e soja, no período vegetativo, cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Os experimentos 5, 6, 7 e 8 foram conduzidos no período de 01 setembro a 20 de novembro, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições.

Estes experimentos seguiram os mesmos procedimentos adotados nos experimentos 1, 2, 3 e 4 diferindo apenas quanto ao número de repetições e ao sombreamento, que se deu em dois níveis de luz: luz plena e 80% de sombra.

3. 2. Sombreamento

O sombreamento foi aplicado na antese (Ep2), em ambas as espécies, a partir do início da floração, e a quantidade de luz transmitida ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) pelo sombrite foi determinada utilizando o sensor de luz da Licor, modelo LI-1600.

3. 3. Semeio e tratos culturais

Os quatro primeiros experimentos tiveram início no dia 23 de abril de 2008, e os demais no dia 1 de setembro de 2008. Ambas as espécies foram desbastados dez dias após a emergência (DAE), permanecendo duas plantas por vaso.

No decorrer do experimento e sempre que necessário as plantas foram irrigadas manualmente. Os tratamentos que não receberam inoculantes foram sempre os primeiros a serem irrigados para evitar contaminação.

Durante o desenvolvimento da cultura foram realizadas aplicações dos defensivos, Vertimec (0,5 mL/1L) e Sumidan 25 EC (1 mL/L) no controle de ácaros e vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*), respectivamente.

3. 4. Análise estatística

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos à ANOVA ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando o programa estatístico Sisvar. Cada experimento foi avaliado separadamente.

3. 5. Coleta das amostras vegetais.

Nos experimentos desenvolvidos em casa de vegetação a primeira avaliação das plantas de feijão e soja foi realizada no dia 3 de junho de 2008 aos 37 DAE (Dias Após a Emergência), correspondendo ao período que antecedeu à floração. Foram avaliadas 16 parcelas, sendo 8 parcelas de feijão e 8 parcelas de soja, as quais não foram submetidas ao tratamento de sombreamento. A segunda avaliação foi realizada após à floração no momento em que estava ocorrendo o enchimento de grãos, sendo a coleta do feijão realizada no dia 20 de junho de 2008 (54 DAE) e a da soja no dia 2 de julho de 2008 (66 DAE). Nesta foram avaliadas 24 parcelas para cada espécie vegetal, sendo 16 sombreadas e 8 não sombreadas, totalizando 48 parcelas experimentais. A coleta das plantas ocorreram em dias diferentes em virtude das diferenças ontogênicas das espécies, permanecendo o feijão sombreado por 20 dias e a soja por 27 dias.

Nos experimentos desenvolvidos em ambiente externo à casa de vegetação, a primeira coleta foi realizada no dia 15 de outubro de 2008 (39 DAE) para o feijão e, no dia 18 de

outubro de 2008 (42 DAE) para a soja, avaliando nesta época 6 parcelas de feijão e 6 parcelas de soja, as quais não foram submetidas ao tratamento de sombreamento. A segunda coleta foi realizada após à floração nos dias 3 de novembro de 2008 (58 DAE) para o feijão e 19 de novembro de 2008 (74 DAE) para a soja. Nesta foram avaliadas 6 parcelas que receberam luz plena e, 6 parcelas que receberam 80% de sombra, para cada espécie vegetal. Neste experimento, o feijão permaneceu sombreado por 19 dias e a soja por 36 dias.

3. 6. Parâmetros avaliados

Em cada experimento os nódulos foram avaliados quanto à atividade respiratória (liberação de CO₂), massa fresca, volume, número, atividade, massa seca e classificação dos nódulos em ativos e inativos quanto a sua coloração. Também foram determinados o volume de raízes e massa seca de raízes, ramos, folhas e vagens, esta última avaliada no período reprodutivo (Ep2).

Nos experimentos 5, 6, 7 e 8 foram avaliados os parâmetros citados anteriormente mais a determinação da concentração de clorofila.

As avaliações foram realizadas no laboratório de Fisiologia Vegetal localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB 1), sempre entre as 8:00 e 17:00 horas.

Para a realização destas avaliações, a parte aérea foi separada da raiz na altura do coleto. Em seguida, as raízes de cada parcela foram lavadas separadamente em água corrente em peneira de arame, evitando a perda de raízes e nódulos.

Posteriormente, já no laboratório, os nódulos foram retirados das raízes manualmente utilizando pinça anatômica e acondicionados em placas de petri, contendo fina camada de água destilada, suficiente para mantê-los úmidos, até o momento das análises.

3. 6. 1. Método usado para as medições da respiração dos nódulos.

Para a determinação respiratória foi usado o método potenciométrico. Este método baseia-se na medição da variação do pH de uma solução diluída de NaHCO₃ (0,001N) e KCl (0,099N) em função da concentração de CO₂ do ar. O valor do pH é proporcional à concentração de CO₂ presente no ar em equilíbrio com a solução (Lei de Henry).

O aparelho utilizado no desenvolvimento do Método Potenciométrico (Figura 3), baseia-se na circulação de ar através de uma solução, em circuito fechado. A circulação de ar é efetuada por uma bomba e o borbulhamento é realizado num frasco de Erlenmeyer adaptado contendo um medidor de pH e um termômetro.

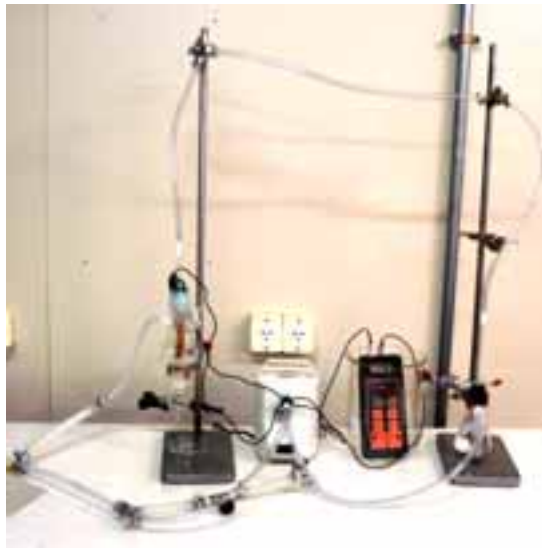


Figura 3 - Aparelho utilizado na determinação da respiração dos nódulos pelo Método Potenciométrico.

Este aparelho determina a respiração dos nódulos através da quantidade de CO_2 liberado na respiração a partir da determinação do pH e temperatura da solução. A concentração de CO_2 é lida em tabela (Anexo I), tendo-se pH e temperatura da solução tampão.

3. 6. 2. Determinação da Atividade Respiratória nos Nódulos.

Após a retirada dos nódulos das raízes, os mesmos foram lavados em água destilada e, em seguida, submetidos à medida da atividade respiratória.

Acondicionados em uma pequena trouxinha de gase, os nódulos foram introduzidos ao Erlenmeyer conectado ao dispositivo para realizar a medição. Para a leitura da quantidade de CO_2 os seguintes passos foram seguidos:

- I. Colocou-se 25 mL da solução tampão, cujo pH é de 7,84 à 28,3 °C, em recipiente adaptado contendo o eletrodo de pH e termômetro. O mesmo foi fechado com parafilme deixando aberto apenas o kitasato. Com auxílio de uma pequena bomba borbulhou-se ar na solução durante 3 minutos para estabelecer o equilíbrio entre o CO_2 do ar/atmosfera e o CO_2 dissolvido na solução.
- II. Em seguida, o kitasato foi fechado, com rolha de borracha conectada a um tubo de vidro, e circulou-se o ar por mais 10 minutos. Transcorrido este tempo, os valores de pH inicial (pH_i) e temperatura inicial (T_i) foram lidos.
- III. Para medir a respiração nos nódulos eles foram envoltos em gaze dobrada em três partes, e introduzidos no kitasato. Os nódulos permaneceram em repouso por 30

segundos. Passado esse tempo, o ar foi borbulhado na referida solução por 5 minutos.

IV. Leu-se então o pH final (pH_f) e temperatura final (T_f).

V. A concentração de CO_2 , em mg por litro (mg.L^{-1}) de ar, foi determinada utilizando a tabela do anexo I. A respiração foi calculada subtraindo a concentração de CO_2 do ar determinada na etapa II da concentração de CO_2 do ar determinada na etapa IV.

3. 6. 3. Número e Massa fresca de nódulos

Os nódulos foram contados manualmente e o peso fresco foi obtido através da pesagem (g) dos nódulos em balança de precisão.

3. 6. 4. Volume dos nódulos.

Utilizou-se o método de deslocamento de volume. Para esta determinação utilizou-se uma proveta de vidro graduada de 100 mL. Nesta proveta adicionou-se 50 mL de água e, em seguida, os nódulos. O volume (cm^3) deslocado foi adotado como o volume da amostra.

3. 6. 5. Classificação dos nódulos em ativos e inativos quanto a sua coloração.

Para constatar a aparência dos nódulos foram efetuadas amostragem aleatórias de 5 nódulos frescos, por planta, os quais eram cortados transversalmente com uma lâmina de aço.

A aparência foi avaliada de acordo com a coloração. Quando seu interior estava rosado, o nódulo foi considerado ativo, e, quando o interior estava branco ou verde, o nódulo foi considerado inativo. Nódulos em decomposição foram descartados.

3. 6. 6. Secagem e obtenção de massa seca dos nódulos.

Os nódulos pertencentes a cada parcela foram colocados em sacos de papel e postos para secar em estufa de ventilação forçada à temperatura de 50°C até obter massa constante. Após a secagem, a massa seca (g) foi obtida pesando os mesmos em balança de precisão.

3. 6. 7. Preparo da parte aérea para determinação da massa seca.

Na obtenção da massa seca (g) da parte aérea, as folhas, os ramos e as vagens (quando presentes) foram separados e lavados. As raízes, após a retirada dos nódulos, também foram submetidas a este mesmo procedimento. Para retirada do excesso de água, os mesmos foram colocados na bancada sobre folhas de papel toalha e, em seguida, foram acondicionados em

sacos de papel identificados com o tratamento, o órgão (raiz, ramo, folha e vagem) e postos para secar em estufa de ventilação forçada à temperatura de 50 °C até obter massa constante.

A massa seca foi obtida utilizando balança de precisão.

3. 6. 8. Medidas de temperatura e umidade.

A temperatura e umidade relativa do ar foram mensuradas às 8:00 e 16:00 horas utilizando termômetro de máxima e mínima para determinação da temperatura ambiente e termo higrômetro da INCOTERM para determinação da umidade.

No Experimento I a temperatura atingiu máxima de 30 °C e mínima de 19 °C e a umidade relativa do ar oscilou entre 77 e 45%.

No experimento desenvolvido em ambiente externo à casa de vegetação, a temperatura média no período da manhã foi de 30 °C e no período da tarde foi de 27 °C. A umidade relativa durante este experimento oscilou entre 59 e 51%.

3. 6. 9. Determinação do nitrogênio total foliar

Esta análise foi realizada no LASF da Escola de Agronomia utilizando o Método Kjeldahl.

3. 6. 10. Determinação da concentração de clorofila

A dosagem de clorofila foi realizada antes e após a floração. Na pré-floração, as folhas foram coletadas aos 38 DAE para o feijão e para a soja. Após a floração, as folhas foram coletadas aos 57 DAE para o feijão e aos 73 DAE para as plantas de soja.

Para esta análise, foram utilizados folíolos medianos adultos localizados no terço médio de plantas de feijão e soja. Cinquenta miligramas de discos foliares extraídos dos folíolos foram introduzidos em tubetes de plástico com tampa, envoltos por papel alumínio (para manter a solução protegida da luz) contendo 10 mL de solução extratora (acetona 80%) e preparados em triplicatas para cada repetição.

As amostras permaneceram na geladeira aproximadamente por três dias até a retirada completa da clorofila do tecido. Transcorrido este tempo, foram realizadas as leituras de absorvância da clorofila *a* e clorofila *b* nos comprimentos de onda de 663 nm e 645 nm, respectivamente, utilizando-se o espectrofotômetro modelo Metertek SP – 850.

Para o cálculo do teor de clorofila *a* e *b* em µg/mg foram utilizadas as seguintes equações propostas por Arnon (1949):

$$\text{Clorofila } a = [(12,7 \times A_{663\text{nm}}) - (2,69 \times A_{645\text{nm}})] \times 10\text{mL}/[\text{peso (50mg)} \times 1000] \quad (2)$$

$$\text{Clorofila } b = [(22,9 \times A_{645\text{nm}}) - (4,48 \times A_{663\text{nm}})] \times 10\text{mL} / [\text{peso (50mg)} \times 1000] \quad (3)$$

Onde:

A = absorvância no comprimento de onda indicado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Experimento 1: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivado em casa de vegetação.

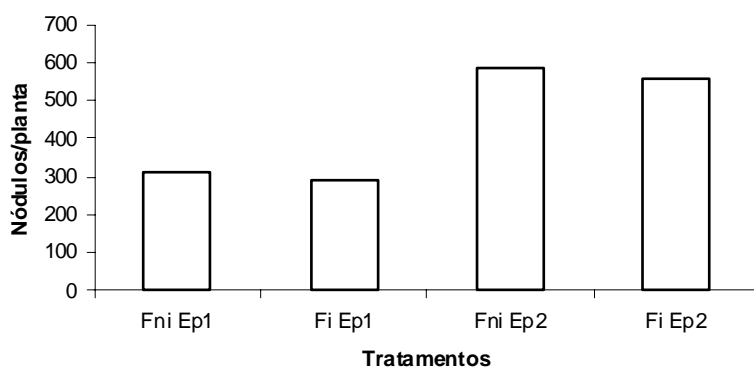
O número de nódulos em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) variou significativamente entre os estádios de desenvolvimento, isto é, antes do florescimento (Ep1), e após o florescimento, (Ep2). No tratamento Fni Ep2 as plantas apresentaram o maior número de nódulos comparado às plantas do tratamento Fi Ep1, mostrando que a nodulação continuou acontecendo mesmo após a floração (Tabela 3).

Tabela 3 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS), e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .nod ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Fni Ep1	312,625bc	2,313bc	7,277a	2,256b	0,346bc	4,000ab
Fi Ep1	289,125c	1,875c	6,381a	2,032b	0,308c	4,250a
Fni Ep2	583,375a	4,250a	7,716a	3,989a	0,592a	2,000c
Fi Ep2	554,398ab	4,125ab	7,455a	3,864a	0,539ab	2,063bc
CV (%)	28,75	28,03	25,26	23,87	24,06	30,46

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

A ocorrência de nódulos nas plantas não inoculadas (Fni) demonstra a possível presença de estirpes nativas de *Rhizobium* no solo às quais podem ter limitado o estabelecimento das estirpes inoculadas. Esta evidência é em função do número de nódulo encontrado no tratamento não inoculado ter sido elevado chegando a superar as plantas dos tratamentos Fi Ep1 e Fi Ep2 (Figura 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2007) e Ferreira et al. (2000). A ocorrência de nódulos em plantas não inoculadas também pode estar relacionada a possível contaminação das plantas testemunhas por estirpes utilizadas nos tratamentos inoculados.



□ Número de nódulo

Figura 4 – Número de nódulos por planta de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliada em dois períodos fenológicos, antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivada em casa de vegetação.

Em relação ao volume de nódulos por planta em feijoeiro, o tratamento Fni Ep2 deferiu ($p \leq 0,05$) apresentando a maior média comparada ao tratamento Fi Ep1 (Tabela 3) (Figura 5). O incremento no volume dos nódulos na Ep2 é devido ao aumento no número de nódulos e conseqüente aumento no acúmulo de biomassa nodular.

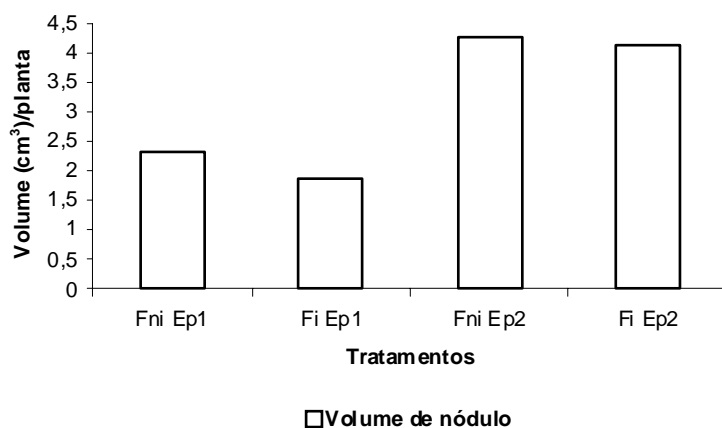


Figura 5 - Volume de nódulos por planta de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliado antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivado em casa de vegetação.

