

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

MARCA DE ABSORÇÃO DO NITROGÊNIO DO SOLO, DO FERTILIZANTE E DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.) E FEIJÃO-COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) DETERMINADA COM USO DE ^{15}N ⁽¹⁾

Marciano de Medeiros Pereira Brito⁽²⁾, Takashi Muraoka⁽³⁾ & Edson Cabral da Silva⁽⁴⁾

RESUMO

O feijão-comum e o feijão-caupi estão entre as principais fontes de proteína vegetal para grande parte da população mundial, sobretudo aquela de baixa renda, e o N é o principal constituinte de proteínas. Os objetivos deste trabalho foram de avaliar, por meio da técnica isotópica e tendo como plantas-controle arroz e soja não nodulante, as contribuições relativas das fontes de N (N_2 -fixação simbiótica, N-solo e N-fertilizante) no desenvolvimento do feijão-comum e caupi ao longo do ciclo e comparar o método isotópico (MI) com o método da diferença (MD) para avaliação da fixação simbiótica de N_2 . A pesquisa foi realizada em casa de vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, utilizando-se vasos com 5 kg de terra de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 16 tratamentos e três repetições. Os tratamentos (fatorial 8 x 2) compreenderam oito épocas de coleta: 17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 e 78 dias após a semeadura (DAS) e duas culturas: feijão-comum e feijão-caupi. Utilizou-se uma dose de 10 mg kg⁻¹ de N no solo, na forma de ureia, enriquecida com 10 % de átomos de ^{15}N em excesso. A fixação simbiótica forneceu a maior parte do N acumulado nas plantas de feijão e caupi, seguida, em ordem decrescente, pelo solo e fertilizante. A maior taxa de fixação simbiótica de N ocorreu a partir da fase de prefloração do feijão e do caupi. Após a fase inicial (24 DAS), o arroz e a soja não nodulante tornaram-se adequadas plantas-controle da fixação simbiótica de N_2 . Houve boa concordância entre o MI e o MD, exceto nos estádios iniciais das culturas.

Termos de indexação: ^{15}N , fixação simbiótica de N, absorção de N, leguminosas.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em dezembro de 2007 e aprovado em maio de 2009.

⁽²⁾ Engenheiro-Agrônomo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo – CENA/USP. Av. Centenário 303, CEP 13416-000 Piracicaba (SP). Email: marcianobrito@hotmail.com

⁽³⁾ Professor Associado, CENA/USP. Bolsista do CNPq. E-mail: muraoka@cena.usp.br

⁽⁴⁾ Pós-Doutorando, CENA/USP. Bolsista da FAPESP. E-mail: ecsilva@cena.usp.br

SUMMARY: UPTAKE RATE OF NITROGEN FROM SOIL AND FERTILIZER, AND N DERIVED FROM SYMBIOTIC FIXATION IN COWPEA (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.) AND COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) DETERMINED USING THE ^{15}N ISOTOPE

Common bean (Phaseolus vulgaris L.) and cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.) are among the main sources of plant protein for a large part of the world population, mainly that of low income, and nitrogen is the main constituent of these proteins. The objectives of this study were to evaluate, through the ^{15}N -dilution technique and using rice and non-nodulating soybean as control plants, the relative contributions of nitrogen sources (symbiotically fixed N, soil native N and fertilizer N) on the growth of common bean and cowpea and to compare the isotopic technique (ID) with the difference methods (DM) for the evaluation of symbiotic N_2 fixation. The study was carried out in a greenhouse of the Center for Nuclear Energy in Agriculture - CENA/USP, Sao Paulo State, Brazil, using 5 kg pots with a Typic Haplustox (Dystrophic Red-Yellow Latosol). The experiment was arranged in completely randomized blocks, with 16 treatments and three replications, in an 8 x 2 factorial design. The treatments were eight sampling times: 7, 24, 31, 38, 47, 58, 68 and 78 days after sowing (DAS) and two crops: common bean and cowpea. An N rate of 10 mg kg⁻¹ soil was used, as urea, enriched with an excess of 10 % of ^{15}N atoms. Symbiotic N fixation supplied the bean and cowpea plants with the greatest amount of accumulated N, followed, in decreasing order, by soil and fertilizer. The highest rate of N symbiotic fixation was observed at the pre-flowering growth stage of the bean and cowpea plants. After the initial growth stage, 24 DAS, rice and non nodulating soybean were appropriate control plants to evaluate symbiotic N fixation. There was a good agreement between ID and DM, except in the initial growth stage of the crops.

Index terms: nitrogen-15, symbiotic nitrogen fixation, nitrogen absorption, legumes.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como feijão-macassar ou feijão-de-corda, é uma espécie de ampla distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais, em virtude de estas apresentarem condições edafoclimáticas semelhantes às do seu provável berço de origem: a África. Segundo a FAO (2007), estima-se que no ano de 2003 foram cultivados no mundo cerca de 9,82 milhões de hectares de caupi. A produção mundial no mesmo ano foi de 3,72 milhões de toneladas de grãos secos, com rendimento médio de 378 kg ha⁻¹, destacando-se a Nigéria como maior produtor, com 2,1 milhões de toneladas, seguida por Niger, com 0,4 milhão.

No Brasil, embora os dados do IBGE (2005) referentes à produção nacional de feijão englobem as espécies *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*, estima-se que sejam cultivados cerca de 1,5 milhão de hectares de feijão-caupi, com produtividade média de aproximadamente 300 kg ha⁻¹ (Embrapa, 2008). Em razão das condições de adaptabilidade e do hábito alimentar da população, o caupi é cultivado predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, constituindo a principal cultura de subsistência para a população mais carente, pelo seu alto valor nutritivo e pela geração de emprego e renda na zona rural (Martins et al., 2003).

A produtividade média de feijão-comum no Brasil, segundo o IBGE (2005), também é baixa, variando muito entre as diferentes regiões e épocas de cultivo, classificadas como “das águas” (690 kg ha⁻¹), “da seca” (797 kg ha⁻¹) e “de inverno” (2.123 kg ha⁻¹). A produtividade média de três a cinco vezes superior na safrinha e no inverno, sobretudo na região Centro-Sul, decorre das condições muito diferentes de cultivo, com o uso de alta tecnologia e irrigação, diferentemente das outras épocas de produção (Silveira et al., 2001). Entre os vários fatores que contribuem para a baixa produtividade média dessas espécies, destaca-se o manejo da fertilidade do solo, particularmente pelo insuficiente suprimento de N (Hungria et al., 1991; Martins et al., 2003). Estima-se que 40 % da área cultivada com feijoeiro na América Latina e 60 % das áreas na África e no Oriente Médio apresentem deficiência de N (CIAT, 1990).

