

Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi

Marciano de Medeiros Pereira Brito ⁽¹⁾; Takashi Muraoka ⁽²⁾; Edson Cabral da Silva ^(2*)

⁽¹⁾ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (CENA/USP), Divisão de Produtividade Agroindustrial e Alimentos, Caixa Postal 96, 13416-000 Piracicaba (SP). E-mail: marcianobrito@hotmail.com; muraoka@cena.usp.br; ecsilva@cena.usp.br ^(*) Autor correspondente.

Recebido: 23/out./2009; Aceito: 2/ago./2010

Resumo

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) constitui-se em uma valiosa fonte deste nutriente para o feijão comum e, sobretudo, para o feijão-caupi, tendo sua magnitude influenciada pela disponibilidade de N mineral na solução do solo. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos de doses de nitrogênio, na forma de uréia, sobre a fixação simbiótica de N₂ em feijão comum e caupi, pela técnica isotópica, e quantificar as contribuições relativas das fontes N₂-fixação simbiótica, N-solo e N-uréia no desenvolvimento do feijão comum e caupi, usando como controle a soja não nodulante. O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação, utilizando-se vasos com 5 kg de terra, coletada de Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 5x3x2 e três repetições. Os tratamentos compreenderam cinco doses de N, na forma de uréia: 2, 15, 30, 45 e 60 mg kg⁻¹ de N; três épocas de amostragens de plantas: 23, 40 e 76 dias após a semeadura (DAS) e duas culturas: feijão comum e feijão caupi. A FBN decresceu com o incremento da dose de N, variando de 81,5% a 55,6% para o caupi e de 71,9% a 55,1% para o feijão comum. A FBN em caupi submetido à inoculação pode substituir totalmente a adubação nitrogenada, inclusive a dose de arranque. A absorção do N do solo não é influenciada pela dose de fertilizante nitrogenado. O aproveitamento do N do fertilizante, aos 76 DAS, foi, em média, de 60,7% pelo feijão comum e 57,1% pelo caupi. O feijão comum necessita de dose de arranque (40 kg ha⁻¹ de N) para a obtenção de produtividade economicamente aceitável.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, ¹⁵N, leguminosa, dose de nitrogênio.

Contribution of nitrogen from biological nitrogen fixation, nitrogen fertilizer and soil nitrogen on the growth of the common bean and cowpea

Abstract

Biological nitrogen fixation (BNF) constitutes a valuable source of this nutrient for the common bean *Phaseolus vulgaris* L. and cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp., being its availability affected by mineral N in the soil solution. The objectives of this work were to evaluate the effects of nitrogen rate, as urea, on symbiotic fixation of N₂ in common bean and cowpea plants, using the isotopic technique, and quantifying the relative contributions of N sources symbiotic N₂ fixation, soil native nitrogen and urea N on the growth of the common bean and cowpea. Non nodulating soybean plants were used as standard. The research was carried out in greenhouse, using pots with 5 kg of soil from a Typic Haplustox (Dystrophic Red Yellow Latosol). The experimental design was completely randomized blocks, with 30 treatments and three replications, arranged in 5x3x2 factorial outline. The treatments consisted of five N rates: 2, 15, 30, 45 and 60 mg N kg⁻¹ soil; three sampling times: 23, 40 and 76 days after sowing (DAS) and two crops: common bean and cowpea. The BNF decreased with increase N rates, varying from 81.5% to 55.6% for cowpea, and from 71.9% to 55.1% for common bean. The symbiotic N₂ fixation in cowpea can substitute totally the nitrogen fertilization. The nitrogen absorption from soil is not affected by nitrogen fertilizer rate. The N recovery from fertilizer at 76 DAS was of 60.7% by common bean, and 57.1% by cowpea. The symbiotic association in common bean needs the application of a starting dose (40 kg N ha⁻¹) for economically acceptable yields.