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos em relação ao volume por nódulo (V/Nod) (Tabela 3).

Quanto à massa fresca e massa seca avaliadas em plantas de feijão, houve diferença significativa pelo teste de Tukey entre os tratamentos testados (Tabela 3). As plantas de feijão avaliadas após a floração (Fni Ep2 e Fi Ep2) diferiram daquelas avaliadas antes da floração (Fni Ep1 e Fi Ep1), indiferentemente da presença e/ou ausência de inoculante (Tabela 3).

Analisando o número de nódulos ativos observa-se que as plantas do tratamento Fi Ep1 apresentaram as maiores médias estatisticamente ($p \leq 0,05$) das plantas do tratamento Fni Ep2 (Figura 6).

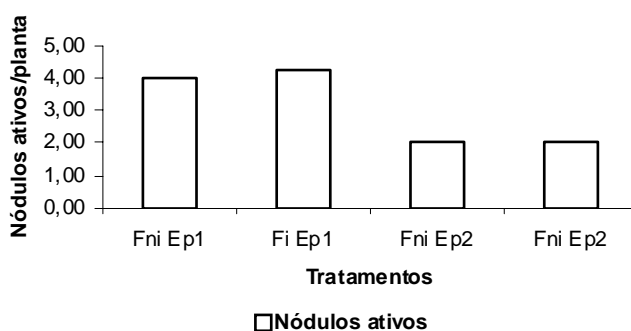


Figura 6 – Número de nódulos ativos por planta em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliado antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivado em casa de vegetação.

A quantidade de nódulos ativos não diferiu entre as plantas inoculadas e não inoculadas dentro da mesma época, mas houve diferença ao se comparar as duas épocas (Tabela 3), logo o estágio de desenvolvimento foi determinante na manutenção da atividade dos nódulos.

Estes resultados (Figura 6) sugerem que durante o estágio reprodutivo (Ep2) o feijoeiro reduz a quantidade de fotossintato alocado para os nódulos, resultando na sua inanição com conseqüente aumento do número de nódulos inativos (Figura 7) priorizando a alocação de carboidratos para outros órgãos da parte aérea da planta.



Figura 7 - Ontogênese de nódulos em feijoeiro cultivado em casa de vegetação. A: nódulos ativos (rosados) e inativos (verdes); B: nódulo em estágio senescente.

De acordo com Martins (2007) a alocação de carboidratos entre os diversos órgãos das plantas oscila ao longo da ontogenia do vegetal, sendo que no feijoeiro Tanaka & Fujita (1979) afirmam que o fluxo de carboidratos varia de acordo com seu estágio de desenvolvimento.

Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos em relação ao CO_2 liberado pelos nódulos por planta, CO_2 liberado por volume de nódulos ($\text{CO}_2/\text{V.nod}^{-1}$) e CO_2 liberado por massa seca de nódulos ($\text{CO}_2/\text{MS.nod}^{-1}$). As variações entre as leituras foram elevadas, resultando em valores altos de CV e, conseqüentemente anulando as diferenças entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 - Média de CO₂ liberado pelos nódulos por planta (CO₂), por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ (mg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /V.nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ .cm ⁻³)	CO ₂ /MS.nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
Fni Ep1	0,307a	43,262a	0,922a
Fi Ep1	0,310a	48,774a	0,997a
Fni Ep2	0,699a	101,069a	1,205a
Fi Ep2	0,691a	97,789a	1,303a
CV (%)	49,79	60,01	41,66

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Embora não havendo diferenças significativas entre os tratamentos, verificou-se que os valores médios de CO₂ liberado por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) apresentaram uma tendência para serem maiores após a floração (Figura 8).

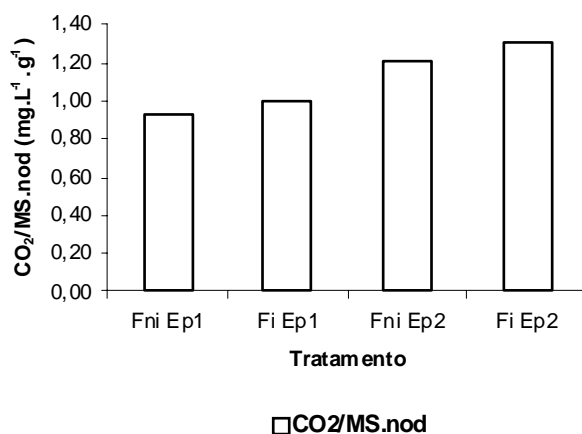


Figura 8 – Quantidade de CO₂ liberado por massa seca de nódulos em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em casa de vegetação.

A atividade respiratória tendeu ao aumento após a floração (Ep2) (Figura 8), período em que se observou o menor número de nódulos ativos (Figura 6). Isto sugere que a atividade respiratória esteja mais proporcional à massa de nódulos (Tabela 3) como um todo, do que com a quantidade de nódulos ativos.

A quantidade de massa seca de raiz não diferiu entre os tratamentos de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2) (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Fni Ep1	2,231a	1,399b	2,134ab	3,003a
Fi Ep1	2,057a	1,286b	2,021b	3,555a
Fni Ep2	2,717a	2,956a	3,404ab	3,325a
Fi Ep2	2,957a	3,288a	3,688a	2,660a
CV (%)	22,30	30,58	27,90	23,25

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

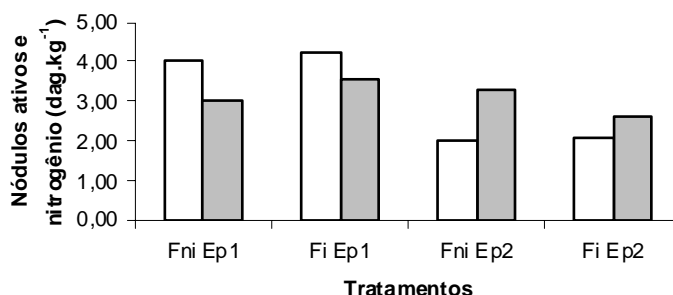
Analisando a massa seca de ramo (Tabela 5) observa-se que as plantas dos tratamentos Fni Ep2 e Fi Ep2 apresentaram as maiores médias diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) das plantas dos tratamentos avaliados antes da floração (Ep2).

Quanto à massa seca de folha, as plantas do tratamento Fi Ep2 apresentaram as maiores médias diferindo estatisticamente das do tratamento Fi Ep1 (Tabela 5). Estes dados mostram que na fase reprodutiva a planta continuou investindo no desenvolvimento vegetativo da parte aérea, porém menos no desenvolvimento de raízes, pois neste caso não houve diferença ($p \geq 0,05$). Portes (1996) afirma que na floração aproximadamente 80% dos assimilados presentes nas folhas intermediárias permanecem na própria folha e nos tecidos circunvizinhos (peciolos, peciólulos, flores, vagens pequenas, etc.) havendo, nesta fase, pouco direcionamento de carboidratos para as raízes.

As médias do teor de nitrogênio foliar não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, mas houve tendência das plantas inoculadas avaliadas na época 2 apresentarem menor média em relação as demais (Tabela 5). Isso reforça a idéia de que a alocação de carboidratos para os nódulos foi reduzida durante o período reprodutivo limitando a FBN.

Avaliando o teor de nitrogênio total nas folhas de feijoeiro, observou-se que a fixação de nitrogênio (Tabela 5) não é proporcional à nodulação, e sim à atividade dos mesmos. Comparadas ao tratamento Fi Ep1, observa-se uma redução numérica no nitrogênio total nas plantas dos tratamentos Fni Ep2 e Fi Ep2 que foram os

tratamentos que apresentaram de nódulos (Figura 9). Carvalho



que apresentaram o menor número de nódulos ativos (Figura 9). Carvalho afirma

que a quantidade de nódulos não é diretamente proporcional a maior quantidade de N fixado pela planta, reforçando a idéia de que a relação entre a FBN pelo feijoeiro e número de nódulos não é linear.

Figura 9 - Teor de nitrogênio total foliar em relação ao número de nódulos ativos por planta em feijoeiro inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivado em casa de vegetação.

De modo geral, o crescimento das plantas de feijão ocorreu normalmente, sem aparecimento de sintomas de deficiência de N. Esse fato indica que a elevada nodulação apresentada pela cultivar neste estudo proporcionou o crescimento satisfatório das plantas. Resultados semelhantes foram encontrados por Xavier et al. (2007).

4. 2. Experimento 2: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, submetidos a diferentes níveis de sombreamento, em condições de casa de vegetação.

As médias de nódulos quanto ao número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (PF), massa seca de nódulos (PS) e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) submetidos a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .nod ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Fni 0%	583,375ab	4,250a	7,716a	3,989ab	0,592a	2,000a
Fi 0%	554,938ab	4,125a	7,455a	3,864ab	0,539a	2,063a
Fni 70%	530,500b	3,750a	7,049a	3,658ab	0,549a	0,875a
Fi 70%	457,375b	3,750a	8,176a	3,733ab	0,561a	1,125a
Fni 80%	421,625b	3,250a	7,684a	3,065b	0,457a	1,625a
Fi 80%	893,375a	4,875a	5,692a	5,274a	0,686a	1,250a
CV (%)	27,12	24,21a	18,28	18,48	18,76	47,76

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

As plantas do tratamento Fi 80% apresentaram a maior média quanto ao número de nódulos comparada às do tratamento Fni 70%, Fi 70% e Fni 80% (estatisticamente iguais entre si). Ao contrário do que era esperado (menor número de nódulos nas plantas sombreadas) o tratamento de 80% de sombra aplicada às plantas de feijão inoculadas aparentemente não foi suficiente para interferir na relação fonte-dreno, limitando o fluxo de carboidratos para os nódulos, pelo contrário, aparentemente, ele favoreceu o desenvolvimento dos nódulos (Figura 10). Daros et al. (2000) afirmaram que o efeito do sombreamento artificial das plantas na relação fonte-dreno depende da duração e da intensidade do sombreamento.

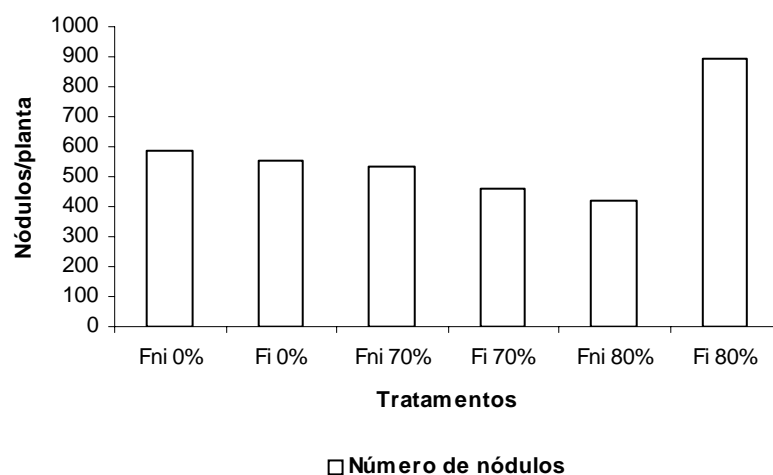


Figura 10 - Número de nódulos em plantas de feijão cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento avaliados após a floração (Ep2), em casa de vegetação.

Uma possível explicação para a maior nodulação nas plantas do tratamento Fi 80% é que as plantas se desenvolvendo naturalmente no campo, o sombreamento ocorre de forma natural pela sobreposição das folhas sem alteração de outros fatores do meio. No sombreamento artificial, com sombrite, pode ocorrer alteração na ventilação, temperatura, transpiração das plantas e até na umidade, tanto do ar como do solo. Estas alterações podem ter favorecido o desenvolvimento dos nódulos. Portanto, outros fatores estariam envolvidos nestes resultados e não somente o sombreamento.

Hungria et al. (1985) avaliando o efeito do sombreamento na FBN em feijoeiro verificaram que quando se realizou um sombreamento de 25%, houve um aumento, em relação a luminosidade total, na massa de matéria seca, atividade da nitrogenase, nitrogênio total transportado na seiva do xilema, percentagem de N transportado sob a forma de ureídos, e do nitrogênio-total acumulado na parte aérea. Os autores relatam que o efeito favorável do sombreamento de 25% foi atribuído a redução das temperaturas máximas diurnas nos vasos sombreados e à redução da energia solar foi compensada por um aumento na área foliar. Eles ainda afirmam que, de modo geral, as temperaturas elevadas não prejudicaram a formação e crescimento dos nódulos em raízes de feijão, mas sim o seu funcionamento, refletido na menor atividade da nitrogenase e no menor acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) para os valores de volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA).

Quanto à massa fresca de nódulos, as plantas do tratamento Fi 80% apresentaram a maior média comparada à do tratamento Fni 80%. As médias das plantas pertencentes aos

tratamentos Fni 0%, Fi 0%, Fni 70% e Fi 70% não diferiram estatisticamente entre si ($p \geq 0,05$) quanto a este parâmetro.

Na Tabela 7 estão as médias de respiração nodular dos tratamentos das plantas de feijão submetidas a diferentes níveis de sombreamento. Quanto ao CO_2 liberado dos nódulos por planta, por volume de nódulos e por massa seca de nódulos não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p \geq 0,05$).

Tabela 7 - Média de CO_2 liberado pelos nódulos por planta (CO_2), por volume de nódulo ($\text{CO}_2/\text{V.nod}^{-1}$) e por massa seca de nódulos ($\text{CO}_2/\text{MS.nod}^{-1}$) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) submetidos a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Tratamento	CO_2 (planta ⁻¹)	$\text{CO}_2/\text{V.nod}^{-1}$ (mg.L ⁻¹ .cm ⁻³)	$\text{CO}_2/\text{MS.nod}$ (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
Fni 0%	0,699a	101,069a	1,205a
Fi 0%	0,691a	97,789a	1,303a
Fni 70%	0,616a	86,734a	1,148a
Fi 70%	0,718a	90,264a	1,324a
Fni 80%	0,493a	68,960a	1,142a
Fi 80%	0,852a	180,846a	1,220a
CV (%)	54,02	71,29	54,61

Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) quanto aos valores de massa seca de raiz, ramo e folha e nitrogênio total foliar (Tabela 8). Estes resultados sugerem que o sombreamento aplicado não foi suficiente para reduzir o desenvolvimento normal das plantas e dos nódulos (Tabela 6 e 8).

Tabela 8 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm), folha (MSF) e vagen (MSV) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculado (Fi) e não

inoculado (Fni), submetidos a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	MSV (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Fni 0%	2,717a	2,956a	3,404a	2,199a	3,325a
Fi 0%	2,957a	3,288a	3,688a	2,268a	2,660a
Fni 70%	2,827a	3,082a	3,406a	3,287a	3,155a
Fi 70%	2,807a	3,149a	3,477a	2,685a	3,473a
Fni 80%	2,409a	2,466a	2,854a	2,641a	3,878a
Fi 80%	2,129a	2,469a	2,622a	1,459a	2,528a
CV (%)	22,14	19,95	20,78	56,46	24,45

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

4. 3. Experimento 3: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivada em casa de vegetação.

Na Tabela 9 são apresentadas as médias de número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) para a soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas em duas épocas, Ep1 (antes da floração) e Ep2 (após a floração).

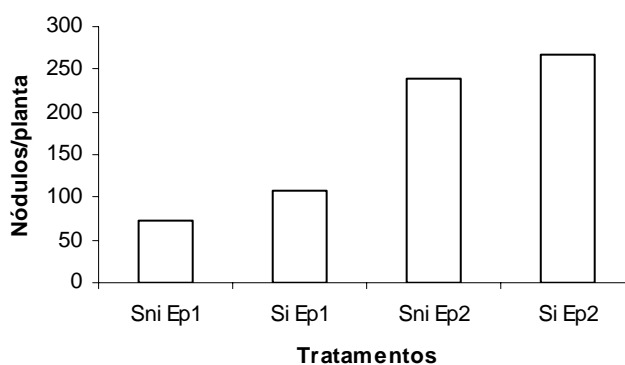
Tabela 9 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .nod ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Sni Ep1	73,000b	1,563b	20,459a	1,269b	0,220a	5,000a
Si Ep1	108,500b	1,750b	16,221a	1,689b	0,870a	5,000a
Sni Ep2	239,188a	3,979a	16,844a	3,883a	0,805a	3,979b
Si Ep2	267,625a	3,500a	13,462a	3,337a	0,578a	4,500ab
CV (%)	18,11	20,09	24,59	16,98	97,15	7,70

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Quanto ao número de nódulos (NN), os tratamentos Sni Ep2 e Si Ep2 apresentaram as maiores médias em relação as plantas dos tratamentos avaliados no período que antecedeu a floração, Ep1. A presença de nódulos nas plantas não inoculadas, assim como no feijoeiro avaliados no experimento 1 e 2, pode estar relacionada à presença de estirpes introduzidas e naturalizadas no solo ou, possível contaminação entre os tratamentos inoculados e não inoculados durante o manuseio do experimento, pois os vasos estavam muito próximos um dos outros (Figura 11).