O N necessário ao feijoeiro e ao caupi pode provir do solo, principalmente pela mineralização da matéria orgânica, dos fertilizantes nitrogenados e da fixação biológica de N_2 (FBN), mediante a associação de bactérias, genericamente denominadas de rizóbios, com as raízes dessas leguminosas (Hungria et al., 1991; Franco et al., 2002; Silva et al., 2006). Normalmente a FBN é bastante eficiente em caupi, o qual, quando bem nodulado, pode dispensar outras fontes de N e atingir alta produtividade (Rumjanek et al., 2005). Segundo esses autores, as estimativas da

FBN no campo são, entretanto, bastante variáveis, correspondendo de 40 a 90 % do total de N acumulado pela cultura. Essa variabilidade pode ser atribuída às diferenças do genótipo tanto da planta como do rizóbio (Rumjanek et al., 2005; Xavier et al., 2007). Segundo Martins et al. (2003), a inoculação de rizóbio em caupi, em área de sequeiro, pode aumentar a produtividade em até 35 % – equivalente à aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N mineral. Por sua vez, Alfaia (1997) verificou maior contribuição do N do solo e da fixação simbiótica para o caupi, comparada à ureia ou sulfato de amônio, na dose de 30 kg ha⁻¹, e não houve resposta em produção à aplicação desse nutriente.

As condições edafoclimáticas, particularmente a disponibilidade de N na solução do solo na fase inicial da cultura, pode influenciar a magnitude da FBN (Tsai et al., 1993; Martins et al., 2003). O conhecimento do início da nodulação e, conseqüentemente, da FBN torna-se importante, uma vez que após a inoculação e o início da FBN pode ocorrer deficiência de N, decorrente de assincronismo entre o esgotamento de N dos cotilédones e o início da nodulação (Franco & Döbereiner, 1968; Hungria et al., 1991; Xavier et al., 2007). O conhecimento da capacidade de FBN pelas culturas pode auxiliar a tomada de decisão quanto ao manejo do solo e da cultura, consistindo numa forma de aumentar a produtividade (Tsai et al., 1993; Franco et al., 2002). Nesse aspecto, pode trazer benefícios econômicos ao produtor, devido à economia de fertilizantes; e ambientais, pela economia de energia para a produção de fertilizantes nitrogenados e pela mitigação de riscos de poluição dos recursos hídricos, por nitrato, e da atmosfera, por óxido nitroso, quando do manejo inadequado do fertilizante. Nos estudos sobre a dinâmica do N no sistema solo-planta, muitas vezes é difícil quantificar a recuperação do N, assim como a fonte originária, pelo método da diferença, o que é possível, com maior acurácia, com o emprego de uma fonte marcada com ¹⁵N (Urquiaga & Boddey, 1987; Alfaia, 1997). Para avaliar o N proveniente da fixação biológica, com uso de ¹⁵N, é necessário utilizar uma planta-controle, ou seja, uma planta incapaz de obter contribuição da FBN (Alves et al., 2005).

Assim como o caupi, o feijão-comum também apresenta FBN, mas a eficiência de fixação é geralmente baixa, sendo a fertilização nitrogenada, na maioria das vezes, recomendada para atender às exigências das plantas (Oliveira et al., 2003). Estimativas das taxas de FBN obtidas em experimentos de campo realizados na América do Sul, na América Central e na África variaram de 4 a 124 kg ha⁻¹ de N (Henson, 1993; Hungria & Vargas, 1997). Para o caupi, em condições de campo, variam de 40 a 90 % do total de N acumulado pela cultura (Rumjanek et al., 2005).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar, por meio da técnica da diluição isotópica e tendo como plantas-controle arroz e soja não nodulante, as contribuições

relativas das fontes N₂-fixação simbiótica, N-solo e N-ureia no desenvolvimento do feijão-comum e feijão-caupi ao longo do ciclo e comparar o método isotópico com o método da diferença para avaliação da fixação simbiótica de N₂.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), localizado em Piracicaba-SP. Utilizou-se solo coletado da camada de 0 a 20 cm de profundidade de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico textura média, pertencente à fazenda experimental (Fazenda Sertãozinho) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), município de Piracicaba-SP.

A terra foi seca ao ar, destorroada e passada em peneira com malha de 4 mm de abertura; em seguida, foram acondicionados 5 kg em vasos plásticos. Na caracterização química e granulométrica do solo, em amostras coletadas antes do início do experimento, encontraram-se os seguintes resultados: pH (CaCl₂): 5,2; MO: 20,5 g dm⁻³; P (resina): 6,0 mg dm⁻³; Ca: 9,3 mmol_c dm⁻³; Mg: 2,4 mmol_c dm⁻³; K: 0,5 mmol_c dm⁻³; H + Al: 43,0 mmol_c dm⁻³; SB: 12,2 mmol_c dm⁻³; T: 55,0 mmol_c dm⁻³; saturação por bases: 22,1 %; Zn: 3,4 mg dm⁻³; Cu: 0,6 mg dm⁻³; Mn: 4,2 mg dm⁻³; Fe: 58,0 mg dm⁻³, com os micronutrientes extraídos em DTPA; e 720, 220 e 60 g kg⁻¹ de areia, argila e silte, respectivamente.

A calagem foi realizada um mês antes da semeadura, na dose de 5,1 g de calcário dolomítico por vaso, considerando-se os resultados da análise do solo e recomendação descrita em Raij et al. (1996). O solo foi mantido devidamente umedecido e, no décimo sexto dia após a calagem, foram aplicados 100 mg kg⁻¹ de P e 50 mg kg⁻¹ de K no solo, na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. O cloreto de potássio e os micronutrientes (MnCl₂, 1,81 g L⁻¹; ZnSO₄, 0,22 g L⁻¹; CuSO₄, 0,08 g L⁻¹; H₂MoO₄, 0,02 g L⁻¹; e H₃BO₃, 2,86 g L⁻¹) foram aplicados na forma de solução.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 16 tratamentos e três repetições. Os tratamentos (fatorial 8 x 2) compreenderam oito épocas de coleta: 17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 e 78 dias após a semeadura (DAS) e duas culturas: feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Como plantas-controle da fixação simbiótica de N₂, foram utilizados arroz (*Oryza sativa* L.) e soja não nodulante (*Glycine max* L. Merrill). As sementes das leguminosas fixadoras de N₂ (feijão-comum e feijão-caupi) foram inoculadas com estirpes de rizóbios antes da semeadura. Para o feijão-caupi, utilizou-se a estirpe BR 2001, e para o feijão-comum, a estirpe CIT 899.

A semeadura do feijão-comum (cultivar Carioca), feijão caupi (cultivar CNC x 284-4E) e das plantas-controle arroz (cultivar IAC-25) e soja não nodulante (cultivar D-71-9331) foi realizada na densidade de seis sementes por vaso, com posterior desbaste no terceiro dia após a emergência, mantendo-se três plantas por vaso. As regas foram realizadas diariamente com água destilada, e a umidade, mantida a 80 % da capacidade de campo.

A adubação nitrogenada foi realizada logo após o desbaste, na dose de 10 mg kg⁻¹ de N no solo (equivalente a 27 kg ha⁻¹ de N, considerando 5 kg por vaso), num total de 50 mg de N por vaso, por meio de uma solução de ureia enriquecida em 10 % de átomos de ¹⁵N em excesso. A dose de N teve como finalidade marcar o solo com ¹⁵N e fornecer o nutriente numa quantidade que estimulasse a nodulação do feijão-comum e do caupi (Franco & Döbereiner, 1968).