Key words: *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, nitrogen-15, legume, N rate.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi é uma espécie com ampla distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais, em virtude de terem condições edafoclimáticas semelhantes às do seu provável berço de origem, a África. Segundo a FAO (2004), estima-se que em 2003 foram cultivados no mundo cerca de 9,82 milhões de hectares de feijão-caupi. No Brasil, estima-se que é cultivado em torno de 1,5 milhão de hectares de feijão-caupi, com produtividade média de aproximadamente 300 kg ha⁻¹ (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2008). Dentre 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 nitrogênio (HUNGRIA et al., 1991; MARTINS et al., 2003). Estima-se que em 40% da área cultivada com feijoeiro na América Latina e em 60% das áreas na África e no Oriente Médio ocorram deficiência de N (CIAT, 1990).

O sucesso na formação de uma simbiose funcional é dependente de muitos fatores não sequenciais, tais como: físicos, ambientais, nutricionais e biológicos (HUNGRIA et al., 1991) e, também, de fatores relacionados à planta (cultivar) e à estirpe, bem como pela interação entre estes (HUNGRIA e VARGAS, 1997; SOARES et al., 2006a,b). A capacidade de FBN do feijoeiro parece não ser tão eficiente quanto à do caupi (MARTINS et al., 2003; XAVIER et al., 2007) e à da cultura da soja (HUNGRIA et al., 1991; MENDES et al., 2008). Para a obtenção de rendimentos econômicos, geralmente, é essencial a suplementação nitrogenada, principalmente até que a nodulação esteja plenamente estabelecida (OLIVEIRA et al., 2003). No entanto, é necessária uma dose de N que proporcione bom desenvolvimento da planta, mas que não venha prejudicar a FBN.

Segundo OLIVEIRA e THUNG (1988), embora seja necessário conhecer a cultivar, as condições de desenvolvimento da cultura do feijão comum, para a produção de 1500 kg ha⁻¹ de grãos, necessita-se aproximadamente de 46 kg de N. Os autores recomendam a aplicação de N na semeadura e em cobertura, na fase de 25 a 35 dias após a emergência (DAE). A espécie de rizóbio recomendada para produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro é *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), compreendendo as estirpes comerciais SEMIA 4077 (CIAT 899) e SEMIA 4080 (PRF 81). PELEGRIN et al. (2009) verificaram que a adubação com 20 kg ha⁻¹ de N, acrescida de inoculante com a estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899 possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura de feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg ha⁻¹ de N.

MARTINS et al. (2003) relataram que 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, SOARES et al. (2006a)

verificaram que a inoculação em campo, com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B, contribuiu para o aumento no rendimento de grãos, semelhantemente ao tratamento testemunha que recebeu 70 kg ha⁻¹ de N, e superior ao da estirpe BR 2001. Esta estirpe, embora não seja mais recomendada como inoculante, estabelece simbiose eficiente com o caupi (MARTINS et al. 2003; XAVIER et al., 2007).

Conforme OLIVEIRA e DANTAS (1988) o caupi depende do nitrogênio da semente e do N do solo até os 20 DAE e, havendo condições de solo e da planta para uma simbiose efetiva, é dispensada a adubação mineral nitrogenada. A partir dos 25 DAE, a necessidade da cultura em N é suprida pela FBN, estendendo-se até a floração, que normalmente ocorre entre 45 e 55 DAE, para cultivares de porte determinado, e entre 75 e 90 dias para os de porte indeterminado.