Estudos relatam que a ocorrência natural de *Bradyrhizobium japonicum* nos solos brasileiros não é comum, pois a soja é uma leguminosa introduzida e uma das poucas espécies vegetais capaz de se associar com este gênero bacteriano, entretanto há possibilidade de que algumas estirpes introduzidas no solo se naturalizem (Lima et al., 1997; Marr et al., 1998).



□ Número de Nódulos

Figura 11 - Número de nódulos em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) cultivada em casa de vegetação avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2).

Avaliando o NN em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), observa-se que a nodulação continuou acontecendo mesmo após a floração (Figura 11), assim como no experimento 1 quando avaliou a nodulação em feijoeiro cultivado em casa de vegetação.

As plantas não inoculadas e inoculadas apresentaram na época 2 (Ep2) as maiores médias (estatisticamente iguais entre si) quanto ao volume e massa fresca de nódulos em relação às plantas inoculadas e não inoculadas, na época 1, que também foram estatisticamente iguais entre si (Tabela 9). Estes dados mostram que a planta continuou alocando carboidratos para os nódulos mesmo durante o estágio reprodutivo (Ep2).

Existe uma variação muito grande no volume dos nódulos por planta (Tabela 9), entre cada tratamento, mas esta variação é aproximadamente constante dentro de cada fase de desenvolvimento (antes, Ep1 e após a floração, Ep2).

Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) quanto ao volume por nódulos (Tabela 9).

Quanto ao número de nódulos ativos (NA), as plantas inoculadas e não inoculadas avaliadas na fase vegetativa (Sni Ep1 e Si Ep1) apresentaram as maiores médias comparadas às plantas não inoculadas avaliadas após a floração, Sni Ep2 (Figura 12). As plantas do tratamento Si Ep2 não diferiu estatisticamente dos tratamentos aplicados quanto ao número de nódulos ativos (Tabela 9).

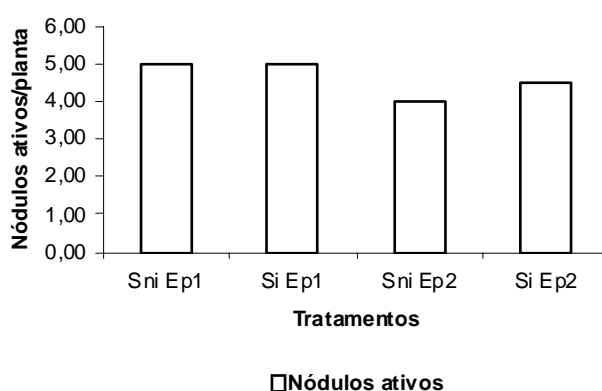


Figura 12 - Número de nódulos ativos por plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) cultivada em casa de vegetação.

Embora tenha ocorrido aumento no NN, VN, MF, houve redução no número de nódulos ativos (NA), indicando competição por carboidratos durante a fase reprodutiva, Ep2 (Figura 12).

Comparando os resultados de atividade nodular do feijoeiro (Experimento 1, Tabela 3) com a soja (Experimento 3, Tabela 9), observa-se que ambas as espécies apresentaram maior número de nódulos ativos na fase vegetativa (Ep1) comparada à fase reprodutiva (Ep2), indicando uma possível redução na alocação de carboidratos para os nódulos após a floração.

O CO₂ liberado por planta e por volume de nódulo (Tabela 10) não diferiu entre os tratamentos ($p \geq 0,05$).

Quanto ao CO₂ liberado por massa seca de nódulo, as plantas dos tratamentos Sni Ep1 apresentaram a maior média em relação às plantas dos tratamentos Sni Ep2 e Si Ep2 (Tabela 10). O grande aumento no número e no volume de nódulos na fase reprodutiva em relação à vegetativa e a queda na atividade dos nódulos (Tabela 9) é uma provável explicação para esta ocorrência.

Tabela 10 - Média de CO₂ liberado pelos nódulos por planta (CO₂), por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) cultivadas em casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ (mg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /V. nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ .cm ⁻³)	CO ₂ /MS.nod (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
------------	--	--	---

Sni Ep1	0,709a	34,524a	3,726a
Si Ep1	0,594a	39,293a	1,603ab
Sni Ep2	0,782a	44,702a	0,962b
Si Ep2	0,728a	56,535a	1,217b
CV (%)	45,17	39,75	54,75

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Houve diferença estatística significativa pelo teste de Tukey entre as médias dos tratamentos para a produção de massa seca de raiz, ramo e folha. As plantas dos tratamentos Sni Ep2 e Si Ep2 (estatisticamente iguais entre si) apresentaram as maiores médias diferindo daquelas dos tratamentos Sni Ep1 e Si Ep1 que também foram estatisticamente iguais entre si (Tabela 11).

Tabela 11 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF)) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Sni Ep1	2,054b	1,536b	2,122b	3,465a
Si Ep1	2,015b	1,831b	2,386b	3,150a
Sni Ep2	6,544a	8,104a	8,522a	3,578a
Si Ep2	6,075a	8,485a	8,239a	3,710a
CV (%)	18,19	15,46	12,32	12,03

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

De acordo com esses dados conclui-se que, a soja continua translocando carboidratos para os nódulos, raízes, ramos e folhas, principalmente para os dois últimos órgãos, durante o período reprodutivo (Figura 13). Tanaka & Fujita (1979) e Dantas et al. (2007) relataram que na fase reprodutiva a translocação de fotossintato é direcionada para estruturas reprodutivas onde a atividade metabólica é intensa, e após o florescimento os carboidratos são direcionados para frutos e tubérculos.

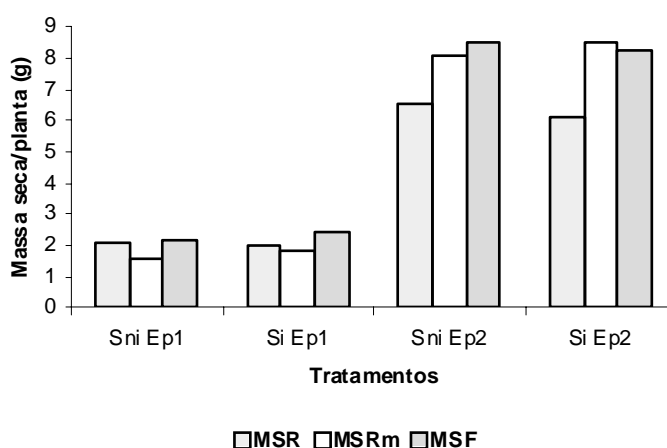


Figura 13 - Massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRn) e folha (MSF) por planta de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivada em casa de vegetação.

Quanto ao nitrogênio total foliar não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos testados para as plantas de soja (Tabela 11).

Em ambos os experimentos (Experimento 1 e Experimento 3) conduzidos em casa de vegetação não houve diferença entre os tratamentos para o nitrogênio total, mas observou-se uma redução de $1,05 \text{ dag.kg}^{-1}$ de nitrogênio total foliar nas plantas de feijão inoculadas avaliadas na fase reprodutiva (Fi Ep2) comparada as plantas de soja inoculadas avaliadas na mesma época (Si Ep2). Este resultado é um forte indício de que o metabolismo do carbono e do nitrogênio funcionam mais eficientemente na soja do que no feijão e, como consequência, maior eficiência na fixação e assimilação do N. Isto é, o carboidrato alocado da planta para os nódulos é utilizado mais eficientemente na soja do que no feijão.

4. 4. Experimento 4: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, submetidas a diferentes níveis de sombreamento, em condições de casa de vegetação.

Na Tabela 12 são apresentadas as médias quanto ao número de nódulos (NN) e volume de nódulos (VN) por planta, volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA), em soja submetida a diferentes níveis de sombreamento.

Tabela 12 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume de nódulos por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), cultivadas em casa de vegetação após a floração (Ep2), submetidas a diferentes níveis de sombreamento.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .nod ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Sni 0%	239,188a	3,979a	0,017a	3,883a	0,805a	3,979ab
Si 0%	267,625a	3,500a	0,013a	3,337a	0,578a	4,500a
Sni 70%	189,063a	3,167a	0,017a	3,074a	0,642a	2,938ab
Si 70%	155,854a	2,438a	0,012a	2,286a	0,474a	2,583ab
Sni 80%	173,938a	2,812a	0,016a	2,748a	0,577a	2,063b
Si 80%	176,813a	2,625a	0,015a	2,499a	0,523a	3,125ab
CV (%)	27,24	25,76	26,09	24,92	28,11	32,98

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos para os valores de número, volume, volume por nódulo, massa fresca e massa seca de nódulo (Tabela 12).

Ao contrário do experimento 2 em que avaliou a influência de diferentes níveis de sombreamento na nodulação de plantas de feijão, o sombreamento exerceu forte influência na atividade dos nódulos em plantas de soja durante seu estágio reprodutivo (Tabela 12). Verifica-se redução significativa no número de nódulos ativos ao submeter as plantas não inoculadas ao sombreamento de 80%, indicando que a redução na luminosidade, ao reduzir a fotossíntese, resultou em menor disponibilidade de fotossintatos para abastecer o crescimento dos nódulos. Este resultado reforça a idéia de que o sombreamento atua negativamente na manutenção dos nódulos em plantas de soja supostamente pela redução no fornecimento de fotossintato proveniente da fotossíntese (Figura 14).

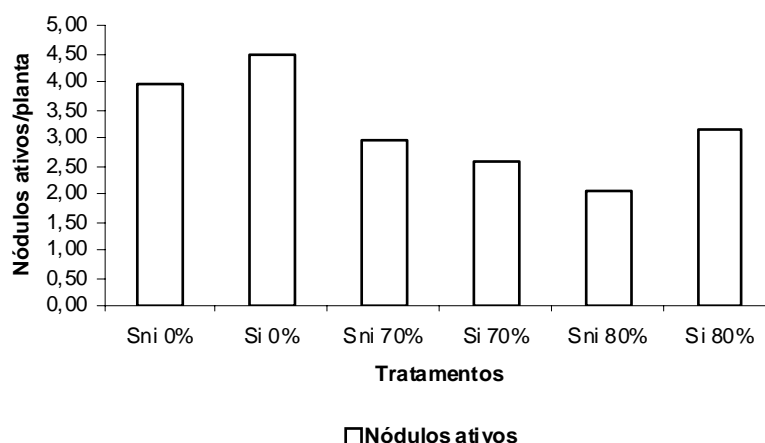


Figura 14 - Número de nódulos ativos por plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas sob diferentes níveis de sombreamento durante o estágio reprodutivo (Ep2) cultivadas em casa de vegetação.

Observa-se pelos dados apresentados na Figura 14 que a disponibilidade ótima de luz favoreceu a manutenção da atividade dos nódulos em virtude de disponibilizar mais carbono reduzido fotossinteticamente, os quais são fundamentais na produção de energia necessária a FBN (Douseau et al., 2007; Lima Jr. et al., 2006; Coker; Schubert, 1981).

De modo geral, observando os dados referentes ao número, volume, massa fresca e massa seca de nódulos nos tratamentos sombreados, pode-se inferir que o sombreamento tenha atuado na fotossíntese interferindo diretamente na produção de fitomassa nos nódulos além de reduzir a produção de fotossintato levando a morte dos rizóbios.

Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos para os valores de CO_2 liberado por planta, por volume de nódulo e por massa seca de nódulo (Tabela 13).

Tabela 13 - Média de CO₂ liberado pelos nódulos por planta (CO₂), por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) em soja inoculada e não inoculada, avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ (μg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /V.nod ⁻¹ (μg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /MS.nod (g.planta ⁻¹)
Sni 0%	0,782a	44,702a	0,962a
Si 0%	0,728a	56,534a	1,217a
Sni 70%	0,662a	39,605a	0,991a
Si 70%	0,468a	28,963a	0,707a
Sni 80%	0,542a	32,672a	0,956a
Si 80%	0,477a	31,803a	0,829a
CV (%)	65,67	58,73	54,19

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

A massa seca de folha (MSF), vagem (MSV) e nitrogênio total foliar não diferiu entre os tratamentos avaliados ($p \geq 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm), folha (MSF) e vagem (MSV) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), submetidas à diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2) e cultivadas em casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	MSV (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Sni 0%	6,544a	8,104ab	8,522a	1,236a	3,578a
Si 0%	6,075a	8,485a	8,239a	0,634a	3,710a
Sni 70%	4,525ab	6,755ab	7,404a	1,555a	3,375a
Si 70%	2,949b	4,859b	5,192a	0,662a	2,835a
Sni 80%	3,427b	5,579ab	5,415a	1,155a	3,970a
Si 80%	3,513b	5,381ab	5,702a	1,349a	3,633a
CV (%)	22,73	23,17	23,37	51,70	24,20

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Quanto a produção de fitomassa de raiz (MSR) e ramo (MSRm), observou-se que os tratamentos em que as plantas não foram sombreadas apresentaram as maiores médias (Figura 15).

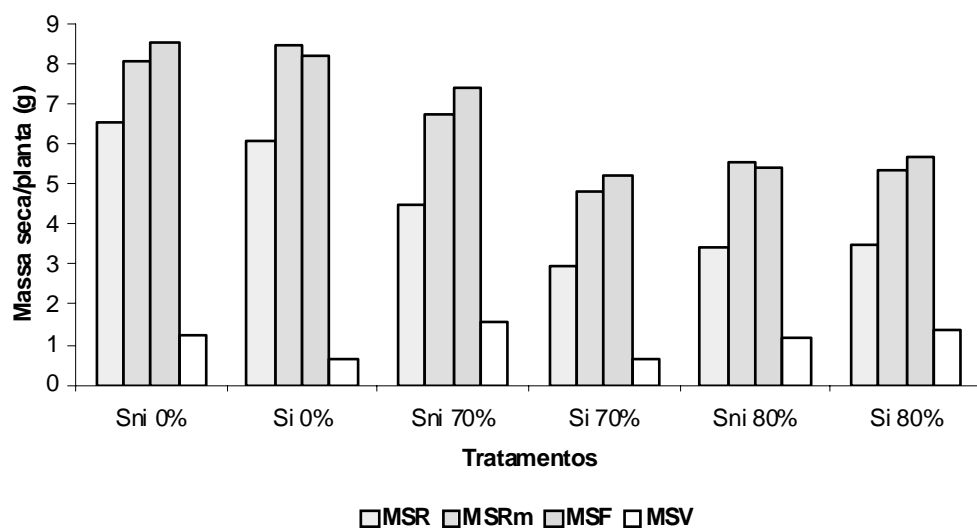


Figura 15 - Massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) cultivadas sob diferentes níveis de sombreamento após a floração(Ep2) em casa de vegetação.

4. 5. Experimento 5: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivado em ambiente externo à casa de vegetação.

Quanto ao número de nódulos (Tabela 15), as plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni) avaliadas na fase vegetativa (Ep1) apresentaram as maiores médias comparadas às plantas dos tratamentos avaliados na fase reprodutiva, Ep2. Ao contrário do experimento 1, conduzido em casa de vegetação, neste experimento houve redução na formação de nódulos nas plantas de feijão inoculado e não inoculado avaliados após a floração (Ep2).

Tabela 15 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .nod ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g/planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Fni Ep1	384,000a	2,833a	7,236a	2,774a	0,428a	3,917a
Fi Ep1	488,000a	3,083a	6,250a	2,833a	0,338ab	3,833a
Fni Ep2	364,167ab	2,250a	6,426a	2,019a	0,267ab	1,250b
Fi Ep2	307,500b	1,611a	5,246a	1,399a	0,159b	2,111ab
CV (%)	16,15	29,19	21,94	25,15	29,07	27,71

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

O elevado número de nódulos encontrados nas plantas não inoculadas (Fni Ep1 e Fni Ep2) mostra que o solo, utilizado no plantio, provavelmente, possuía grande população de rizóbios nativos capaz de nodular as raízes do feijoeiro. No experimento 1, conduzido em casa de vegetação, também foi verificado elevado número de nódulos nas plantas não inoculadas, comprovando as afirmações quanto à promiscuidade do feijoeiro. Araújo et al. (2007) e Ferreira et al., (2000) relataram que as plantas de feijão são capazes de associar-se com estirpes eficientes da espécie *Rhizobium tropici* e demais estirpes introduzidas e naturalizadas que não são totalmente eficientes na fixação do nitrogênio. Supõem-se que tenha havido contaminação entre os tratamentos do experimento 1, pois na Ep2 o NN foi maior comparado ao NN dos tratamentos do experimento 5 avaliados após a floração.