A colheita foi realizada por meio de amostragens ao longo do ciclo das culturas (17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 e 78 DAS), exceto nas épocas 24, 38, 47 e 68 DAS para a soja não nodulante. O material colhido de cada vaso (ramos, pecíolos, pedúnculos e folhas) – exceto em caso de presença de vagens, em que estas foram separadas do restante da parte aérea – foi misturado e seco em estufa a 65 °C, por 72 h, determinando-se a massa de matéria seca (MMS). Em seguida, foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira de 1,68 mm (10 mesh), para as análises de N total e composição isotópica do N.

O N total foi determinado pelo método de Kjeldahl, descrito por Bremner & Mulvaney (1982). Quanto às análises da composição isotópica de N, as amostras foram processadas de acordo com o método de Rittenberg (1946); partindo-se do destilado final obtido na análise da percentagem de N total, os extratos foram novamente acidificados com H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e concentrados por evaporação, e o N-NH₄⁺ foi convertido em N₂ por oxidação com hipobrometo de lítio (LiOBr) (Porter & O'Deen, 1977). As análises da composição isotópica de N foram determinadas em espectrômetro de massa Atlas Varian Mat modelo CH-4, no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP.

A atividade da enzima nitrogenase foi medida indiretamente por meio do método da atividade de redução do acetileno (ARA) (Hardy et al., 1968). Após a coleta, as raízes nodulantes foram colocadas em frascos de vidro de 1.000 mL, os quais foram fechados hermeticamente. Retiraram-se 10 % da atmosfera do vidro e injetaram-se 10 % de C₂H₂. Após 30 min, retirou-se amostra com seringas plásticas e injetou-se 0,5 cm³ em cromatógrafo de gás tipo Beckman modelo GC-65, usando-se detector de ionização de chama de H₂ a 125 °C e coluna contendo Poropak N de 0,149 a 0,177 mm (100 a 80 mesh) a 50 °C. Todo o procedimento foi de acordo com Saito et al. (1980). Preparou-se padrão de 500 mg kg⁻¹ de C₂H₄ para a determinação do controle, usando frascos de vidros vazios e com injeção de C₂H₂. As avaliações obedeceram à seguinte sequência de cálculos:

- a) Determinação da atividade da nitrogenase (AN_{se}, μmol h⁻¹)

$$AN_{se} = K \times K' \times VF \times \frac{1}{VI} \times \frac{1}{TI} \quad (1)$$

em que VF = volume do frasco (cm³); VI = volume injetado (cm³); e TI = tempo de incubação (h).

$$K = \frac{11,16 \text{ mol de C}_2\text{H}_4 \text{ em } 0,5 \text{ cm}^3 \text{ do padrão (CNTP)}}{H \times A \times R}$$

em que H = altura do pico do padrão; A = atenuação da leitura; R = range; e K' = altura do pico da amostra (mm) x atenuação x range.

Os resultados foram apresentados em μmol/planta/h de C₂H₄ ou nmol/planta/h de C₂H₄, a partir dos valores obtidos pela altura do pico em relação ao padrão de 500 mg kg⁻¹ de etileno.

- b) Quantidade de N total acumulada (QNT, mg/planta)

$$QNT = \frac{RMS \times N}{1000} \quad (2)$$

em que RMS = rendimento de matéria seca (mg/planta); e N = teor de N na planta (g kg⁻¹)

- c) Percentagem de N na planta proveniente do fertilizante (NPPF, %)

$$NPPF = \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso na planta}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso no fertilizante}} \times 100 \quad (3)$$

- d) Percentagem de N na planta proveniente da fixação simbiótica no feijão-caupi e no feijão-comum, usando como controle arroz e soja não nodulante (NPPfix, %)

$$NPP_{fix} = \left(1 - \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso no feijão ou caupi}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso na planta-controle}}\right) \times 100 \quad (4)$$

- e) Quantidade de N na planta proveniente da fixação simbiótica (QNPPfix, mg/planta)

$$QNPP_{fix} = \frac{NPP_{fix}}{100} \times QNT \quad (5)$$

- f) Quantidade de N proveniente do solo (QNPPS, mg/planta)

$$QNPPS = QNT - QNPPF - QNPP_{fix} \quad (6)$$

- g) O aproveitamento do N (AP, %) refere-se à eficiência de utilização do N aplicado como fertilizante, em função da quantidade aplicada (QNA, mg/planta)

$$AP = \frac{QNPPF}{QNA} \times 100 \quad (7)$$

- h) Percentagem de N na planta proveniente da fixação (N_{fix}, %) determinada pelo método da diferença

$$N_{fix} = \frac{N \text{ total}_{fix} - N \text{ total}_c}{N \text{ total}_{fix}} \quad (8)$$

em que fix = planta fixadora (feijão e caupi) de N_2 ; e C = planta não fixadora de N_2 ou controle (arroz e soja não nodulante).

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando detectado efeito significativo pelo teste F a 5 %, foram ajustadas equações de regressão. Testou-se a significância das equações linear e quadrática, para as variáveis relacionadas ao N na planta proveniente do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica, e cúbica, para produção de massa de matéria seca e quantidade de N acumulado, tendo sido escolhida a equação significativa de maior grau. As médias de percentagem de N proveniente da fixação simbiótica, determinadas pelo método da diferença e pelo método isotópico, para cada intervalo de coleta, foram também comparadas pelo teste de Tukey a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na colheita, aos 78 dias após a semeadura (DAS), o feijão-comum e o caupi apresentavam-se em final de ciclo, o arroz, em fase de enchimento de panículas, e a soja não nodulante, em estágio de formação de vagens com grãos chochos, devido à insuficiente produção de fotossintatos pela não fixação de N_2 . Isso porque a dose de N aplicada em todos os tratamentos (10 mg kg^{-1} de solo), além de ser baixa, serviu apenas para marcar o solo com ^{15}N e fornecer o nutriente numa quantidade adequada que estimulasse a nodulação do feijão-comum e do caupi. Franco & Döbereiner (1968) verificaram que, em feijoeiro inoculado, a mesma dose de N utilizada no presente estudo influenciou positivamente a nodulação.

A análise de variância mostrou efeito significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos sobre todas as avaliações do presente estudo, tanto para culturas quanto para intervalos de coletas, assim como para a interação entre esses fatores, o que foi também confirmado pela análise de regressão e pelo teste de comparação de médias para a percentagem de N proveniente da fixação simbiótica.