Segundo SPRENT e SPRENT (1990), é necessário que haja disponibilidade de N combinado para o crescimento do rizóbio até o início da fixação de N₂. Em estudos realizados por SUMMERFIELD et al. (1977) e HUXLEY (1980), constatou-se que baixas doses de N combinado beneficiam a nodulação, fixação e produção do caupi. Já ALFAIA (1997) não obteve resposta do caupi à aplicação de fertilizante nitrogenado, na forma de uréia ou sulfato de amônio, na dose de 30 kg ha⁻¹ de N. EAGLESHAM et al. (1983), em estudos utilizando ¹⁵N para avaliar o efeito de três formas de N combinado (KNO₃, NH₄NO₃ e uréia) em duas variedades de caupi e uma de soja, concluíram que a aplicação de N nas dose de 30 a 180 mg planta⁻¹ promoveu efeito sinérgico na fixação de N₂.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de doses de nitrogênio, na forma de uréia, sobre a fixação simbiótica de N₂ em feijão comum e caupi ao longo do ciclo, pela técnica isotópica, e quantificar as contribuições relativas das fontes N₂-fixação simbiótica, N-solo e N-uréia no desenvolvimento do feijão comum e caupi.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação, em Piracicaba (SP), utilizando-se Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, textura média, coletado na região. O solo foi coletado na camada de 0-20 cm de profundidade, seco ao ar, destorroado, homogenizado e passado em peneira de 4 mm de abertura, e em seguida, acondicionados 5 kg de solo por vaso. A análise química antes da implantação do experimento resultou nos seguintes valores: pH (CaCl₂) 5,2; M.O. 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; CTC 55,0 mmol_c dm⁻³ saturação por bases 22,1%; Zn (DTPA) 3,4 mg dm⁻³; Cu (DTPA) 0,6 mg dm⁻³; Mn (DTPA) 4,2 mg dm⁻³; Fe (DTPA) 58,0 mg dm⁻³. A análise granulométrica proporcionou os seguintes valores (g kg⁻¹): areia, 720; silte

60; e argila 220, determinadas pelo método da pipeta, conforme metodologia descrita em DAY (1965).

A correção do solo foi realizada um mês antes da semeadura, na dose de 2,04 Mg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT 100%), considerando-se os resultados da análise do solo e a recomendação da ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE CORRETIVOS AGRÍCOLAS (1986). O solo foi mantido umedecido a 60% da capacidade de campo, com a finalidade de mais prontamente elevar o pH. No décimo sexto dia após a correção do solo, foram aplicados 100 mg kg⁻¹ de P e 50 mg kg⁻¹ de K, na forma de superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente. Foram aplicados também micronutrientes, na forma de solução (MnCl₂ 1,81 g L⁻¹; Zn SO₄ 0,22 g L⁻¹; CuSO₄ 0,08 g L⁻¹; H₂MoO₄ 0,02 g L⁻¹ e H₃BO₃ 2,86 g L⁻¹). Para todas as soluções, usaram-se água destilada e sais p.a.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 5x3x2 e três repetições. Os tratamentos compreenderam cinco doses de N, na forma de uréia: 2, 15, 30, 45 e 60 mg kg⁻¹ de N; três épocas de amostragens de plantas: 23, 40 e 76 dias após a semeadura (DAS) e duas culturas: feijão comum e feijão caupi. Como planta controle da fixação biológica de N₂, foi utilizada a soja não nodulante. As doses de 2, 15, 30, 45 e 60 mg kg⁻¹ de N de solo equivaleram, respectivamente, à aplicação de 5,3; 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de N. O enriquecimento isotópico utilizado foi de 30% e 10% de átomos de ¹⁵N em excesso, respectivamente, para as doses de 2 e 15 mg kg⁻¹ de N. Para as demais doses de N, utilizou-se um enriquecimento de 4,991% de átomos de ¹⁵N em excesso. Para facilitar a aplicação uniforme, o fertilizante nitrogenado foi diluído em 50 ml de água destilada e aplicado com auxílio de uma pipeta.

Na semeadura do feijão comum (cultivar Carioca), do caupi (cultivar CNC x 284-4E) e da soja não nodulante (D-71-9331), utilizaram-se seis sementes por vaso, com posterior desbaste deixando-se três plantas. As regas foram realizadas diariamente com água destilada, procurando-se manter 80% da capacidade de campo. Para estimativa da reposição da água, determinou-se a curva característica do solo e realizaram-se pesagens para estimar a quantidade evapotranspirada. As sementes do feijão comum foram incubadas, antes da semeadura, com estirpes de *Rhizobium* CIAT 899. Para o caupi, utilizou-se a estirpe de *Bradyrhizobium* BR 2001. Detalhamentos sobre a origem (sistema de uso da terra, município, estado e país) e características culturais das estirpes de rizóbios usadas podem ser obtidos em SOARES et al. (2006a) para o caupi e SOARES et al. (2006b) para o feijoeiro.