O volume de nódulos por planta, o volume por nódulo e a massa fresca de nódulos não diferiram ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos avaliados (Tabela 15).

Para a massa seca de nódulos (MS), observou-se maior média no tratamento Fni Ep1 em relação ao tratamento Fi Ep2 (Tabela 15).

Quanto ao número de nódulos ativos, as plantas do Experimento 1 conduzido em casa de vegetação apresentaram resultados semelhantes à este experimento conduzido em ambiente externo à casa de vegetação.

As plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni) avaliadas durante o período vegetativo (Ep1) apresentaram as maiores médias quanto ao número de nódulos ativos (NA), diferindo estatisticamente das plantas não inoculadas avaliadas no período reprodutivo (Ep2) (Figura 16).

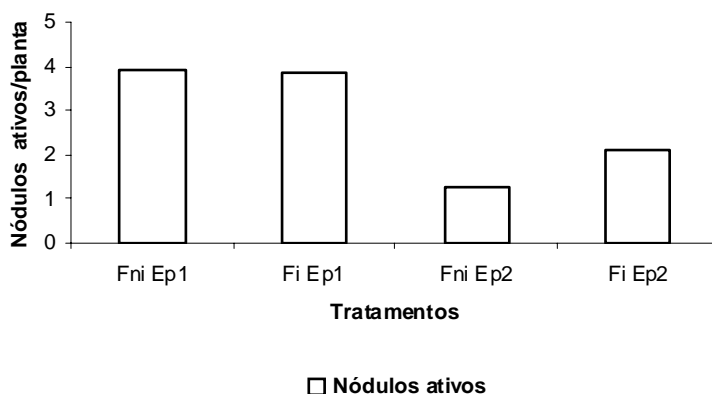


Figura 16 - Número de nódulos ativos de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni) avaliados na antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.

As médias de número e massa seca de nódulos mostram que embora havendo inúmeros nódulos durante o estágio reprodutivo (Ep2), as plantas de feijão limitam a translocação de carboidratos para os nódulos levando-os a sua inativação e conseqüente senescência resultando na redução da massa seca e aumento no número de nódulos inativos (Figura 17).



Figura 17 - Nódulos em raízes de feijão avaliados antes (esquerda) e após (direita) o florescimento e cultivado em ambiente externo à casa de vegetação.

Na Tabela 16 estão as médias referentes às quantidades de CO₂ liberadas pelos nódulos por planta, por volume de nódulo e por massa seca de nódulo.

Tabela 16 - Média de CO₂ liberado pelos nódulos por planta (CO₂), por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2) cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ /planta (mg.L ⁻¹)	CO ₂ /V.nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ cm ⁻³)	CO ₂ /MS.nod (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
Fni Ep1	0,450a	59,306ab	0,998ab
Fi Ep1	0,484a	77,921a	1,461a
Fni Ep2	0,201a	32,760b	0,735b
Fi Ep2	0,145a	27,564b	0,914b
CV (%)	44,63	27,41	19,63

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) para o CO₂ liberado por planta. Quanto ao CO₂ liberado por volume e massa seca de nódulos, as plantas do tratamento Fi Ep1 apresentaram as maiores médias diferindo estatisticamente daquelas submetidas aos tratamentos Fni Ep2 e Fi Ep2 (estatisticamente iguais entre si).

Pelos resultados apresentados na Tabela 16, pode-se inferir que a atividade respiratória diferiu entre os estádios de desenvolvimento em plantas de feijão avaliadas durante a fase vegetativa, pois foi neste período que a maior quantidade de CO₂ (77,921 mg.L⁻¹ e 1,461 mg.L⁻¹) foi liberada por volume e massa seca de nódulos, determinando a atividade dos mesmos durante este período (Figura 18 e 19).

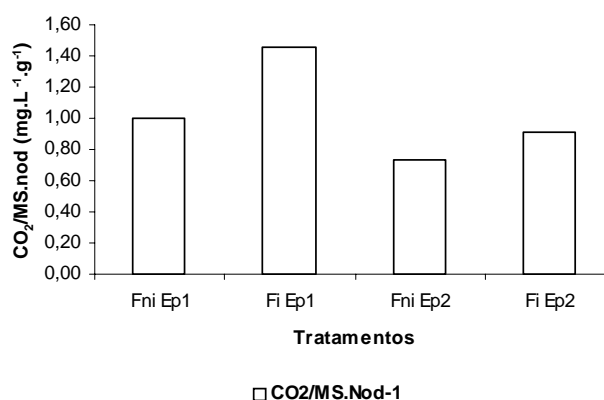


Figura 18 – Quantidade de CO₂ liberado por massa seca de nódulos em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.

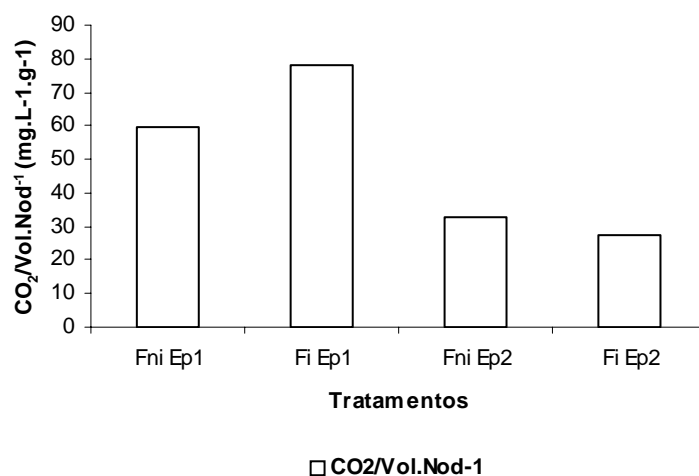


Figura 19 – Quantidade de CO₂ liberado por volume de nódulos em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.

As médias de quantidade de massa seca de raiz e ramo produzidas por plantas de feijão diferiu estatisticamente pelo teste de Tukey ao avaliá-las nos estádios de desenvolvimento, pré e pós-floração (Tabela 17). Nesta avaliação as plantas submetidas aos tratamentos Fni Ep2 e Fi Ep2 (estatisticamente iguais entre si) apresentaram as maiores médias diferindo das demais plantas submetidas aos tratamentos, Fni Ep1 e Fi Ep1. Estes dados mostram que as massas secas das raízes e ramos aumentaram até o estágio de formação de vagens. Isso ocorreu porque, normalmente, as plantas acumulam biomassa até a fase reprodutiva e, a partir dessa fase, inicia-se a senescência vegetal com conseqüente diminuição gradativa da biomassa (Epstein; Bloom, 2006 apud Xavier et al., 2007).

Tabela 17 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Fni Ep1	2,697b	1,956b	3,456a	2,927a
Fi Ep1	2,089b	1,586b	3,316a	3,013a
Fni Ep2	3,996a	4,079a	2,964a	2,567a
Fi Ep2	4,366a	4,595a	4,422a	2,620a
CV (%)	14,72	22,15	17,53	19,54

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

No experimento conduzido no interior da casa de vegetação (Tabela 5) não houve diferença significativa na massa radicular entre os dois estádios de desenvolvimento, mas

houve para massa seca dos ramos e folhas, com aumento na fase reprodutiva. Estes resultados indicam que houve limitação de carboidratos alocados para as raízes, mas não para a parte aérea.

Por outro lado, neste experimento 5, conduzido em ambiente externo à casa de vegetação (Tabela 17), observa-se que as raízes ganharam massa no estágio fenológico 2 (Ep2) em relação ao estágio 1 (Ep1), embora não tenha ocorrido diferença entre as plantas inoculadas e não inoculadas. Houve, da mesma forma, ganho de massa pelos ramos, mas não houve ganho pela massa seca de folhas. Deduz-se então, que neste ambiente, não houve limitação na alocação de carboidratos para as raízes e ramos, mas com a mesma massa seca de folhas as plantas conseguiram suprir a demanda dos diferentes órgãos.

Quanto à massa seca de folhas e teor de nitrogênio total foliar, não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) (Tabela 17). Embora não havendo diferença estatística entre os tratamentos, observou-se que as plantas não inoculadas (Fni), provavelmente colonizadas por estirpes nativas, apresentaram teor de nitrogênio foliar próximo daquelas que receberam inoculante (Fi), porém a disponibilização de nitrogênio fixado à planta não foi tão eficiente devido aos sintomas de clorose apresentado, sendo este mais acentuado nas plantas não inoculadas avaliadas após a floração - Ep2, (Figura 20).



Figura 20 - Plantas de feijão inoculado (esquerda) e não inoculado (direita), cultivada sob luz plena durante o período reprodutivo (Ep2) em ambiente externo a casa de vegetação.

Há controvérsias quanto a eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio no fornecimento de nitrogênio para a cultura do feijoeiro. Há trabalhos que afirmam que o fornecimento de nitrogênio por esta via pode não ser suficiente para suprir a demanda de nitrogênio requerida pelas plantas (Hungria et al., 1997) ao longo dos seus sucessivos estágios de desenvolvimento; já outros relataram que *Phaseolus vulgaris* é conhecido por formar associações simbióticas com estirpes nativas capaz de suprir as plantas com o N fixado simbioticamente (Ferreira et al., 2000; Straliozzo; Teixeira, 2000) não sendo necessário o uso de adubo químico.

As plantas de feijão se comportaram de forma diferente quanto ao teor de nitrogênio total (Tabela 17). A quantidade de nitrogênio total nas plantas dos tratamentos avaliadas antes da floração (Ep1) tenderam a ser maiores, comparadas as plantas dos tratamentos avaliados após a floração (Ep2), indicando que os períodos de maior demanda de nitrogênio pelas plantas não coincide com o período de maior atividade dos nódulos (Figura 16).

Os resultados obtidos dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *total* e razão clorofila *a/b* foliares estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Média da clorofila *a* (Cla), *b* (Clb), razão (Cla/Clb) e total (Cltot) em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamentos	Cla (mg.g ⁻¹)	Clb (mg.g ⁻¹)	Cla/Clb (μg.g ⁻¹)	Cltot (mg.g ⁻¹)
Fni Ep1	0,651a	0,271a	2,432b	0,922a
Fi Ep1	0,678a	0,284a	2,382b	0,962a
Fni Ep2	0,444a	0,100b	4,983a	0,544a
Fi Ep2	0,483a	0,109b	4,423a	0,591a
CV (%)	20,94	25,51	18,05	21,63

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Não houve diferença significativa na concentração de clorofila *a* e clorofila *tot* entre os dois estádios de desenvolvimento (Ep1 e Ep2), mas houve para clorofila *b* e Cla/Clb (Tabela 18).

4. 6. Experimento 6: Comportamento da nodulação em feijão inoculado e não inoculado com rizóbios, submetidos a diferentes níveis de sombreamento, cultivado em ambiente externo à casa de vegetação.

As plantas submetidas aos tratamentos de sombreamento (0% e 80% de sombra) a partir do início da floração não diferiram ($p \geq 0,05$) quanto ao número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulos (V/Nod), massa fresca de nódulos (PF), massa seca de nódulos (PS) e nódulos ativos (NA) (Tabela 19).

Tabela 19 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em feijão inoculado (Fi) e não inoculado (Fni), submetidas a diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .nod ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Fni 0%	364,167a	2,250a	6,426a	2,019a	0,268a	1,250a
Fi 0%	307,500a	1,611a	5,246a	1,399a	0,158a	2,111a
Fni 80%	497,778a	2,139a	4,304a	2,189a	0,274a	2,111a
Fi 80%	425,333a	2,167a	5,139a	1,940a	0,192a	2,917a
CV (%)	22,06	20,78	20,59	23,53	21,30	54,36

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) para os valores de CO₂ liberado pelos nódulos por planta, por volume de nódulo e por peso seco de nódulo (Tabela 20).

Tabela 20 - Média de CO₂ liberado pelos nódulos por planta (CO₂), por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) em feijão inoculado e não inoculado, submetidas a diferentes níveis de sombreamento avaliados após a floração (Ep2), cultivados em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ (mg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /V.nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ .cm ⁻³)	CO ₂ /MS.nod (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
Fni 0%	0,201a	32,760a	0,735a
Fi 0%	0,145a	27,564a	0,914a
Fni 80%	0,219a	52,421a	0,780a
Fi 80%	0,188a	37,537a	0,935a
CV (%)	40,86	47,61	23,01

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) quanto à massa seca de raiz, ramo, folha e vagem e nitrogênio foliar total (Tabela 21).

Tabela 21 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm), folha (MSF) e vagem (MSV) e nitrogênio total foliar em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), submetidas a diferentes níveis de sombreamento, avaliadas após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	MSV (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Fni 0%	3,996a	4,079a	2,964a	0,378 a	2,567a
Fi 0%	4,366a	4,595a	4,422a	0,571 a	2,620a
Fni 80%	3,238a	3,087a	2,719a	0,775 a	4,723a
Fi 80%	3,691a	4,787a	4,289a	0,825 a	4,470a
CV (%)	18,75	29,53	22,28	55,76	39,50

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Pelos resultados apresentados constatou-se que o tratamento de sombreamento não foi limitante para o bom desenvolvimento das plantas. A densidade de fluxo de fótons medidas às 12:00 horas no interior do sombrite foi de 618 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ enquanto externamente a densidade era de 2.231 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

No experimento 2, conduzido em casa de vegetação, assim como este, desenvolvido em ambiente externo a casa de vegetação, não houve diferença significativa quanto aos parâmetros de CO₂ (liberado pelos nódulos por planta, por volume de nódulo e por massa seca de nódulos), massa seca (de raiz, ramo, folha e vagem) e nitrogênio total foliar. Estes resultados mostram que o sombreamento, o qual as plantas foram submetidas não foi suficiente para reduzir o desenvolvimento normal das plantas e dos nódulos.

O sombreamento aplicado não alterou significativamente os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, razão clorofila *a/b* e clorofila *total* (Tabela 22), da mesma forma as plantas inoculadas não diferiram das não inoculadas.

Tabela 22 - Média da clorofila *a* (Cla), *b* (Clb), razão (Cla/Clb) e total (Cltot) em plantas de feijão inoculadas (Fi) e não inoculadas (Fni), submetidas a diferentes níveis de sombreamento, avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	<i>Cl_a</i> (mg.g ⁻¹)	<i>Cl_b</i> (mg.g ⁻¹)	<i>Cl_a/Cl_b</i> (μg.mg ⁻¹)	<i>Cl_{tot}</i> (mg.g ⁻¹)
Fni 0%	0,444a	0,100a	4,983a	0,544a
Fi 0%	0,483a	0,109a	4,423a	0,591a
Fni 80%	0,611a	0,140a	4,380a	0,751a
Fi 80%	0,643a	0,157a	4,233a	0,799a
CV (%)	17,62	31,37	16,35	20,03

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

4. 7. Experimento 7: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, em dois estádios de desenvolvimento, cultivada em ambiente externo à casa de vegetação.

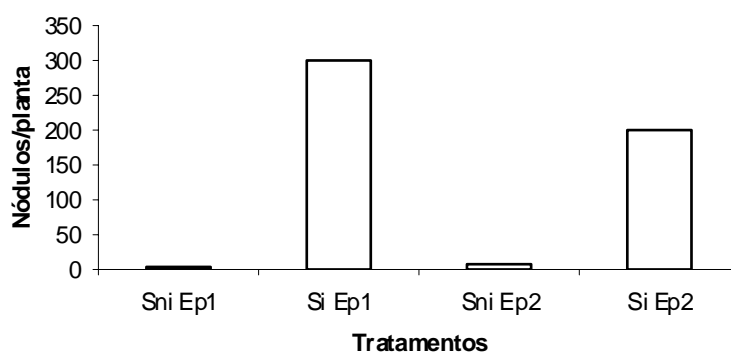
Neste experimento, assim como no Experimento 3 (Tabela 9) desenvolvido em casa de vegetação, verificou-se que as plantas responderam diferentemente nos dois estádios, antes e após a floração, quanto aos parâmetros avaliados na Tabela 23.