De modo geral, o crescimento vegetativo das culturas, representado pela produção de massa de matéria seca (MMS) da parte aérea, apresentou padrão sigmoide (Magalhães, 1979), melhor representado pelo modelo polinomial do terceiro grau, ao longo do ciclo tanto do feijão-comum como do caupi (Figura 1a). Particularmente, o caupi apresentou os maiores incrementos de MMS em função das seis últimas épocas de coleta, a partir dos 31 DAS, com acentuado incremento após a floração (47 DAS), atingindo um máximo no estágio final de maturação das vagens (78 DAS), correspondendo, no período reprodutivo, a 2,6 vezes mais (19,78 g/planta) que no período vegetativo. Isso ocorreu porque, normalmente, as plantas acumulam biomassa até a fase de reprodução e, a partir dessa fase, inicia-se a senescência vegetal, com consequente diminuição gradativa da biomassa

(Epstein & Bloom, 2006). Também, Awonaike et al. (1991) e Xavier et al. (2007) constataram que mais da metade da MMS acumulada pelo caupi ocorreu na fase entre o enchimento médio das vagens e a maturidade fisiológica.

O feijão-comum apresentou duas fases importantes de acúmulo de MMS (Figura 1a): uma de incremento rápido a partir da floração (38 DAS) até atingir um máximo, no início da maturação das vagens (68 DAS), e uma de pequeno declínio na etapa final de maturação (78 DAS). Acúmulo similar de MMS para o feijão-comum foi também descrito em outros estudos (Hungria et al., 1991). Fayad et al. (2002), no tomateiro, e Nóbrega et al. (2001), na cultura do feijão, também obtiveram curvas de crescimento do tipo sigmoide.

A curva sigmoide retrata melhor o crescimento das plantas em geral, pois evidencia um lento acúmulo inicial de MMS até a prefloração, com taxas de absorção de água e nutrientes muito pequenas para ativar os processos fisiológicos de crescimento, que exigem atividades metabólicas aceleradas. Na fase seguinte, a de floração, o acúmulo da MMS é mais rápido, pois estão sendo formados o caule principal, os ramos e as folhas trifoliadas, bem como as tríades de gemas na axila da folha. Na terceira fase ocorrem dois períodos distintos: um em que o crescimento se torna mais intenso, e outro em que a planta inicia o processo de senescência, que se reflete, inicialmente, na paralisação da produção de matéria orgânica, prevalecendo a translocação (Nóbrega et al., 2001).

A quantidade de N-total acumulado (QNT) pelas culturas de caupi e feijão-comum (Figura 1b) tendeu a acompanhar a produção de MMS, também com ajuste ao modelo cúbico. Esses resultados concordam com os relatados por Eaglesham et al. (1983) para caupi cultivado em casa de vegetação e para feijão (Pereira et al., 1989) e caupi em condições de campo (Awonaike et al., 1991). Para o caupi, comparando as épocas de coleta 38 e 78 DAS, verifica-se que houve ganho líquido de aproximadamente 2,5 vezes na QNT em favor da época 78 DAS, alcançando valor máximo nesta época. Esse aumento provavelmente se deveu à maior atividade simbiótica no final do ciclo da cultura, a exemplo do verificado em outros estudos (Franco et al., 2002; Martins et al., 2003). Os coeficientes de variação para MMS e QNT foram, respectivamente, de 9,9 e 16 %.

Houve acentuado aumento na QNT na parte aérea de ambas as culturas, principalmente após os 38 DAS; considerando o modelo de regressão, o máximo acúmulo de N ocorreu no intervalo entre 58 e 68 DAS. Isso sugere que essas leguminosas, possuidoras de uma fonte externa de N, mostraram efeito sinérgico entre o N fixado, N do solo e N do fertilizante. Essas observações são concordantes com aquelas encontradas para soja por Ruschel et al. (1979) e para caupi e soja por Eaglesham et al. (1983). Estudos com ^{15}N têm demonstrado que a deficiência de N em muitas espécies, como feijão, soja e caupi, é devido ao fato de

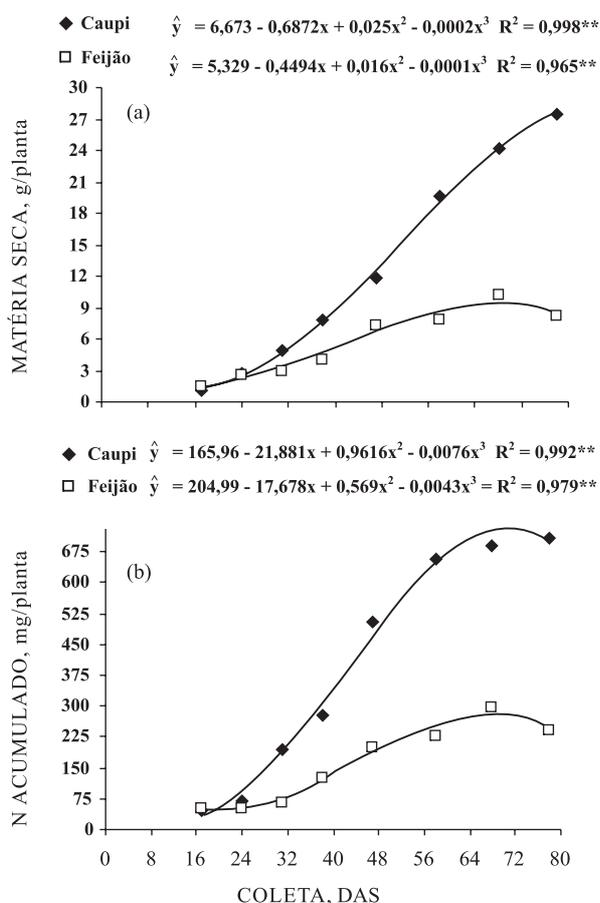


Figura 1. Produção de massa de matéria seca da parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) (a) e quantidade de N acumulado (b) em feijão-comum e feijão-caupi, em função de diferentes épocas de coleta. **: significativo a 1 %.

o N fixado inicialmente ser drenado preferencialmente para o desenvolvimento dos nódulos e ao maior comprometimento proporcional das reservas de N da semente para as primeiras folhas (Atkins et al., 1989). Esse fato indica que provavelmente foi importante a aplicação de uma baixa dose inicial de N (10 mg kg^{-1}) às plantas de caupi e feijão, de modo que estimulasse a nodulação e não alterasse a fixação simbiótica, a exemplo do observado em outros estudos (Franco & Döbereiner, 1968; Tsai et al., 1993).

O potencial da atividade da fixação medido pela atividade da enzima nitrogenase ($\mu\text{mol/planta/h}$ de C_2H_4) ao longo do ciclo variou para ambas as culturas (Figura 2), embora os dados não tenham se ajustado a nenhum modelo testado. O feijão alcançou o seu pico próximo à floração (38 DAS) e, logo após, decaiu drasticamente, o que permite estimar que ocorreu pequena FBN a partir da décima semana após a semeadura. Já o caupi apresentou um pico aos 38 DAS, indicando que o potencial de atividade máxima da enzima nitrogenase ocorreu dias antes da floração (47 DAS) e, em seguida, começou a cair

bruscamente, principalmente depois dos 58 DAS. Contudo, aos 78 DAS, a atividade da nitrogenase no caupi ainda era 3,2 % do pico atingido aos 38 DAS – valor relativamente alto.