A colheita das plantas foi realizada por amostragens ao longo do ciclo das culturas (23, 40 e 76 DAS). O material colhido de cada vaso (folhas + ramos + pecíolos + pedúnculos e vagens) foi seco em estufa de circulação de ar forçado a 65 °C até atingir massa constante, determinando-se a matéria seca por planta. Em seguida,

o material foi misturado, moído em moinho tipo Wiley com peneira de 40 mesh (0,42 mm), homogeneizado e deste retiradas amostras para análises de N total e concentração isotópica.

A atividade da enzima nitrogenase foi medida indiretamente pelo método da atividade de redução do acetileno (ARA) (HARDY et al., 1968). Após a coleta, as raízes foram colocadas em frascos de vidros de 1000 mL e, em seguida, fechadas hermeticamente. Retiraram-se previamente 10% da atmosfera do vidro sendo injetado 10% de C₂H₂. Após 30 minutos, 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 80 a 100 mesh a 50 °C, conforme metodologia descrita em SAITO (1980). Preparou-se padrão de 500 mg L⁻¹ de C₂H₂ para determinação do controle, vidros sem raízes e com injeção de C₂H₂.

O N total foi determinado pelo método de Kjeldahl descrito por BREMNER e MULVANEY (1982). Para as análises da composição isotópica de N, as amostras foram processadas de acordo com o método de RITTENBERG (1946); partindo do destilado final obtido na análise da porcentagem de N total (Kjeldahl) que foi novamente acidificado com H₂SO₄ 0,05 mol/L e concentrado por evaporação, o N-NH₄⁺ foi convertido a N₂ por oxidação com hipobrometo de lítio (LiOBr) (PORTER e O'DEEN, 1977). As análises da composição isotópica de nitrogênio nas amostras foram determinadas em espectrômetro de massa ATLAS VARIAN MAT modelo CH-4. As avaliações seguiram a seguinte sequência de cálculos:

a) Determinação da atividade da nitrogenase

$$C_2H_4 = (\text{nmol}\cdot\text{h} = kxk' \times (\text{volume do frasco}) \times \frac{1}{(\text{volume injetado (cm}^3)}) \times \frac{1}{(\text{tempo de incubação (h)})} \quad (1)$$

$$K = \frac{11,16 \text{ moles de } C_2H_4 \text{ em } 0,5\text{cm}^3 \text{ do padrão (C.N.T.P.)}}{H \times A \times R}$$

Sendo: H = altura do pico do padrão; A = atenuação da leitura; R = range; K' = altura do pico da amostra (mm) x atenuação x range

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

b) Quantidade de nitrogênio total acumulada (QNT, mg planta⁻¹)

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

Sendo: RMS = rendimento de matéria seca (g planta^{-1}); N = teor de nitrogênio na planta (g kg^{-1})

- c) Percentagem de nitrogênio na planta (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) 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) Porcentagem de nitrogênio na planta (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) proveniente da fixação biológica no feijão caupi e no feijão comum (NPPFB, %)

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

- e) Quantidade de nitrogênio proveniente da fixação biológica (QNPPFB, mg planta^{-1})

$$QNPPFBN = \frac{\%NPPFBN}{100} \times QNT \quad (5)$$

- f) Quantidade de nitrogênio proveniente do solo (QNPPS, mg planta^{-1})

$$QNPPS = QNT - QNPPF - QNPPFBN \quad (6)$$

- g) Aproveitamento do N do fertilizante (AP, %), em relação à quantidade de N aplicado como fertilizante (QNA)