Tabela 23 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliados antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .planta ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Sni Ep1	0,833c	0,333b	277,778a	0,069b	0,012b	0,667b
Si Ep1	302,333a	3,000a	10,013a	2,887a	0,597a	5,000a
Sni Ep2	6,833c	1,167ab	122,222a	1,524ab	0,194b	2,500b
Si Ep2	201,667b	2,639ab	13,238a	2,499a	0,582a	1,417b
CV (%)	22,05	50,09	130,53	35,38	39,81	30,77

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

O número de nódulos nas plantas de soja inoculadas avaliadas no período vegetativo (Ep1) diferiu das plantas inoculadas avaliadas no período reprodutivo (Ep2) (Figura 21). Neste experimento a nodulação foi reduzida no período reprodutivo (Tabela 23), ao contrário do experimento conduzido em casa de vegetação (Tabela 9) em que observou-se aumento no número de nódulos nas plantas de soja inoculada e não inoculadas avaliadas no mesmo estágio de desenvolvimento.



□ Número de nódulos

Figura 21 - Número de nódulos por plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

O número reduzido de nódulos nas plantas não inoculadas (Tabela 23) mostra o quanto a soja é seletiva na formação de associações simbióticas com estirpes capazes de fixar o N_2 (Figura 22), mostrando também que neste experimento, ao contrário do experimento conduzido em casa de vegetação (Tabela 9), não ocorreu contaminação dos tratamentos não inoculados (Sni) por estirpes utilizadas nos tratamentos inoculados (Si). Possivelmente, este número reduzido de nódulos nas plantas que não recebeu inoculante esteja relacionado com a baixa concentração de estirpes nativas no solo. Com os dados obtidos na repetição deste experimento em ambiente externo a casa de vegetação supõe-se que o elevado número de nódulos nas plantas de soja não inoculadas observados no experimento 3 seja proveniente da contaminação entre os tratamentos avaliados.

Lima et al. (1998) e Marr et al.(1997) relataram que a ocorrência natural de estirpes pertencentes a espécie *Bradyrhizobium japonicum* nos solos brasileiros é pouco provável mas há a possibilidade de que algumas estirpes introduzidas no solo tenham sobrevivido e se naturalizado.



Figura 22 - Raízes de soja referentes aos tratamentos que não receberam inoculante. Raiz de soja desprovida de nódulos (Esquerda) e raiz de soja contendo apenas um nódulo (Direita).

Hungria et al. (1994) e Vargas et al. (1993) afirmaram que uma das formas de identificar se os nódulos formados nas raízes são provenientes de estirpes oriundas do

inoculante utilizado, é avaliando a distribuição dos nódulos nas raízes. Eles relatam que o sucesso da inoculação pode ser avaliado de acordo com a distribuição e a coloração dos nódulos em raízes de soja. Os nódulos presentes na região do colo da raiz principal são formados logo após a emergência das plantas, e provavelmente são provenientes das estirpes inoculadas (Figura 23). Ao contrário dos nódulos presentes nas raízes secundárias e na parte inferior do sistema radicular, os quais indicam que a nodulação ocorreu tardiamente, e provavelmente por estirpes que já se encontravam no solo.



Figura 23 - Nodulação na região do colo em raízes primárias de soja inoculada.

Quanto ao volume de nódulos, massa fresca, massa seca e nódulos ativos avaliados em plantas de soja, houve diferença significativa entre os tratamentos testados (Tabela 23).

Na época 1 as plantas de soja inoculadas apresentaram a maior média para o volume de nódulos comparadas às não inoculadas. Na fase reprodutiva o volume de nódulos não diferiu entre as plantas não inoculadas e inoculadas, que por sua vez não diferiu dos volumes encontrados na fase vegetativa.

As médias de massa fresca e massa seca de nódulos das plantas de soja inoculadas avaliadas no período vegetativo (Ep1) e reprodutivo (Ep2) diferiram significativamente das médias das plantas dos tratamentos não inoculados (Sni Ep1 e Sni Ep2).

Quanto a atividade nodular, as plantas de soja inoculada avaliadas na fase vegetativa (Si Ep1) apresentaram o maior número de nódulos ativos, ao contrário das plantas de soja inoculadas avaliadas na fase reprodutiva (Si Ep2) que se destacaram com o menor número (Figura 24). Estes resultados são explicados devido ao contínuo crescimento vegetativo da soja mesmo depois de iniciado o florescimento.

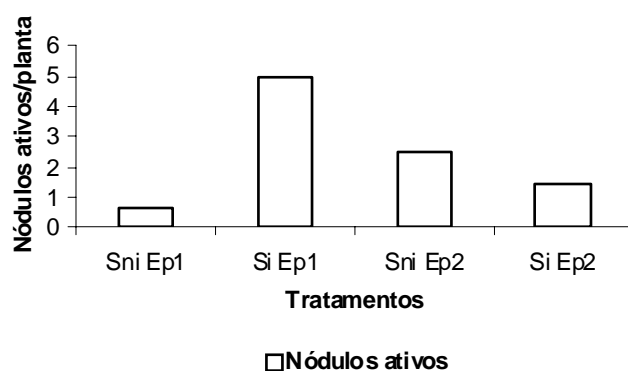


Figura 24 - Nódulos ativos em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Durante a fase vegetativa os nódulos estão em atividade plena, pois a planta está alocando carboidratos em maior quantidade para folhas jovens, raízes e nódulos os quais atuam como drenos. Quando o período reprodutivo (Ep2) é iniciado a translocação de carboidratos para os nódulos é reduzida de forma gradativa resultando na sua inativação.

Egli & Crafts-Brandner (1996) afirmaram que analisar a atividade fonte-dreno em plantas de soja é complicado devido a continuação de seu crescimento vegetativo mesmo depois de iniciado o florescimento. Relataram que as folhas de soja são os maiores órgãos fonte da planta e atuam auxiliando todos os processos associados ao crescimento e ao desenvolvimento. E, ainda, que durante o crescimento vegetativo e antes do florescimento, órgãos jovens como raízes, nódulos e folhas novas, atuam como drenos. Os autores ainda relataram que ao longo do florescimento e formação de vagens, período em que o número de sementes é determinado, drenos vegetativos (folhas novas, raízes e nódulos) e reprodutivos (vagens e sementes) competem fortemente por fotoassimilados sendo este um fator determinante na produção. Já no período de enchimento da semente, esta se torna o principal dreno por fotoassimilado, pois a acumulação de matéria seca pelas sementes continua em taxa constante até próximo da maturação fisiológica e neste período, que é o mais importante para o ciclo de vida da soja, a atividade fonte (fotossíntese) declina como resultado da senescência.

O volume por nódulo (V/nod) não diferiu entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) (Tabela 23).

As médias de CO₂ liberado por planta, CO₂ liberado por volume de nódulo e CO₂ liberado por massa seca de nódulos em plantas de soja avaliadas em ambiente externo a casa de vegetação (Tabela 24) não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos avaliados, assim como no experimento conduzido em casa de vegetação (Tabela 10).

Tabela 24 - Efeito da inoculação no CO₂ liberado por planta (CO₂), CO₂ liberado por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹), CO₂ liberado por massa seca de nódulo (CO₂/MS.nod⁻¹) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ (mg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /V.nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ .cm ⁻³)	CO ₂ /MS.nod (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
Sni Ep1	0,064a	0,189a	2,995a
Si Ep1	0,556a	57,186a	0,931a
Sni Ep2	0,172a	0,817a	1,322a
Si Ep2	0,561a	43,542a	1,026a
CV (%)	102,93	107,62	141,63

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Na Tabela 25 estão as médias de massa seca da raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar. Na produção de massa seca de raiz, ramo e folha as plantas do tratamento Si Ep2 diferiram significativamente pelo teste de Tukey dos demais tratamentos aplicados (Sni Ep1, Si Ep1 e Sni Ep2). Os dados apresentados nas Tabelas 11 e 25 mostram que a soja continuou seu crescimento vegetativo, alocando carboidratos para órgãos drenos como as raízes, ramos e folhas mais jovens mesmo depois de iniciada a floração.

Tabela 25 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Sni Ep1	3,373b	2,049c	2,885b	1,950a
Si Ep1	3,713b	2,747bc	4,047b	2,260a
Sni Ep2	5,991ab	3,802b	4,923b	1,290b
Si Ep2	7,986a	7,314a	9,479a	2,437a
CV (%)	20,60	15,95	15,64	9,73

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

As plantas soja inoculadas e não inoculadas (Sni Ep1, Si Ep1 e Si Ep2) apresentaram maior quantidade de nitrogênio total comparada as plantas do tratamento Sni Ep2, indiferente ao estágio de desenvolvimento (Tabela 25). Embora estatisticamente iguais, observa-se que os valores de nitrogênio total quantificados nos tratamentos Si Ep1 (2,260 dag.kg⁻¹) e Si Ep2 (2,437 dag.kg⁻¹) foram maiores comparados ao tratamento Sni Ep1 (1,950 dag.kg⁻¹). Estes resultados mostram a importância da FBN como fonte fundamental no fornecimento de nitrogênio para as plantas de soja, sendo seu ponto máximo atingido no período reprodutivo

(Ep2), contribuindo assim para a sua produção, pois foram as plantas do tratamento Si Ep2 que apresentaram as maiores médias para massa seca de raiz, ramo e folha e nitrogênio total (Figura 25). Estes dados estão de acordo com Vargas et al. (1993), que relataram que o processo de FBN atinge seu ponto máximo no estágio de floração plena e declina a partir do enchimento dos grãos participando no suprimento de N durante todo o ciclo da soja.

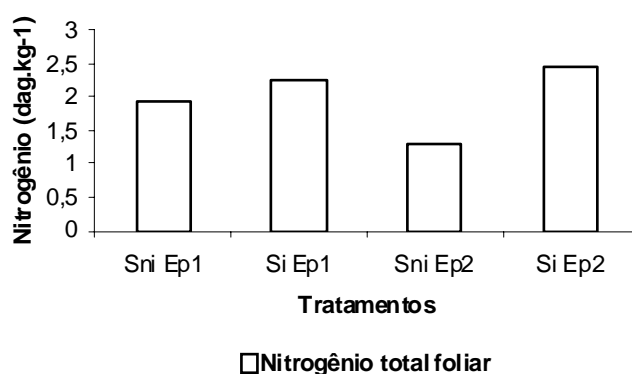


Figura 25 - Quantidade de nitrogênio total em folhas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivada em ambiente externo a casa de vegetação.

O baixo teor de nitrogênio total foliar avaliadas nas plantas do tratamento Sni Ep2 (Tabela 25) pode ser atribuído à baixa nodulação e à simbiose com estirpes não eficientes de *Bradyrhizobium* estabelecidas no solo (Hungria; Bohrer, 2000). Este resultado mostra a importância da inoculação de sementes de soja com estirpes eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico, pois quando introduzidas estas competem com estirpes naturalizadas no solo ocupando uma porcentagem maior de nódulos radiculares. O sucesso da cultura da soja está estritamente relacionado com a eficiência simbiótica do seu microssimbionte (Vargas; Hungria, 1997).

Os resultados obtidos dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *total* e razão clorofila *a/b* foliares estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Média da clorofila *a* (Cla), *b* (Clb), razão (Cla/Clb) e total (Cltot) em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas antes (Ep1) e após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamentos	Cla (mg.g ⁻¹)	Clb (mg.g ⁻¹)	Cla/Clb (μg.g ⁻¹)	Cltot (mg.g ⁻¹)
Sni Ep1	0,823b	0,366a	2,249a	1,189b

Si Ep1	1,074a	0,431a	2,556a	1,505a
Sni Ep2	0,272c	0,154b	1,784a	0,426c
Si Ep2	0,743b	0,397a	1,889a	1,140b
CV (%)	8,99	17,97	15,05	11,29

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

As plantas inoculadas avaliadas na fase vegetativa (Si Ep1) apresentaram maior concentração de clorofila *a* e clorofila *tot* que as não inoculadas avaliadas antes (Sni Ep1) e após a floração (Sni Ep2 e Si Ep2). Estas reduções nas concentrações após a floração possivelmente está relacionado com a competição por compostos de carbono entre as folhas e as raízes, pois é sabido da interdependência do metabolismo do carbono e do nitrogênio e o quanto o N é essencial para o desenvolvimento e crescimento da planta de soja em virtude de compor a molécula de clorofila.

As plantas inoculadas avaliadas após a floração (Ep2) apresentaram menor concentração de Clb do que as dos tratamentos Sni Ep1, Si Ep1, Sni Ep2 e Si Ep2, mas não houve diferença entre os tratamentos inoculados e não inoculados avaliados antes da floração (Ep1). Whatley & Whatley (1982) afirmam que maior quantidade de clorofila *b* no tecido vegetal é uma característica importante, pois possibilita a captação de energia de outros comprimentos de onda e transferência para uma molécula de clorofila *a*, que participa efetivamente das reações da fotossíntese.

A razão clorofila Cla/Clb não diferiu entre os tratamentos ($p \geq 0,05$) avaliados.

Quanto à concentração de clorofila e nitrogênio total foliar, as plantas do tratamento Sni Ep2 diferiu dos demais tratamentos (Sni Ep1, Si Ep1 e Si Ep2) apresentando as menores médias (Tabela 25 e 26). Estes resultados estão de acordo com Sorato et al. (2004) que relataram a alta correlação entre a concentração de clorofila e o teor de nitrogênio foliar.

4. 8. Experimento 8: Comportamento da nodulação em soja inoculada e não inoculada com rizóbios, submetidas a diferentes níveis de sombreamento, em ambiente externo à casa de vegetação.

As médias referentes ao número, massa seca de nódulos e nódulos ativos em plantas de soja submetidas a diferentes níveis de sombreamento e avaliadas após a floração diferiram entre os tratamentos testados e estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 - Média do número de nódulos (NN), volume de nódulos (VN), volume por nódulo (V/Nod), massa fresca de nódulos (MF), massa seca de nódulos (MS) e nódulos ativos (NA) em soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) submetidos a diferentes níveis de sombreamento, avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	NN (planta ⁻¹)	VN (cm ³ .planta ⁻¹)	V/Nod (mm ³ .planta ⁻¹)	MF (g.planta ⁻¹)	MS (g.planta ⁻¹)	NA (planta ⁻¹)
Sni 0%	6,833b	1,167a	122,222a	1,524a	0,194b	2,500ab
Si 0%	201,667a	2,639a	13,238a	2,499a	0,582a	1,417b
Sni 80%	13,167b	1,333a	107,155a	0,948a	0,172b	4,000a
Si 80%	189,917a	2,250a	11,835a	2,109a	0,493ab	1,083b
CV (%)	27,37	46,95	86,16	34,09	38,70	35,04

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

A formação de nódulos não diferiu ($p \geq 0,05$) com o sombreamento aplicado, mas sim com a presença e ausência de inoculante (Tabela 27). As plantas inoculadas (Si 0% e Si 80%) apresentaram maior número de nódulos que as plantas não inoculadas, independente do sombreamento testado (Figura 26), ao contrário do experimento 4 conduzido em casa de vegetação (Tabela 12) que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos de sombreamento testados (0%, 70% e 80% de sombra).

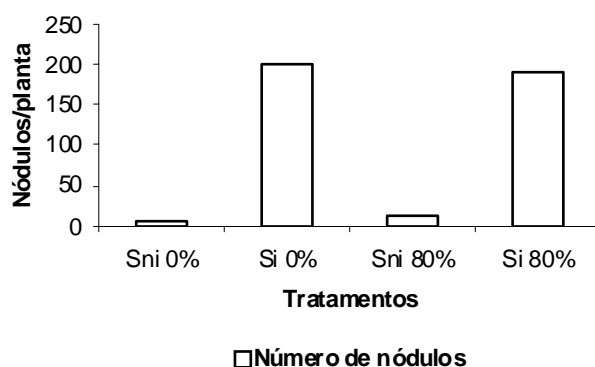


Figura 26 - Efeito do sombreamento no número de nódulos por planta em raízes de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni) avaliadas após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Neste experimento conduzido em casa de vegetação (Tabela 12) não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos para os valores de volume de nódulo (VN), volume por nódulo (V/Nod) e massa fresca de nódulos (MF).

Quanto à massa seca de nódulos, as plantas inoculadas do tratamento que recebeu luz plena (Si 0%) obtiveram maior média comparada às plantas não inoculadas que receberam 0% e 80% de sombra (Figura 27). Estes resultados sugerem o quanto a fotossíntese é fundamental na produção de fotossintato utilizado na formação dos nódulos.