O caupi apresentou taxas de redução do acetileno (C_2H_2) mais elevadas do que as do feijão-comum em todo o período analisado (Figura 2), caracterizando diferenças acentuadas em relação à fixação entre essas duas culturas, sobretudo no intervalo entre os 31 e 38 DAS. Esses resultados assemelham-se aos obtidos por Neves et al. (1982), que caracterizaram a maior parte da atividade da nitrogenase concentrada na fase de crescimento reprodutivo das plantas. Pesquisas demonstram que a FBN em feijão-comum normalmente é muito menor do que em caupi (Franco et al., 2002; Oliveira et al., 2003), que, quando bem nodulado, pode dispensar outras fontes de N e atingir alta produtividade (Alfaia, 1997; Martins et al., 2003; Rumjanek et al., 2005), equivalendo à aplicação de 50 kg ha^{-1} de N mineral (Martins et al., 2003).

As culturas fixadoras (feijão e caupi) apresentaram menores valores de % de átomos de ^{15}N do que as plantas-controle, demonstrando, assim, diluição do N absorvido do solo (N-nativo do solo + ^{15}N -fertilizante) pelo N proveniente da fixação simbiótica, o que caracteriza a base do método da diluição isotópica para a quantificação do N_2 proveniente da atmosfera (Hardarson et al., 1988; Alves et al., 2005).

A percentagem de N nas plantas de feijão e caupi proveniente do fertilizante (NPPF) decresceu ao longo do ciclo das culturas (Figura 3a), o que ocorreu graças à diluição do ^{15}N proveniente dessa fonte pelo influxo de ^{14}N , proveniente do N absorvido do solo e da fixação simbiótica, que apresentam relação $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ próxima à natural, respectivamente, de 99,634 e 0,366 % de átomos (IAEA, 2001).

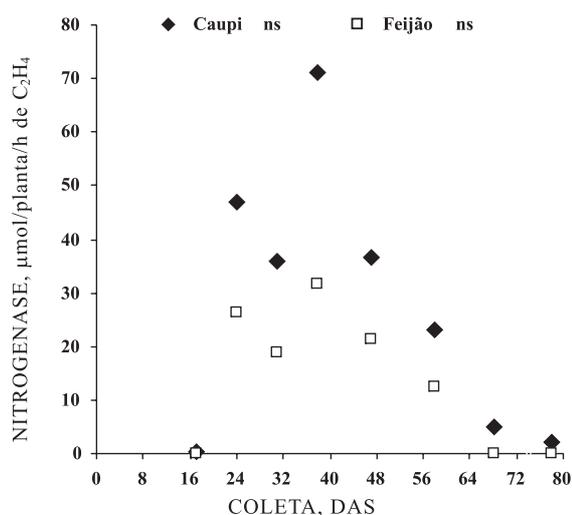


Figura 2. Atividade da enzima nitrogenase (redução do C_2H_2) em feijão-comum e feijão-caupi em função de diferentes épocas de coleta. ns: não significativo.

A percentagem de N nas plantas de feijão e caupi proveniente do solo (NPPS) decresceu de forma quadrática no decorrer do ciclo da cultura (Figura 3b). Observa-se que a maior contribuição relativa dessa fonte para o caupi e para o feijão ocorreu na fase inicial (17 e 24 DAS) e com decréscimo acentuado já a partir dos 31 DAS, o que seguramente se deveu ao acentuado aumento na FBN, para atender à fase reprodutiva, visto que aos 38 DAS a planta já se encontrava na fase de preflorescimento. Resultados semelhantes aos do presente estudo foram observados por Awonaike et al. (1991) para o caupi e por Rennie & Kemp (1984) para o feijão-comum. Normalmente, a demanda de N para o desenvolvimento de vagens de leguminosa é alta (Hungria et al., 1991; Oliveira et al., 2003; Martins et al., 2003).

Ao contrário do ocorrido para a NPPF e NPPS a percentagem de N nas plantas de feijão e caupi proveniente da fixação simbiótica (NPPfix) (Figura 3c) aumentou de forma quadrática ao longo do ciclo das culturas. Considerando-se o ajuste da regressão, o ponto de máxima NPPfix (96 %) para o caupi ocorreu por volta dos 62 DAS e, para o feijão (83 %), por volta dos 74 DAS.

De modo geral, o período de mais alta fixação simbiótica de N coincidiu com o de maior crescimento da planta, que por sua vez é o de maior demanda do nutriente para atender à produção de vagens, em virtude de estas serem os drenos preferenciais após o seu aparecimento. Na maturação fisiológica (78 DAS), o caupi acumulou 706 mg/planta de N (Figura 1b), sendo 93 % destes provenientes da fixação simbiótica (Figura 3c); 5,8 %, do N do solo (Figura 3b); e 1,2 %, do fertilizante (Figura 3a). Semelhantemente, Alfaia (1997) constatou que o caupi absorveu mais N do solo e da fixação simbiótica do que dos fertilizantes ureia e sulfato de amônio. Para o feijão-comum, considerando o máximo acúmulo de N, 298 mg/planta, que ocorreu aos 68 DAS (Figura 1b), os valores foram de 83, 13,6 e 3 %, respectivamente, provenientes da fixação simbiótica (Figura 3c), do solo (Figura 3b) e de fertilizante (Figura 3a). Os valores de NPPfix para o caupi são próximos aos encontrados em outros estudos (Eaglesham et al., 1983; Awonaike et al., 1991). Os coeficientes de variação para NPPF, NPPS e NPPfix foram, respectivamente, de 14,6, 16,7 e 7,2 %.

A quantidade de N na planta de feijão proveniente do fertilizante (QNPPF) (Figura 4a) decresceu de forma quadrática ao longo do ciclo. Para o caupi, não houve ajuste de regressão aos resultados obtidos. Comportamento similar ao da QNPPF foi observado também para o aproveitamento do N do fertilizante (Figura 4b). O decréscimo no aproveitamento do N do fertilizante após o período de crescimento vegetativo, seguramente, deu-se em virtude da diminuição do teor de N contido no volume de solo do vaso e, também, do aumento da absorção de N proveniente do solo e da fixação simbiótica. Considerando-se a planta inteira, o aproveitamento do N do fertilizante, que representa

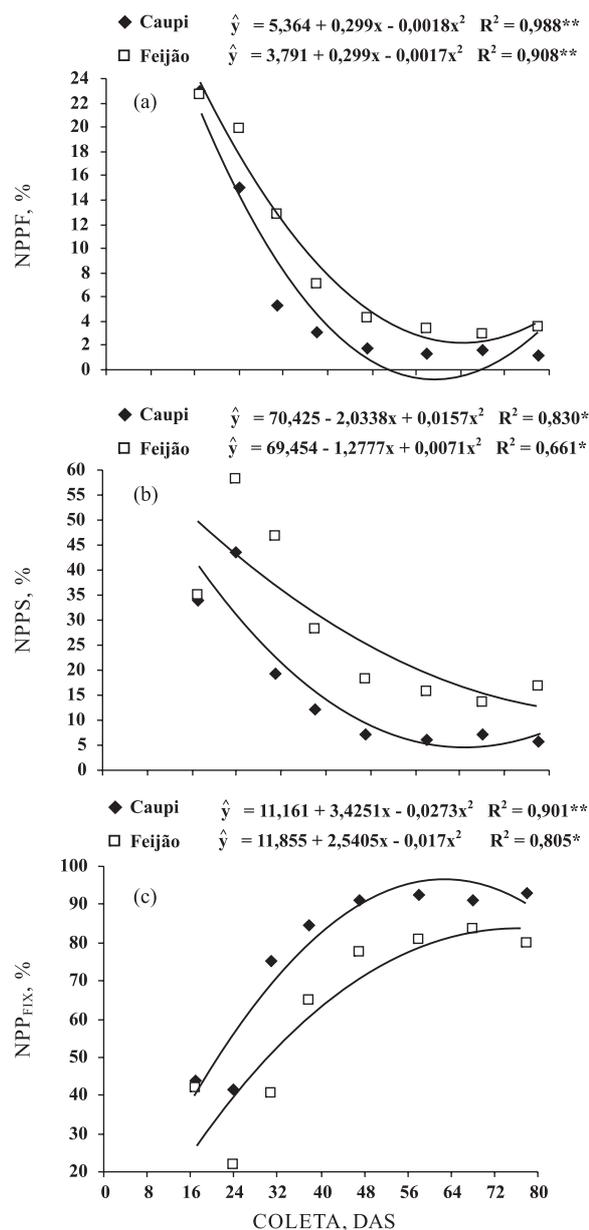


Figura 3. Percentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante (NPPF) (a), do solo (NPPS) (b) e da fixação simbiótica (NPPfix) (c) na parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) do feijão-comum e feijão-caupi, em função de diferentes épocas de coleta. ** e *: significativo a 1 e 5 %, respectivamente.

a percentagem de N recuperada em relação à dose aplicada, foi maior pelo caupi, alcançando o valor médio de 56,98 %; já para o feijoeiro a recuperação foi de 52,89 %. O coeficiente de variação para o aproveitamento do N do fertilizante foi de 8,8 %.

A quantidade de N na planta de feijão proveniente do solo (QNPPS) (Figura 4c) aumentou ao longo do ciclo, tanto no caupi como no feijão, tendo os dados

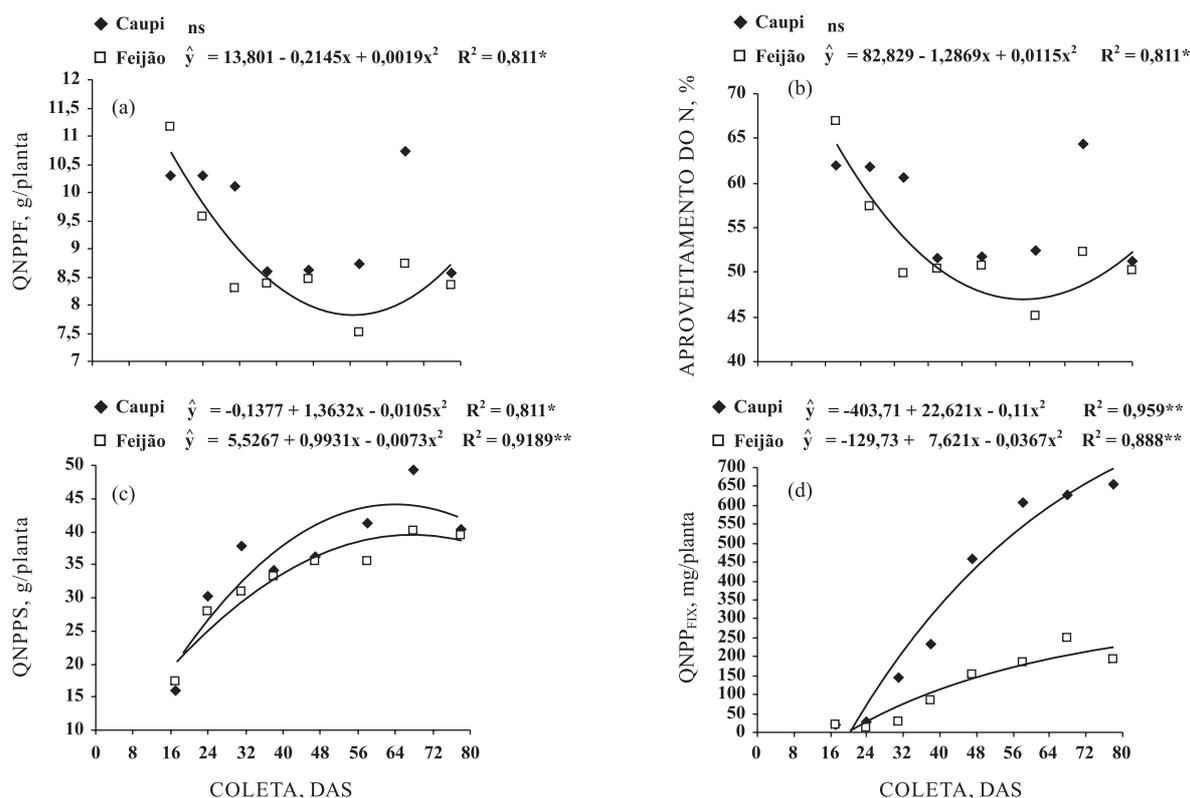


Figura 4. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (a) e aproveitamento do N do fertilizante (b), quantidade de nitrogênio proveniente do solo (QNPPS) (c) e da fixação simbiótica (QNPPFIX) (d) na parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) do feijão-comum e caupi. **, * e ns: significativo a 1 e 5 % e não significativo, respectivamente.

ajustados ao modelo quadrático. Esses valores, associados aos resultados de QNT (Figura 1b), indicam que o caupi obteve, além do N-fertilizante, mais N de outras fontes como N-fixação simbiótica, exceto durante o crescimento vegetativo inicial de ambas as leguminosas, quando o N proveniente do solo foi a fonte mais importante. O decréscimo no N do solo e o aumento da FBN na fase reprodutiva explicam a baixa contribuição relativa do N do solo para a QNT acumulada pelo caupi e pelo feijão. Nesse sentido, Mendes et al. (2008) afirmaram que, sempre que a disponibilidade de N no solo é abundante, este é absorvido em detrimento do N da fixação, enquanto o N-fixado é a maior fonte do nutriente quando o N do solo torna-se limitante.

Verifica-se, na figura 4d, que a quantidade de N proveniente da fixação simbiótica (QNPPfix) na planta de feijão e caupi aumentou de forma quadrática ao longo do ciclo e foi muito maior do que a QNPPS (Figura 4c) e, sobretudo, que a QNPPF (Figura 4a). O maior acúmulo de N por dia, obtido pela diferença de quantidade de N fixado pelos respectivos números de dias do intervalo de coletas, no caupi (25,04 mg/planta) e no feijão (7,9 mg/planta), ocorreu, respectivamente, durante o intervalo de 38 a 47 DAS e 31 a 38 DAS, períodos estes correspondentes à

prefloração de ambas as culturas. Os coeficientes de variação para as QNPPF, QNPPS e QNPPfix foram, respectivamente, de 8,8, 8,6 e 16,7 %.