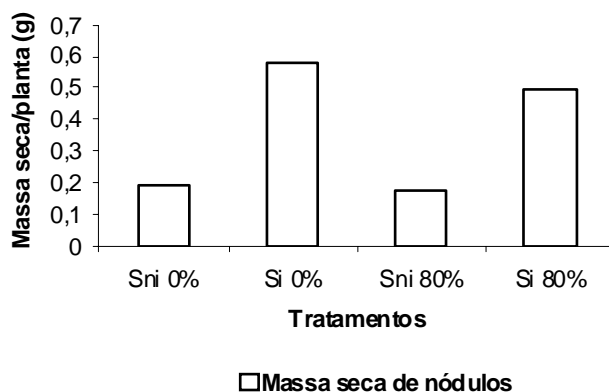


Figura 27 - Efeito do sombreamento na massa seca de nódulos por plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni) avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Verificou-se aumento significativo no número de nódulos ativos ao submeter as plantas não inoculadas ao sombreamento de 80% (Tabela 27), indicando que neste tratamento a redução na luminosidade não foi suficiente para reduzir a fotossíntese resultando em menor disponibilização de fotossintatos para abastecer os nódulos (Figura 28).

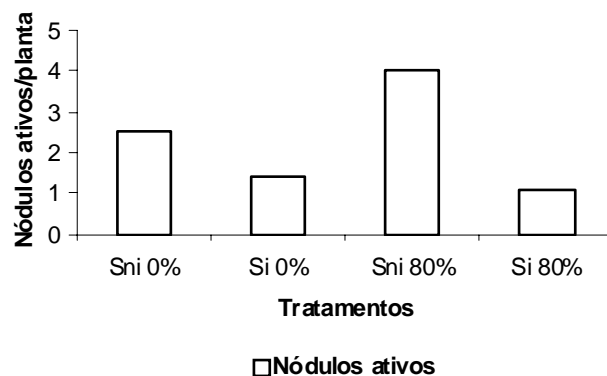


Figura 28 - Efeito do sombreamento no número de nódulos ativos em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni) avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Assim como a formação de nódulos, o número de nódulos inativos foi alterado em função da presença e ausência de inoculante nas sementes, e não pelo nível de sombreamento (Figura 28). As plantas inoculadas (Si 0% e Sni 80%) apresentaram o maior número de nódulos inativos comparadas às plantas não inoculadas (Sni 0% e Sni 80%).

Analisando-se o incremento no número de nódulos ativos no tratamento Sni 80% (Figura 28), observou-se que ocorreu um erro de amostragem. Para avaliar a atividade dos nódulos, quanto à coloração, foram coletados aleatoriamente dez nódulos por parcela, num total de cinco nódulos por planta. Como o tratamento Sni 80% apresentou poucos nódulos em relação aos demais tratamentos, a probabilidade de se ter coletado nódulos ativos foi muito maior, comparado à escolha dos nódulos nos tratamentos Si 80% e Si 0%, os quais apresentaram maior número de nódulos (Figura 26).

Quanto ao CO₂ liberado por planta, por volume de nódulos e por massa seca de nódulos não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos testados (Tabela 28), assim como no experimento 4 conduzido em casa de vegetação (Tabela 13). As oscilações entre as médias das leituras foram elevadas, resultando em valores altos de CV e, conseqüentemente anulando as diferenças entre os tratamentos.

Tabela 28 - Média de CO₂ liberado pelos nódulos por planta (CO₂), por volume de nódulo (CO₂/V.nod⁻¹) e por massa seca de nódulos (CO₂/MS.nod⁻¹) em soja inoculada (Si)

e não inoculada (Sni), submetidas à diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	CO ₂ (mg.L ⁻¹ .planta ⁻¹)	CO ₂ /V.nod ⁻¹ (mg.L ⁻¹ .cm ⁻³)	CO ₂ /MS.nod (mg.L ⁻¹ .g ⁻¹)
Sni 0%	0,172a	0,817a	1,322a
Si 0%	0,561a	43,542a	1,026a
Sni 80%	0,179a	1,809a	1,061a
Si 80%	0,161a	13,589a	0,322a
CV (%)	129,12	179,57	75,67

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Esses resultados mostram que embora não havendo diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os tratamentos observa-se que as plantas dos tratamentos Sni 80% e Sni 0%, que apresentaram o maior número de nódulos ativos (Figura 28), foram as que liberaram menos CO₂ por volume de nódulo (Tabela 28). Assim como no experimento 1, com plantas de feijão cultivadas em casa de vegetação, estes dados sugerem que a atividade respiratória esteja mais proporcional a massa de nódulos como um todo, do que com a quantidade de nódulos ativos (Tabela 27).

Na Tabela 29 estão as médias de massa seca da raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar.

Tabela 29 - Médias da produção de massa seca de raiz (MSR), ramo (MSRm) e folha (MSF) e nitrogênio total foliar em plantas de soja inoculada (Si) e não inoculada (Sni), submetidas à diferentes níveis de sombreamento após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamento	MSR (g.planta ⁻¹)	MSRm (g.planta ⁻¹)	MSF (g.planta ⁻¹)	MSV (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio total foliar (dag.kg ⁻¹)
Sni 0%	5,991ab	3,802c	4,923c	0,079c	1,290b
Si 0%	7,986a	7,314a	9,479a	0,404b	2,437a
Sni 80%	5,873ab	4,862bc	6,359bc	0,264bc	1,623b
Si 80%	4,945b	6,145ab	7,722ab	1,672a	2,960a
CV (%)	17,46	12,01	12,02	16,12	11,97

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Verificou-se uma redução significativa na massa seca de raiz ao submeter plantas inoculadas ao sombreamento de 80%, indicando que a redução na luminosidade, ao reduzir a fotossíntese, resultou em menor disponibilidade de fotossintato para suprir o crescimento radicular. Este efeito também foi observado no experimento 4 conduzido em casa de vegetação.

Quanto a MSRm e MSF, as plantas inoculadas que cresceram recebendo luz plena (Si 0%) diferiram significativamente pelo teste de Tukey das plantas do tratamento Sni 0%.

Quanto a MSV, as plantas pertencentes ao tratamento Si 80% apresentou a maior média comparada às do tratamento Sni 0%.

A produção de biomassa pelas culturas está relacionada com a quantidade de radiação fotossinteticamente ativa interceptada e absorvida pelas folhas, bem como à eficiência com que estas convertem a energia radiante em energia química, pela fotossíntese (Radin et al., 2003). Experimento desenvolvido com tomateiro, Radin et al. (2003) concluíram que a presença de sombrite proporcionou distribuição mais uniforme da radiação dentro do dossel vegetal, favorecendo a expansão foliar e, conseqüentemente, a eficiência do uso da radiação. Estes resultados estão de acordo com as médias obtidas neste trabalho para a produção de vagem em plantas de soja submetidas ao sombreamento de 80% em experimento desenvolvido em campo aberto.

De modo geral, pode-se inferir, pelos resultados deste ensaio, que a disponibilidade de luz ótima e a presença de estirpes eficientes na FBN contribuíram de forma significativa na produção de biomassa para a soja (Tabela 29).

O teor de nitrogênio total foliar (Tabela 29) entre as plantas de soja inoculadas (Si 0% e Si 80%) diferiu significativamente comparadas às não inoculadas (Sni 0% e Sni 80%), independente do nível de sombreamento. Estes dados sugerem que o teor de nitrogênio foliar é influenciado pela presença/ausência de inoculante e não pela disponibilidade de luz.

Os resultados obtidos dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *total* e razão clorofila *a/b* foliares estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Média da clorofila *a* (*Cl_a*), *b* (*Cl_b*), total (*Cl_{tot}*) e razão (*Cl_a/Cl_b*) em plantas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas após a floração (Ep2) e cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

Tratamentos	<i>Cl_a</i> (mg.g ⁻¹)	<i>Cl_b</i> (mg.g ⁻¹)	<i>Cl_{tot}</i> (mg.g ⁻¹)	<i>Cl_a/Cl_b</i> (μg.g ⁻¹)
Sni 0%	0,272c	0,154c	0,426c	1,784a
Si 0%	0,743b	0,397b	1,140b	1,889a

Sni 80%	0,660b	0,370b	1,030b	1,779a
Si 80%	1,416a	0,769a	2,185a	1,839a
CV (%)	18,34	18,47	18,11	12,59a

Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Quanto as concentrações de *Cl_a*, *Cl_b* e *Cl_{tot}*, as plantas do tratamento Si 80% diferiram significativamente apresentando as maiores médias em relação àquelas submetidas ao tratamento Si 0% e Sni 80%, estatisticamente iguais entre si (Tabela 30). As plantas do tratamento Sni 0% apresentou a menor média comparada às plantas dos tratamentos Si 0%, Sni 80% e Si 80% (Figura 29 e 30).

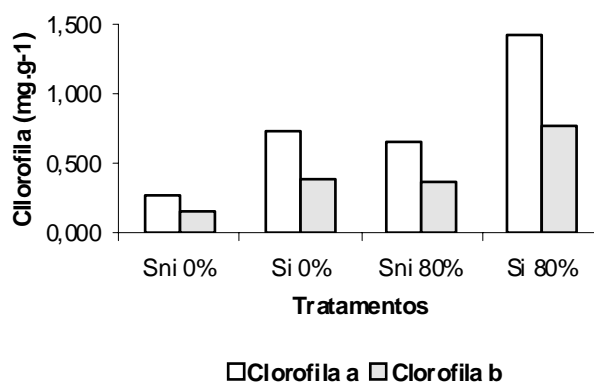


Figura 29 - Efeito do sombreamento na concentração de clorofila *a* e *b* em folhas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas após a floração (Ep2), cultivadas em ambiente externo à casa de vegetação.

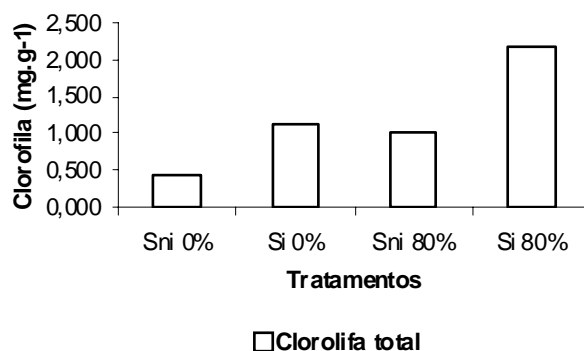


Figura 30 - Efeito do sombreamento na concentração de clorofila total (*Cl_{tot}*) em folhas de soja inoculadas (Si) e não inoculadas (Sni), avaliadas após a floração (Ep2), cultivada em ambiente externo a casa de vegetação.

Neste experimento conduzido em ambiente externo ficou evidenciado claramente a importância da FBN como principal meio de disponibilização de N para a soja e os efeitos deletérios da luz na manutenção da estrutura da clorofila (Figura 31 e 32). As plantas de soja não inoculadas e cultivadas recebendo luz plena apresentaram folhas com coloração amarela intensa e abortamento de flores, ao contrário das plantas que receberam 20% de luz (80% de sombra) em que estes sintomas não foram tão agravados. Folhas amarelas e crescimento interrompido, observados neste experimento e no experimento 5 são sintomas característicos de clorose (Schulze et al., 2005), os quais podem ser manifestados pelo excesso de luz ou pela deficiência de nitrogênio.



Figura 31 - Influência da luz e inoculação com bactérias fixadoras de N₂ no teor de clorofila e crescimento da planta de soja. A esquerda, Sni 0%, e a direita, Sni 80%.



Figura 32 - Planta de soja não inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. com abortamento de flores.

O nitrogênio é componente fundamental da molécula de clorofila podendo esta ser foto-oxidada sob alta irradiação (Streit et al., 2005). Assim, a concentração de nitrogênio foliar pode influenciar decisivamente na capacidade fotossintética das plantas, pois está associado com a síntese de clorofila e à capacidade assimilatória de CO₂ (Donato et al., 2004; Sinclair et al., 2000).

Não houve diferença estatística pelo teste F ($p \geq 0,05$) para Cla/Clb.

O abortamento de flores nas plantas dos tratamento Sni 0% ocorreu porque possivelmente estas plantas não estavam assimilando N₂ e fotossintetizando em quantidades suficientes para suprir a demanda metabólica necessárias pela planta durante o período reprodutivo. Havendo deficiência de fotoassimilados durante a floração, a planta responde abortando flores e frutos, além de comprometer a produção de fitomassa (Tanaka; Fujita, 1979), como foi observado na produção de massa seca de raiz, ramo e folha (Figura 33).

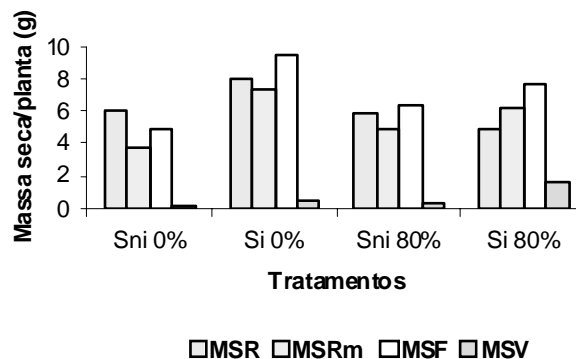


Figura 33 - Efeito do sombreamento na produção de fitomassa em soja cultivada em campo aberto avaliadas após a floração (Ep2).

O sucesso da FBN na soja é resultado de inúmeras pesquisas na seleção de estirpes compatíveis com as cultivares brasileiras, com alta eficiência na FBN e adaptadas às condições ambientais em que a soja é cultivada (Santos et al., 2006).

Diante dos resultados apresentados, pode-se constatar que, eventos fisiológicos como fotossíntese e FBN estão intimamente ligados. A Fixação Biológica de Nitrogênio depende do produto final da fotossíntese, e a assimilação de nitrogênio é necessária para sustentar a produção de biomassa adicional (Foyer et al., 2003). A produção de carbono na fotossíntese, como a sacarose, e sua reoxidação na respiração são etapas fundamentais para a produção de energia (ATP) e NADP e esqueletos de carbono necessários para a síntese de formas

orgânicas de nitrogênio, as quais são exportadas rapidamente do nódulo para a parte aérea (folhas e vagens) dos hospedeiros, via xilema, pelo fluxo da transpiração (Arruda et al., 2001; Coker; Shubert, 1981).

4. Conclusão

- o sombreamento favorece a nodulação em plantas de soja cultivadas em ambientes interno e externo à casa de vegetação, ao contrário das plantas de feijão em que observa aumento na nodulação apenas para as plantas crescidas em casa de vegetação.
- quanto a atividade dos nódulos, constata-se que as plantas de soja são mais sensíveis ao sombreamento comparadas as de feijão, sugerindo que a disponibilidade de fotossintato não é o fator limitante na eficiência da fixação de N_2 para esta espécie.
- o estágio de desenvolvimento é determinante na manutenção da atividade dos nódulos. Em ambas as espécies os nódulos ativos predominam na fase vegetativa, ao contrário dos nódulos inativos que se destacam na fase reprodutiva.
- com relação ao número de nódulos, conclui-se que as plantas de soja são mais seletivas na associação simbiótica comparadas ao feijoeiro que já é conhecido pela sua promiscuidade.
- a disponibilidade ótima de luz e a presença de estirpes eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio contribui de forma significativa na produção de biomassa e de clorofila nas plantas, principalmente da soja que se mostra mais exigente quanto a estes fatores. As plantas de soja não inoculadas e cultivadas recebendo luz plena apresentam clorose e crescimento interrompido mais acentuado comparado às plantas de feijão.

5. SUGESTÕES

Diante dos resultados apresentados neste trabalho sugere-se a realização de análises bioquímicas e identificação genética e/ou molecular para ter certeza quanto a alocação de carboidratos para os nódulos durante o estágio reprodutivo (Ep2) e a origem das estirpes responsáveis pela formação dos nódulos em ambas as espécies vegetais.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, C. de; CARVALHO, M. A. C. de; ARF, O.; SÁ, M. E. de; BUZETTI, S. Uréia em cobertura e via foliar em feijoeiro. **Scientia Agricola**, v.57, n. 2, p. 293-298. 2000.

ARAÚJO, F. F. de; CARMONA, F. G.; TIRITAN, C. S.; CRESTE, J. E.. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 29, n. 4, p. 535-540. 2007.

ARAÚJO, F. F. de; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/ Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1633-1643. 1999.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A.. Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330. 2001.

BLOOM, A. J.; CHAPIN, F. S.; MOONEY, H. A. Resource limitation in plants – An economic analogy. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 363-392. 1985.

BLUMENTHAL, J. M.; RUSSELLE, M. P.; VANCE, C. P. Nitrogenase activity is affected by Reduced partial pressures of N² and NO₃⁻. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1405-1412. 1997.

BRACCINI, A. de L. e; MOTTA, I. de S.; SCAPIM, C.A.; BRACCINI, M. do C. L.; ÁVILA, M. R.; SCHUAB, S.R. P. Semeadura da soja no período de safrinha: potencial fisiológico e sanidade das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 76-86. 2003.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEDE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and soil**, v. 252, p. 55-128. 2003.

BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Biological nitrogen fixation. **Annual Reviews Nutr.** v. 13, p. 317-35. 1993.

CARVALHO, M. A. C.; FURLANI JUNIOR, E.; ARF, O.; SÁ, M. E.; PAULINO, H. B.; BUZETTI, S. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 27, p. 445-450. 2003.

CARVALHO, E. A. de. **Avaliação agrônômica da disponibilização de nitrogênio à cultura de feijão sob sistema de semeadura direta**. 2002. ---f. Tese (Doutor em Agronomia: fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, Dezembro, 2002.

CARVALHO, C. A. B.; SILVA, S. C.; SBRISSIA, A. F.; FAGUNDES, J. L.; CARNEVALLI, R. A.; PINTO, L. F. M.; PEDREIRA, C. G. S. Carboidratos não estruturais e acúmulo de forragem em pastagem de *Cynodon* ssp. sob lotação contínua. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 4, p. 667-674. 2001.

CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; Sutton, William D. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. **Plant Physiology**, v. 60, p. 47-50. 1977.

CHRISTIANSEN, J.; DEAN, D. R. Mechanistic features of the Mo-containing nitrogenase. **Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 269-95. 2001.

COKER, G. T.; SCHUBERT, K. R. Carbon dioxide fixation in Soybean Roots and nodules. **Plant Physiology**, v. 67, p. 691-696. 1981.

COOKSON, S. J.; WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in Arabidopsis leaf cells. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1097-1105. 2005.

DANTAS, B. F.; RIBEIRO, L. DE S.; PEREIRA, M. S. Teores de açúcares solúveis e insolúveis em folhas de videiras, cv. syrah, em diferentes posições no ramo e épocas do ano. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 29, n. 1, p. 42-47. 2007.

DAROS, E.; RONZELLI JÚNIOR, P.; COSTA, J. A.; KOEHLER, H. S. Estresses por sombreamento e desfolhamento no rendimento e seus componentes da variedade de feijão “carioca”. **Scientia Agrária**, v. 1, n. 1-2, p. 55-61. 2000.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. de; SOUZA, E. S. de; FRANÇA, J. G. E.; MACIEL, G. A.. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1087-1093. 2004.

DOUSEAU, S.; ALVARENGA, A. A. de; SANTOS, M. de O.; ARANTES, L. de O. Influência de diferentes condições de sombreamento sobre o crescimento de *Tapirira guianensis* Alb. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto alegre, v. 5, p. 477-479. 2007.

DRUEGE, U.; ZERCHE, S.; KADNER, R. Nitrogen- and storage-affected carbohydrate partitioning in high – light – adapted *Pelargonium* cuttings in relation to survival and adventitious root formation under low light. **Annals of Botany**, v. 94, p. 831-842. 2004.

EGLI, D. B.; CRAFTS-BRANDNER, S. J. Soybean. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. **Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 595-623.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição e crescimento. In: **Nutrição mineral de plantas**. Londrina: Planta, 2006. p. 251-286.

EPISTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1975. 344 p.

FARINELLI, R.; LEMOS, L. B.; PENARIOL, F. G.; EGÉA, M. M.; GASPARATO, M. G. Adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro em plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 307-312. 2006.

FERREIRA, A. N.; ARF, O.; CARVALHO, M. A. C. de; ARAÚJO, R. S.; SÁ, M. E. de; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 507-512. 2000.

FIALHO, L. da S.; GUIMARÃES, V. M.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A.; DIAS, L. A. dos S.; OLIVEIRA, M. G. de A.; JOSÉ, I. C.; S. T. de. Biochemical Composition and Indigestible Oligossaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 87-89. 2006.

FOYER, C. H.; PARRY, M.; NOCTOR, G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plantas. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 382, p. 585-593. 2003.

GOMES, P. **A soja**. São Paulo: Nobel, 1986. 152p.

HERMANS, C.; HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J.; VERBRUGGEN, N. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 12. 2006.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja: Embrapa Cerrados**, 2007. 80p. (Documento/Embrapa Soja, n. 283).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M. O.; GRANGE, L.; MEGIAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biol Fertil Soils**, v. 33, p. 387-394. 2001.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biol Fertil Soils**, v. 31, p. 45-52. 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p.151-164. 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M., A. T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Vargas, Milton Alexandre Teixeira; Hungria, Mariângela. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997, 524p.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. Cap. 2. In: **Microrganismos de importância agrícola**. Araújo, R. S.; Hungria, M. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 1994. 236p. (Documentos/Embrapa Arroz e Feijão, n. 44).

HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J.; DOBEREINER, J. Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.20, n.10, p.1143-1156. 1985.

JANG, JYAN-CHYUN.; SHEEN, J. Sugar Sensing in Higher Plants. **The Plant Cell**, v. 6, n. 11, p. 1665-1679. 1994.

KENDRICK, R. E.; FRANKLAND, B. **Fitocromo e crescimento vegetal**. E.P.U. EDUSP, São Paulo, 1981. Temas de biologia, v. 25.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2004. 452p.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plantas. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 47, p.569-93. 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531p.

LAWN, R. J.; BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybean. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 11-16. 1974.

LIMA, S. C.; LOPES, E. S.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum*) e produtividade da soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 3. 1998.

LIMA JR, É. de C.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M. de; VIEIRA, C. V.; BARBOSA, J. P. R. A. D.. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 33 – 41. 2006.

LINDBLAD, L.; GUERRERO, M. G. Nitrogen fixation and nitrate reduction. In: HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD, R. C.; LONG, S. P. **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: UNEP, 1993. 477p.

LUCAS, O.; MILBOURN, G. M.; WHITFORD, P. N. The translocation of ¹⁴C photosynthate from leaves and pods in *Phaseolus vulgaris* L. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 83, p. 285-90. 1976.

MAHON, J. D. Environmental and genotypic effects on the respiration associated with symbiotic nitrogen fixation in peas. **Plant Physiology**, v. 63, p. 892-897. 1979.

MARR, D. L.; DEVINE, T. E.; PARKER, M. A. Nodulation restrictive genotypes of *Glycine* and *Amphicarpaea*: a comparative analysis. **Plant and Soil**, v. 189, p. 181-188. 1997.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, p. 11-23. 2003.

MARTINS, M.C..M. **Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e nitrogênio ao longo do ciclo de vida de *Hymenae courbaril* var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang. (Leguminosae, Caesalpinioideae)**. 79 f. Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo-SP, 2007.

MEIRA, F. de A.; SÁ, M. E. de; BUZETTI, S.; ARF, O.. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio no feijoeiro irrigado cultivado em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 383-388. 2005.

MEJIA, E. G. de; VALADEZ-VEGA, M. D. C.; REYNOSO-CAMACHO, R.; LOARCAPINA, G. Tannins, Trypsin Inhibitors and Lectin Cytotoxicity in Terapy (*Phaseolus acutifolius*) and Common (*Phaseolus vulgaris*) Beans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, p. 137-145. 2005.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista. Universidade. Rural**, Série. Ciências da Vida. v. 22, n. 1, p. 6-81. 2002.

MILLHOLLON, E. P.; WILLIAMS, L. E. Carbohydrate partitioning and the capacity of apparent nitrogen fixation of soybean plants grown outdoors. **Plant Physiology**, v. 81, p. 280-284. 1986.

MIRANDA, D. M. de; TILLMANN, M. A. A.; NOLDIN, J. A.; BALERINI, F. Bioensaio em casa-de-vegetação na detecção e quantificação de sementes de soja geneticamente modificada. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p. 187-192. 2006.

MÜLLER, J.; STAEHELIN, C.; XIE, ZHI-PING; NEUHAUS-URL, G.; BOLLER, T. Nod factors and chito oligomers elicit an increase in cytosolic calcium aequorin-expressing soybean cells. **Plant Physiology**, v. 124, p. 733-739. 2000.

PETERS, J. W.; FISHER, K.; DEAN, D. R. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p.335-66. 1995.

PORTES, T. de A. Ecofisiologia. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Cultura do feijão comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. 786p.

POSTGATE, J. **Fixação do Nitrogênio**. São Paulo: EPU (Temas em biologia, 32), 1989. 84p.

RADIN, B.; BERGAMASCHI, H.; JUNIOR, C. R.; BARNI, N. A.; MATZENAUER, R.; DIDONÉ, I. A. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 38, n. 9, p. 1017 – 1023. 2003.

RAVEN, P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, n. 3, p. 541-554. 2004.

REIS, V. M. Interações entre plantas e microrganismos. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2005. 24p. (Documentos, 194).

RIBEIRO, A. L. de P.; COSTA, E. C. Desfolhamento em estádios de desenvolvimentos da soja, cultivada BR 16, no rendimento de grãos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 767-771. 2000.

ROESSING, A. C.; GUEDES, L. C. A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região do Brasil Central. In: **Cultura da Soja nos Cerrados**. ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. de M. de. Piracicaba: Potafos, 1993. 535p.

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 12. 2004.

ROMANINI JUNIOR, A.; ARF, O.; BINOTTI, F. F. da S.; SÁ, M. E. de; BUZETTI, S.; FERNANDES, F. A.. Avaliação da inoculação de rizóbio e adubação nitrogenada no desenvolvimento do feijoeiro, sob sistema de plantio direto. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 74-82. 2007.

SÁNCHEZ, E.; SOTO, J. M.; NÚÑEZ, A.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in greenbean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. **Rev. Fitotec., Mex.**, v. 28, n. 1, p. 55-61. 2005.

SANDRIN, C. Z.; DOMINGOS, M.; FIGUEIREDO RIBEIRO, R. de C. L. Partitioning of water soluble carbohydrates in vegetative tissues of *Lolium multiflorum* Lam. Ssp. *Italicum* cv. Lema. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 18, n. 2, p. 299-305, 2006.

SANTOS, M. A. dos; NICOLÁS, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associado à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 67-75. 2006.

SCHEIBLE, WOLF-RÜDIGER. MORCUENDE, R.; CZECHOWSKI, T.; FRITZ, C.; OSUNA, D.; PALACIOS-ROJAS, N.; SCHINDELASCH, D.; THIMM, O.; UDVARDI, M. K.; STITT, M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2483-2499. 2004.

SCHULZE, E. D.; BECK, E.; MÜLLER-HOHENSTEIN, K. **Plant Ecology**. Berlin: Springer, 2005. ----p.

SHARMA, S. B.; SAKADEVAN, K.; SHARMA, S. Mutations conferring azide resistance enhance symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium loti*. **Plant and soil**, v. 189, p. 221-229, 1997.

SILVEIRA, P. M. da S.; BRAZ, A. J. B. PEREIRA; DIDONET, A. D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1083-1087. 2003.

SINCLAIR, T. R.; PINTER Jr., P. J.; KIMBALL, B. A.; ADAMSEN, F. J.; LaMORTE, R. L.; WALL, G. W.; HUNSAKER, D. J.; ADAM, N.; BROOKS, T. J.; GARCIA, R. L.; THOMPSON, T.; LEAVITT, S.; MATTHIAS, A. Leaf nitrogen concentration of wheat subjected to elevated [CO₂] and either water or N deficits. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 79, p. 53-60. 2000.

SORATO, R. P.; CARVALHO, M. A. C. de.; ARF, O. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 895-901. 2004.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G. A variabilidade genética do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. Seropédica. **Embrapa Agrobiologia**, 2000. 59p. (Documentos, 126).

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Biodiversidade RO rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 1999, 51p. (Documentos, 94).

STREETER, J. G. Carbohydrates in soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 66, p. 471-476. 1980.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. do C.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748 – 755. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TANAKA, A.; FUGITA, K. Growth, photosynthesis and yield components in relation to grain yield of the field bean. **J. Fac. Agric. Hokkaido, Univ.**, Sapporo, v. 59, n. 2, p. 145-238. 1979.

TREVASKIS, B.; COLEBATCH, G.; DESBROSSES, G.; WANDREY, M.; WIENKOOP, S.; SAALBACH, G.; UDVARDI, M.. Differentiation of plant cells during symbiotic nitrogen fixation. **Comparative and Functional Genomics**. v. 3, p. 151-157. 2002.

UDVARD, M. K.; DAY, D. A. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 493-523. 1997.

VANCE, C. P. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plants Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. **Plant Physiology**, v. 127, p. 390 – 397. 2001.

VANCE, C. P.; STADE, S.; MAXWELL, C. A. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. **Plant Physiology**, v. 72, p. 469-473. 1983.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação Biológica do Nitrogênio na cultura da soja. In: **Biologia dos solos dos Cerrados**. VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1997. 524p.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. de C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação Biológica do nitrogênio. In: **Cultura da soja nos cerrados**. ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. de M. de. Piracicaba: Potafos, 1993. 535p.

VARGAS, A. A. T.; ATHAYDE, J. T.; SILVEIRA, J. S. M. Inoculação com rizóbios, adubação com macro e micronutrientes, e parcelamento do N-mineral aplicados no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Energia nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 11, n. 1, p. 3-14. 1990.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Adubação nitrogenada, inoculação e época de calagem para a soja em um solo sob cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 8, p. 1127-32. 1982.

WHATLEY, J. M.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU (Temas em biologia, 30), 1982. 101p.

WILLIAMS, L. E.; LEMOINE, R.; SAUER, N. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 7. 2000.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F. de; SANTOS, V. B. dos; CAMPOS, F. L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 561-564. 2007.

YOKOYAMA, L. P. Aspectos conjunturais da produção de feijão. In: Aidar, H.; Kluthcouski, J.; Stone, L. F. **Feijão: Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 251-292.

ZAHRAN, H. H. *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an aride climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 4, p. 968-989. 1999.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FILHO, F. R. F.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818. 2006.

ANEXOS

Anexo I

Valores de CO₂ (mg.L⁻¹) em função do pH e temperatura.