Método isotópico vs método da diferença

A porcentagem de N fixado pelo feijão e caupi (NPPfix) variou significativamente aos 17, 24 e 31 DAS, quando a cultura de referência foi o arroz (Quadro 1). Para ambas as culturas, os valores de NPPfix, aos 17, 24 e 31 DAS, obtidos pelo método da diferença (MD) foram maiores do que aqueles pelo método da diluição isotópica (MI). Pode-se afirmar que os valores obtidos aos 17 DAS (94,06 %) e 24 DAS (84,62 %) pelo MD estão superestimados, pois nos estádios iniciais de crescimento os sistemas fixadores de ambas as leguminosas possuem baixa atividade. Assim, quanto maior a QNT absorvida pela planta fixadora em relação à planta-controle, maior será a quantidade de N-fixado, superestimando assim os valores de NPPfix pelo MD. Por exemplo: aos 17 DAS, a QNT no caupi e feijão (Figura 1b) foi cerca de 17 vezes maior do que no arroz, pelo fato de o N proveniente da semente ser maior em leguminosas do que em gramíneas.

Os valores de NPPfix pelo caupi e feijão, quando se usou soja não nodulante como planta-controle,

foram reduzidos consideravelmente aos 17 DAS, culminando em valores negativos de fixação. Um fato importante, e que certamente deve ter contribuído para isso, foi o N contido nessas sementes: 49 g kg⁻¹ na semente de soja contra 11 g kg⁻¹ na semente de arroz. Assim, o N da semente, que é indistinguível do N₂ fixado nas plantas e do N nativo do solo, constituiu uma proporção muito mais significativa de N total das plantas nos estádios iniciais de crescimento, causando, portanto, maiores erros do que nos estádios finais de crescimento, quando o N da semente torna-se insignificante (efeito diluição). Em adição, erros atribuíveis às culturas de referência têm maior efeito em taxas menores do que em taxas maiores de fixação de N₂ (Hardarson et al., 1988).

Verifica-se que o arroz, nos estádios iniciais, não constitui um bom controle para estudos, quando do uso do MD, pelo fato de os resultados serem altamente dependentes da produção das culturas fixadoras e não fixadoras, no respectivo estádio. Também, de modo geral, a absorção de N proveniente do fertilizante pelas plantas fixadoras foi maior do que a absorção pelas plantas não fixadoras. Assumindo-se que isso foi também constatado para a QNPPS, explica-se por que as estimativas da NPPfix foram superiores pelo MD em relação ao MI, em virtude de esta fração de N ser erroneamente incluída como ganho proveniente da fixação nesta fase e, portanto, superestimando os valores obtidos pelo MD. Constatações semelhantes foram feitas por Ruschel et al. (1979), em experimento em vasos, e por Wagner & Zapata (1982), em condições de campo, corroborando assim a afirmação de Vose & Victória (1986), de que, se a absorção de N do solo pelas plantas noduladas for maior, a fixação de N₂ será superestimada pelo MD.

A NPPfix pelo caupi e feijão a partir dos 38 DAS, quando a planta-controle foi o arroz, e aos 31, 58 e 78 DAS, quando foi a soja não nodulante, não foi influenciada pelos dois métodos estudados (Quadro 1). Esse fato indica que em condições experimentais de

vasos, para determinação da percentagem de N-fixado das culturas fixadoras no período de 31 a 78 DAS, as plantas-controle não influenciaram os resultados – ambas comportaram-se como bons controles, independentemente de se apresentarem em estádios fisiológicos distintos. Isso significa que, em termos de aproveitamento, as duas culturas-controle absorveram N do solo: N-fertilizante + N-nativo do solo em mesma proporção das culturas fixadoras, durante esse período (Rennie & Kemp, 1984; Hardarson et al., 1988). Resultados parecidos foram verificados também por Ruschel et al. (1979), utilizando duas isolinhas de soja, nodulante e não nodulante, com três doses de N, em que os dois métodos, MD e MI, foram similares aos 75 DAS; no entanto, o MD foi inadequado nos estádios iniciais (até 35 DAS) e o MI mostrou maior sensibilidade. Nesse sentido, Urquiaga & Boddey (1987) verificaram que os dois métodos produzirão idênticas estimativas de fixação quando as culturas fixadoras e não fixadoras recuperarem idênticas quantidades de N-fertilizante.

De modo geral, no presente estudo houve boa concordância entre os dois métodos, indicando que a soja não nodulante e o arroz foram controles válidos para caupi e feijão, embora para o arroz, quando do uso do MD, a avaliação não seja realizada na fase inicial de desenvolvimento da cultura. Os resultados deste estudo reforçam as afirmações feitas por Vose & Victória (1986), de que em experimentos em que plantas fixadoras e não fixadoras são cultivadas em vasos pode haver boas estimativas da fixação de N₂ pelo método da diluição isotópica.

CONCLUSÕES

1. A fixação simbiótica forneceu a maior parte do N acumulado nas plantas de feijão e caupi, seguida, em ordem decrescente, pelo solo e fertilizante.

Quadro 1. Percentagem de nitrogênio proveniente da fixação simbiótica de N₂ (NPPfix, %) na parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) do feijão-comum e feijão-caupi, determinada pelo método da diferença (MD) e pelo método isotópico (MI), utilizando como plantas-controle arroz ou soja não nodulante, em função de diferentes épocas de coleta

Cultura	NPPfix, % (dias após a semeadura)															
	17		24		31		38		47		58		68		78	
	MI	MD	MI	MD	MI	MD	MI	MD	MI	MD	MI	MD	MI	MD	MI	MD
Planta-controle arroz																
Caupi	44,5 b ⁽¹⁾	94,1a	41,4b	84,6a	76,1b	89,0a	84,6a	85,3a	91,0a	91,3a	92,6a	93,0a	91,1a	92,5a	93,0a	92,6a
Feijão	42,0 b	94,3a	21,8b	77,9a	42,2b	67,9a	64,9a	64,0a	77,5a	77,9a	81,2a	79,1a	83,4a	82,6a	79,6a	78,1a
Planta-controle soja não nodulante																
Caupi	- ⁽²⁾	44,76 a			74,6a	72,6a					92,2a	92,3a			93,1a	93,3a
Feijão	-	47,21 a			38,5a	20,0b					80,3	77,8a			79,8a	76,8a

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si a 5 % pelo teste de Tukey. ⁽²⁾ Valores negativos.

2. A maior taxa de fixação simbiótica de N ocorreu a partir da fase de preflorescência do feijão e do caupi.

3. Houve boa concordância na determinação da fixação simbiótica de N entre os métodos da diferença e isotópico, à exceção da fase inicial do feijão-comum e do caupi; o arroz e a soja não nodulante, exceto até 24 DAS, foram considerados plantas-controle adequadas para avaliar a fixação simbiótica de N.