pH	°C										
	10	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
7,67	1,330	1,490	1,515	1,540	1,580	1,620	1,650	1,696	1,740	1,775	1,810
7,68	1,300	1,445	1,476	1,512	1,542	1,580	1,610	1,648	1,694	1,735	1,770
7,69	1,270	1,405	1,437	1,472	1,508	1,540	1,580	1,616	1,652	1,694	1,730
7,70	1,235	1,370	1,402	1,434	1,468	1,504	1,540	1,576	1,612	1,648	1,688
7,71	1,205	1,340	1,366	1,399	1,431	1,464	1,500	1,535	1,572	1,608	1,644
7,72	1,175	1,310	1,336	1,362	1,396	1,428	1,465	1,496	1,532	1,568	1,604
7,73	1,150	1,280	1,306	1,332	1,360	1,393	1,425	1,457	1,492	1,528	1,564
7,74	1,120	1,250	1,276	1,302	1,328	1,358	1,390	1,422	1,454	1,486	1,522
7,75	1,090	1,220	1,246	1,272	1,298	1,324	1,350	1,387	1,419	1,451	1,484
7,76	1,065	1,190	1,216	1,242	1,268	1,294	1,320	1,351	1,384	1,416	1,448
7,77	1,040	1,160	1,186	1,212	1,238	1,264	1,290	1,318	1,349	1,381	1,413
7,78	1,015	1,130	1,156	1,182	1,208	1,234	1,260	1,288	1,316	1,344	1,377
7,79	0,995	1,100	1,126	1,154	1,178	1,208	1,230	1,256	1,286	1,314	1,342
7,80	0,970	1,085	1,097	1,122	1,151	1,174	1,205	1,228	1,253	1,284	1,312
7,81	0,945	1,055	1,080	1,094	1,118	1,148	1,170	1,203	1,226	1,251	1,282
7,82	0,920	1,025	1,052	1,075	1,091	1,114	1,145	1,168	1,201	1,224	1,248
7,83	0,898	1,000	1,023	1,049	1,070	1,088	1,110	1,142	1,166	1,199	1,222
7,84	0,878	0,975	0,998	1,021	1,046	1,065	1,085	1,109	1,139	1,164	1,197
7,85	0,855	0,950	0,973	0,996	1,019	1,043	1,060	1,083	1,108	1,136	1,162
7,86	0,835	0,930	0,948	0,971	0,994	1,017	1,040	1,058	1,081	1,107	1,133
7,87	0,815	0,910	0,927	0,946	0,969	0,992	1,015	1,038	1,056	1,079	1,106
7,88	0,797	0,890	0,907	0,924	0,944	0,967	0,990	1,013	1,036	1,054	1,077
7,89	0,778	0,865	0,887	0,904	0,921	0,942	0,965	0,988	1,011	1,034	1,052
7,90	0,760	0,840	0,863	0,884	0,901	0,918	0,940	0,963	0,986	1,009	1,032
7,91	0,740	0,822	0,839	0,861	0,880	0,898	0,915	0,938	0,961	0,984	1,007
7,92	0,720	0,800	0,821	0,837	0,859	0,877	0,895	0,912	0,936	0,957	0,982
7,93	0,709	0,780	0,799	0,820	0,835	0,857	0,875	0,892	0,909	0,934	0,957
7,94	0,692	0,765	0,779	0,798	0,819	0,834	0,855	0,873	0,889	0,906	0,932
7,95	0,675	0,750	0,764	0,777	0,797	0,818	0,832	0,853	0,879	0,885	0,908
7,96	0,667	0,730	0,748	0,763	0,776	0,796	0,816	0,831	0,851	0,868	0,886
7,97	0,640	0,710	0,728	0,745	0,761	0,775	0,795	0,814	0,830	0,848	0,864
7,98	0,625	0,690	0,706	0,724	0,741	0,758	0,774	0,792	0,810	0,828	0,845
7,99	0,608	0,675	0,690	0,705	0,723	0,740	0,756	0,774	0,792	0,810	0,828
8,00	0,590	0,660	0,674	0,690	0,706	0,722	0,738	0,754	0,772	0,791	0,807
8,01	0,578	0,645	0,659	0,673	0,689	0,705	0,720	0,737	0,754	0,772	0,788
8,02	0,765	0,630	0,644	0,657	0,672	0,688	0,702	0,719	0,735	0,753	0,768
8,03	0,550	0,615	0,629	0,642	0,656	0,671	0,684	0,701	0,717	0,734	0,750
8,04	0,537	0,600	0,614	0,627	0,641	0,655	0,668	0,684	0,700	0,716	0,731
8,05	0,525	0,585	0,599	0,612	0,626	0,640	0,653	0,668	0,682	0,698	0,712
8,06	0,510	0,570	0,584	0,597	0,610	0,624	0,637	0,652	0,666	0,680	0,695
8,07	0,500	0,556	0,569	0,582	0,595	0,609	0,622	0,636	0,650	0,663	0,679
8,08	0,486	0,544	0,554	0,567	0,581	0,594	0,607	0,620	0,634	0,647	0,662
8,09	0,473	0,528	0,540	0,553	0,566	0,579	0,592	0,605	0,619	0,632	0,647
8,10	0,463	0,515	0,527	0,539	0,551	0,564	0,578	0,590	0,604	0,617	0,632

pH	°C										
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
7,67	1,850	1,900	1,950	2,010	2,070	2,130	2,190	2,250	2,310	2,380	2,450
7,68	1,808	1,846	1,895	1,946	2,002	2,060	2,120	2,180	2,243	2,306	2,371
7,69	1,765	1,804	1,843	1,890	1,943	2,000	2,057	2,114	2,172	2,231	2,290
7,70	1,725	1,760	1,800	1,840	1,885	1,938	1,992	2,046	2,100	2,155	2,210
7,71	1,682	1,720	1,755	1,795	1,835	1,880	1,928	1,978	2,028	2,078	2,130
7,72	1,642	1,680	1,715	1,750	1,790	1,832	1,875	1,918	1,962	2,006	2,050
7,73	1,600	1,636	1,673	1,710	1,749	1,790	1,831	1,873	1,915	1,957	2,000
7,74	1,560	1,596	1,632	1,668	1,704	1,743	1,783	1,823	1,865	1,907	1,950
7,75	1,520	1,556	1,592	1,628	1,664	1,700	1,737	1,776	1,817	1,858	1,900
7,76	1,480	1,514	1,556	1,588	1,624	1,660	1,698	1,737	1,776	1,815	1,855
7,77	1,445	1,478	1,514	1,551	1,584	1,620	1,657	1,695	1,733	1,771	1,810
7,78	1,410	1,443	1,476	1,510	1,545	1,589	1,616	1,653	1,690	1,727	1,765
7,79	1,375	1,407	1,441	1,474	1,503	1,540	1,575	1,611	1,647	1,283	1,720
7,80	1,340	1,372	1,404	1,439	1,472	1,500	1,539	1,574	1,609	1,644	1,680
7,81	1,310	1,337	1,369	1,401	1,437	1,470	1,504	1,538	1,572	1,606	1,640
7,82	1,280	1,308	1,334	1,367	1,399	1,435	1,468	1,501	1,534	1,567	1,600
7,83	1,245	1,277	1,306	1,331	1,363	1,395	1,427	1,460	1,493	1,526	1,560
7,84	1,220	1,242	1,270	1,298	1,328	1,360	1,392	1,424	1,456	1,488	1,520
7,85	1,195	1,216	1,239	1,267	1,295	1,325	1,355	1,386	1,417	1,448	1,480
7,86	1,160	1,192	1,212	1,239	1,266	1,295	1,324	1,354	1,384	1,414	1,445
7,87	1,130	1,158	1,184	1,208	1,236	1,265	1,295	1,325	1,335	1,385	1,415
7,88	1,105	1,128	1,156	1,182	1,208	1,235	1,265	1,295	1,325	1,355	1,385
7,89	1,087	1,104	1,129	1,154	1,183	1,210	1,239	1,268	1,297	1,326	1,355
7,90	1,050	1,074	1,099	1,124	1,152	1,180	1,209	1,238	1,267	1,296	1,325
7,91	1,030	1,053	1,077	1,102	1,125	1,150	1,178	1,206	1,243	1,262	1,290
7,92	1,005	1,026	1,049	1,072	1,096	1,120	1,147	1,174	1,201	1,228	1,255
7,93	0,980	1,003	1,026	1,047	1,071	1,090	1,117	1,147	1,171	1,198	1,225
7,94	0,955	0,978	1,001	1,021	1,042	1,060	1,086	1,112	1,138	1,164	1,190
7,95	0,931	0,954	0,976	0,995	1,015	1,035	1,060	1,085	1,110	1,135	1,160
7,96	0,907	0,928	0,949	0,971	0,993	1,015	1,038	1,061	1,084	1,107	1,130
7,97	0,887	0,908	0,920	0,950	0,970	0,990	1,011	1,032	1,053	1,075	1,095
7,98	0,862	0,880	0,902	0,926	0,947	0,967	0,987	1,007	1,028	1,049	1,070
7,99	0,846	0,865	0,885	0,906	0,927	0,947	0,965	0,983	1,002	1,021	1,040
8,00	0,824	0,840	0,856	0,873	0,892	0,910	0,930	0,950	0,970	0,990	1,010
8,01	0,804	0,821	0,837	0,853	0,872	0,890	0,909	0,928	0,947	0,966	0,985
8,02	0,784	0,801	0,818	0,834	0,852	0,870	0,889	0,908	0,927	0,946	0,965
8,03	0,765	0,782	0,800	0,816	0,834	0,850	0,869	0,888	0,907	0,926	0,945
8,04	0,747	0,764	0,782	0,798	0,815	0,831	0,849	0,868	0,887	0,906	0,925
8,05	0,728	0,746	0,763	0,780	0,795	0,812	0,830	0,848	0,867	0,886	0,895
8,06	0,711	0,728	0,745	0,762	0,777	0,793	0,809	0,825	0,841	0,858	0,875
8,07	0,764	0,711	0,727	0,743	0,759	0,775	0,791	0,807	0,823	0,840	0,857
8,08	0,678	0,694	0,709	0,725	0,741	0,757	0,774	0,791	0,808	0,825	0,843
8,09	0,661	0,677	0,692	0,707	0,723	0,740	0,757	0,774	0,791	0,809	0,827
8,10	0,645	0,659	0,675	0,690	0,706	0,722	0,739	0,756	0,773	0,790	0,807

pH	°C										
	10	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
8,11	0,453	0,502	0,514	0,526	0,538	0,551	0,563	0,576	0,589	0,602	0,616
8,12	0,441	0,490	0,501	0,513	0,525	0,537	0,550	0,562	0,575	0,588	0,601
8,13	0,430	0,478	0,489	0,500	0,512	0,524	0,536	0,548	0,561	0,573	0,586
8,14	0,420	0,467	0,477	0,488	0,499	0,511	0,523	0,534	0,547	0,559	0,571
8,15	0,410	0,457	0,466	0,476	0,487	0,491	0,510	0,522	0,533	0,545	0,577
8,16	0,400	0,445	0,456	0,465	0,476	0,486	0,497	0,509	0,521	0,531	0,543
8,17	0,390	0,435	0,444	0,454	0,464	0,475	0,485	0,496	0,508	0,519	0,530
8,18	0,380	0,424	0,434	0,443	0,453	0,464	0,474	0,484	0,495	0,507	0,518
8,19	0,372	0,413	0,422	0,432	0,442	0,453	0,462	0,472	0,483	0,493	0,505
8,20	0,363	0,403	0,412	0,422	0,432	0,441	0,450	0,421	0,471	0,481	0,492
8,21	0,355	0,393	0,402	0,411	0,421	0,430	0,439	0,450	0,460	0,470	0,480
8,22	0,345	0,383	0,392	0,401	0,409	0,420	0,429	0,438	0,449	0,459	0,468
8,23	0,338	0,373	0,382	0,391	0,400	0,410	0,419	0,428	0,437	0,447	0,458
8,24	0,329	0,365	0,372	0,381	0,391	0,399	0,408	0,418	0,426	0,435	0,446
8,25	0,321	0,357	0,364	0,372	0,380	0,389	0,398	0,407	0,415	0,425	0,434
8,26	0,312	0,348	0,356	0,364	0,371	0,379	0,388	0,397	0,405	0,414	0,423
8,27	0,304	0,349	0,347	0,355	0,363	0,371	0,378	0,387	0,396	0,404	0,413
8,28	0,298	0,332	0,339	0,347	0,354	0,363	0,370	0,378	0,386	0,395	0,403
8,29	0,291	0,323	0,331	0,338	0,346	0,354	0,361	0,369	0,377	0,385	0,393
8,30	0,282	0,316	0,323	0,330	0,337	0,345	0,352	0,361	0,368	0,375	0,383
8,31	0,276	0,307	0,315	0,322	0,329	0,337	0,344	0,352	0,360	0,367	0,374
8,32	0,268	0,300	0,306	0,314	0,321	0,329	0,336	0,344	0,351	0,359	0,366
8,33	0,263	0,293	0,299	0,306	0,313	0,321	0,328	0,335	0,343	0,350	0,358
8,34	0,257	0,286	0,292	0,299	0,305	0,313	0,320	0,327	0,334	0,342	0,349
8,35	0,251	0,279	0,285	0,291	0,297	0,305	0,312	0,319	0,326	0,333	0,341
8,36	0,245	0,272	0,279	0,285	0,291	0,298	0,304	0,311	0,318	0,325	0,332
8,37	0,238	0,265	0,271	0,278	0,284	0,291	0,297	0,303	0,310	0,317	0,324
8,38	0,233	0,259	0,265	0,271	0,277	0,284	0,290	0,296	0,302	0,309	0,316
8,39	0,227	0,253	0,258	0,264	0,270	0,277	0,283	0,289	0,295	0,302	0,308
8,40	0,221	0,247	0,252	0,257	0,263	0,269	0,276	0,282	0,289	0,295	0,301
8,41	0,216	0,241	0,246	0,252	0,257	0,263	0,269	0,275	0,282	0,288	0,294
8,42	0,211	0,235	0,240	0,246	0,251	0,257	0,262	0,268	0,275	0,281	0,287
8,43	0,206	0,229	0,234	0,240	0,245	0,251	0,256	0,262	0,268	0,274	0,280
8,44	0,202	0,223	0,229	0,234	0,239	0,244	0,250	0,255	0,261	0,267	0,273
8,45	0,197	0,218	0,223	0,228	0,233	0,238	0,244	0,249	0,254	0,260	0,266
8,46	0,190	0,213	0,218	0,223	0,228	0,233	0,238	0,243	0,248	0,254	0,259
8,470	0,185	0,207	0,212	0,217	0,222	0,227	0,232	0,237	0,243	0,248	0,253

pH	°C										
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
8,11	0,630	0,643	0,656	0,672	0,689	0,705	0,722	0,739	0,756	0,773	0,790
8,12	0,615	0,627	0,641	0,655	0,671	0,687	0,704	0,721	0,739	0,758	0,775
8,13	0,600	0,612	0,626	0,640	0,654	0,669	0,686	0,703	0,720	0,737	0,755
8,14	0,586	0,598	0,611	0,624	0,637	0,651	0,667	0,683	0,699	0,716	0,733
8,15	0,571	0,583	0,596	0,610	0,622	0,636	0,651	0,667	0,683	0,699	0,715
8,16	0,556	0,569	0,582	0,594	0,608	0,622	0,637	0,652	0,667	0,682	0,698
8,17	0,542	0,556	0,567	0,580	0,593	0,607	0,622	0,637	0,652	0,667	0,683
8,18	0,529	0,542	0,553	0,566	0,579	0,591	0,605	0,620	0,635	0,650	0,665
8,19	0,517	0,528	0,539	0,552	0,564	0,576	0,589	0,603	0,617	0,631	0,645
8,20	0,504	0,516	0,527	0,539	0,552	0,564	0,577	0,591	0,605	0,619	0,633
8,21	0,491	0,503	0,514	0,525	0,537	0,550	0,563	0,576	0,590	0,604	0,618
8,22	0,479	0,489	0,500	0,511	0,523	0,535	0,548	0,564	0,674	0,588	0,602
8,23	0,467	0,477	0,488	0,499	0,511	0,521	0,534	0,547	0,560	0,573	0,586
8,24	0,456	0,465	0,476	0,486	0,497	0,509	0,522	0,535	0,548	0,561	0,575
8,25	0,445	0,454	0,464	0,474	0,484	0,495	0,507	0,519	0,531	0,543	0,556
8,26	0,433	0,443	0,454	0,463	0,473	0,483	0,494	0,505	0,516	0,528	0,540
8,27	0,422	0,432	0,442	0,452	0,462	0,472	0,482	0,493	0,504	0,515	0,526
8,28	0,412	0,421	0,431	0,441	0,451	0,461	0,471	0,481	0,492	0,503	0,514
8,29	0,402	0,411	0,421	0,430	0,440	0,450	0,460	0,470	0,480	0,490	0,501
8,30	0,392	0,401	0,410	0,419	0,429	0,439	0,449	0,459	0,469	0,479	0,489
8,31	0,382	0,391	0,400	0,409	0,418	0,428	0,438	0,448	0,458	0,468	0,478
8,32	0,373	0,381	0,390	0,399	0,408	0,417	0,426	0,435	0,445	0,455	0,465
8,33	0,365	0,372	0,380	0,389	0,398	0,406	0,415	0,424	0,434	0,444	0,454
8,34	0,357	0,364	0,371	0,379	0,388	0,397	0,406	0,415	0,424	0,433	0,443
8,35	0,348	0,355	0,363	0,370	0,378	0,387	0,396	0,405	0,414	0,423	0,432
8,36	0,340	0,347	0,355	0,362	0,369	0,377	0,385	0,394	0,403	0,412	0,421
8,37	0,331	0,339	0,346	0,353	0,361	0,368	0,376	0,384	0,393	0,402	0,411
8,38	0,323	0,330	0,338	0,345	0,352	0,359	0,367	0,375	0,383	0,392	0,401
8,39	0,315	0,322	0,329	0,336	0,343	0,350	0,358	0,366	0,374	0,383	0,392
8,40	0,307	0,314	0,321	0,327	0,334	0,341	0,349	0,357	0,365	0,373	0,382
8,41	0,300	0,306	0,313	0,319	0,327	0,333	0,341	0,349	0,357	0,365	0,373
8,42	0,293	0,299	0,305	0,311	0,319	0,325	0,332	0,339	0,347	0,355	0,363
8,43	0,286	0,292	0,298	0,304	0,311	0,318	0,325	0,332	0,340	0,348	0,356
8,44	0,279	0,285	0,291	0,297	0,303	0,310	0,317	0,324	0,331	0,339	0,347
8,45	0,272	0,277	0,283	0,289	0,296	0,303	0,310	0,317	0,324	0,331	0,339
8,46	0,265	0,270	0,276	0,282	0,289	0,295	0,302	0,309	0,316	0,323	0,330
8,47	0,258	0,263	0,269	0,275	0,281	0,287	0,293	0,300	0,307	0,314	0,321