AGRADECIMENTOS

À International Atomic Energy Agency (IAEA), pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

LITERATURA CITADA

- ALFAIA, S.S. Destino de fertilizantes nitrogenados (^{15}N) em um Latossolo Amarelo cultivado com feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.). Acta Amaz., 27:65-72, 1997.
- ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C.P.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e nitrogênio no sistema solo-planta. In: AQUINO, A.M. & ASSIS, R.L., orgs. Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília, Embrapa/Informação Tecnológica, 2005. v.1. p.343-368.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; SANFORD, P.J.; DAKORA, F.D. & MATTHEWS, I. Nitrogen nutrition of nodules in relation to "N-hunger" in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiol., 90:1644-1649, 1989.
- AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGHE, K.S. & DANSO, S.K.A. Nitrogen assimilation and distribution in field-grown cowpea at various growth stages. Soil Sci. Soc. Am. J., 55:81-85, 1991.
- BREMNER, J.M. & MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. & KENEY, D.R., eds. Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties. 2.ed. Madison, America Society of Agronomy, 1982. v.2. p.595-624. (Agronomy, 9)
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT. Research constraints provisionally by CIAT. In: WOKSHOP ON ADVANCED PHASEOLUS BEANS RESEARCH NETWORK, 1990, Cali. Workshop... Cali, CIAT, 1990. 30p.
- EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S. & SEEGER, R. Fertilizer-N effects on N_2 fixation by cowpea and soybean. Agron. J., 75:61-66, 1983.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/setembro/4a-semana/brs-xiquexique-primeira-cultivar-de-feijao-caupi-biofortificada>. Acesso em: 30 de set. de 2008.
- EPSTEIN, E. & BLOOM, A.J. Nutrição e crescimento. In: EPSTEIN, E. & BLOOM, A.J., eds. Nutrição mineral de plantas. Londrina, Planta, 2006. p.251-286.
- FAYAD, J.A.; FONTES, P.C.R.; CARDOSO, A.A.; FINGER, F. & FERREIRA, F.A. Absorção de nutrientes pelo tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. Hort. Bras., 20:90-94, 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. <<http://faostat.fao.org/faostat/>>. Dados de produção agrícola mundial. Última atualização em 2004. Acesso em: 20 de jan. de 2007.
- FRANCO, A.A. & DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do N por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Pesq. Agropec. Bras., 3:223-227, 1968.
- FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C. & TSAI, S.M. Nodulação em feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. Pesq. Agropec. Bras., 37:1145-1150, 2002.
- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A. & ZAPATA, F. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. Crop Sci., 28:101-105, 1988.
- HARDY, R.W.F.; HOSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluations. Plant Physiol., 43:1185-1207, 1968.
- HENSON, R.A. Measurements of N_2 fixation by common bean in Central Brazil as affected by different crops. Plant Soil, 152:53-58, 1993.
- HUNGRIA, M. & VARGAS, M.A.T. Fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. In: HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & ARAÚJO, R.S. Biologia dos solos dos cerrados. Planaltina, Embrapa-CPAC, 1997. 524p.
- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A. & VALLSGROVE, R.M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. J. Exper. Bot., 42:839-844, 1991.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY - IAEA. Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition. Vienna, 2001. 247p. (Training Course Series, 14)
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Dados conjunturais do feijão (área, produção e rendimento) Brasil – 1986 a 2003. <<http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/>>. Acesso em: 25 jan. de 2005.
- MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G., coord. Fisiologia vegetal. São Paulo, EPU/USP, 1979. v.1. p.331-350.
- MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B. & RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: A strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. Biol. Fert. Soils, 38:333-339, 2003.
- MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D.M.G. & CAMPO, R.J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em Latossolos do Cerrado. Pesq. Agropec. Bras., 43, 1053-1060, 2008.

- NEVES, M.C.P.; FERNANDES, M.S. & SÁ, M.F.M. Assimilação de nitrogênio em plantas noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Pesq. Agropec. Bras., 17:689-695, 1982.
- NÓBREGA, J.Q.; RAO, T.V.R.; BELTRÃO, N.E.M. & FIDELES FILHO, J. Análise de crescimento do feijoeiro submetido a quatro níveis de umidade do solo. R. Bras. Eng. Agríc. Amb., 5:437-443, 2001.
- OLIVEIRA, A.P.; SILVA, V.R.F.; ARRUDA, F.P.; NASCIMENTO, I.S. & ALVES, A.U. Rendimentos de feijão caupi em função de doses e formas de aplicação de nitrogênio. Hortic. Bras., 21:77-80, 2003.
- PEREIRA, P.A.A.; BURRIS, R.H. & BLISS, F.A. ¹⁵N-determined dinitrogen fixation potential of generically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil, 120:171-179, 1989.
- PORTER, L.K. & O'DEEN, W.A. Apparatus for preparing nitrogen from ammonium chloride for nitrogen-15 determinations. Anal. Chem., 49:514-516, 1977.
- RAIJ, B.van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. & FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2.ed. Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas, 1996. 285p. (Boletim Técnico, 100)
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. ¹⁵N-determined time course for N₂ fixation in two cultivars of field bean. Agron. J., 76:146-154, 1984.
- RITTENBERG, D. The preparation of gas sample for mass-spectrometric analysis. In: WILSON, D.W., ed. Preparation and measure of isotopic traces. Ann Arbor, 1946. p.31.
- RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R. & NEVES, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A. & RIBEIRO, V.Q., eds. Feijão-caupi; avanços tecnológicos. Brasília, Embrapa/ Informação Tecnológica, 2005. p.281-335.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; VICTORIA, R.L. & SALATI, E. Comparison of isotope techniques and non-modulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean, *Glycine max*. Plant Soil, 53:513-525, 1979.
- SAITO, S.M.T.; MATSUI, E. & SALATI, E. ¹⁵N₂ fixation, H₂ evolution and C₂H₂ reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant., 49:37-42, 1980.
- SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F. & FIGUEIREDO, M.V.B. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pelas plantas. Pesq. Agropec. Tropical, 36:95-99, 2006.
- SILVEIRA, P.M.; SILVA, O.F.; STONE, L.F. & SILVA, J.G. Efeito do preparo do solo, plantio direto e rotação de culturas sobre o rendimento e economicidade do feijoeiro irrigado. Pesq. Agropec. Bras., 36:257-263, 2001.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M. & ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. Plant Soil, 152:131-138, 1993.
- URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. Theoretical considerations in the comparison of total nitrogen difference and ¹⁵N isotope dilution estimates of the contribution of nitrogen fixation to plant nutrition. Plant Soil, 102:291-294, 1987.
- VOSE, P.B. & VICTÓRIA, R.L. Re-examination of the limitation of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. In: HAUCK, R.D. & WEAVER, R.W., eds. Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification. Madison, Soil Science Society of America, 1986. p.23-41. (SSSA Special Publications, 18)
- WAGNER, G.H. & ZAPATA, F. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. Agron. J., 74:607-612, 1982.
- XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B. & CAMPOS, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. Ci. Rural, 37:56-564, 2007.