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

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando detectados efeitos significativos pelo teste F, a 5% de probabilidade, foram ajustadas equações de regressão. Testou-se à significância dos modelos linear e quadrático, tendo sido escolhida a equação significativa com maior grau. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico SAS 8.02 (SAS Institute, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doses de nitrogênio influenciaram a produtividade de matéria seca de parte aérea (MSPA) do feijão comum e do caupi. No entanto, para ambas as espécies, ocorreu discreto aumento MSPA até 23 DAS, moderado até 40 DAS, e acentuado incremento na MSPA de 40 a 76 DAS, tendo alcançado o pico máximo nesta época (Figura 1a,b). O feijão iniciou a emissão de botões florais aos 40 DAS,

atingindo a plena floração aos 50 DAS e, aos 76 DAS, as vagens estavam bem formadas e a planta em estágio de fim de ciclo, o que forçou também a coleta das demais culturas (caupi e soja não nodulante), pois é exigência do método da diluição isotópica (BODDEY et al., 1983; HARDARSON e DANSO, 1990; ALVES et al., 2005). O caupi, aos 76 DAS, estava em fase de enchimento das vagens, com sementes mal formadas, portanto, para todas as espécies, foi quantificado e considerado o N da parte aérea inteira (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens).

Comparando-se, separadamente, cada espécie dentro de cada época, observa-se que as doses crescentes de N, aos 23 e 40 DAS (Figura 1a,b), proporcionaram produção de MSPA semelhantes.

Para o feijão comum, aos 76 DAS, também não houve diferença significativa entre os tratamentos a partir da dose de 15 mg kg^{-1} de N, indicando que nestes tratamentos somente a FBN supriu as exigências da planta. Para o caupi, aos 76 DAS, o efeito das doses de N foi menor que para o feijão comum, sem diferença significativa na produção de MSPA, inclusive entre os tratamentos nos quais não foi aplicado N e naqueles que receberam 60 mg kg^{-1} de N, sugerindo alta FBN por esta espécie.

Quanto à quantidade de nitrogênio total acumulada (QNT) pelo caupi e pelo feijão, aos 76 DAS, houve um ganho líquido de aproximadamente 3,5 vezes na QNT em relação à época anterior (40 DAS) (Figura 2a,b). Esse aumento, provavelmente, foi devido à maior atividade simbiótica no fim do ciclo da cultura, a exemplo do verificado em outros estudos (FRANCO et al., 2002; MARTINS et al., 2003). Para o feijão, aos 23 e aos 40 DAS, os dados ajustaram-se ao modelo linear e, para o caupi, aos 40 DAS, ao modelo quadrático. O incremento na dose de N não influenciou a QNT na parte aérea do caupi, aos 23 e 76 DAS.

Considerando-se as doses de N aplicadas, aos 76 DAS, tanto o caupi como o feijão acumularam maior quantidade de N do que a soja não nodulante. Tal fato, em parte, se deve a serem espécies distintas; porém, sugere-se que houve efeito sinérgico entre o N fixado, N nativo do solo e N do fertilizante. Para a soja não nodulante, aos 76 DAS, a QNT aumentou à medida que se aumentou a dose de N, obtendo-se a máxima acumulação com 60 mg kg^{-1} de N, indicando assim, que o N-fertilizante foi o principal responsável pelo acúmulo deste nutriente pela planta. Resultados semelhantes foram também verificados para caupi e soja por ENGLISHAM et al. (1983).

A porcentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (%NPPF), em ambas as espécies e nas três épocas avaliadas, na planta de feijão, aumentou com o incremento da dose de N (Figura 3a,b); no entanto, com maior intensidade nas menores doses de N. Já a quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (QNPPF) nas três épocas avaliadas, foi proporcional à dose de N aplicada (Figura 3c). Para o caupi, houve tendência

de decréscimo na QNPPF com o aumento da dose de N (Figura 3d), acima de 15 mg kg^{-1} de N, nas épocas 23 e 40 DAS, e acima de 30 mg kg^{-1} de N, aos 76 DAS.

A maior QNPPF foi obtida com a maior dose de N (60 mg kg^{-1}), cujos valores foram de $45,58 \text{ mg planta}^{-1}$ de N para o caupi e de $67,05 \text{ mg planta}^{-1}$ de N para o feijão comum, correspondendo, à participação da ordem, respectivamente, de 59,61% e 64,08% do N total. Resultados bem próximos aos do presente estudo foram verificados por RENNIE e KEMP (1984), quando a adição de 10 kg ha^{-1} de N contribuiu pouco para o N total na planta de feijão (cvs. Kentowood e Aurora), sendo a média de %NPPF para ambas as cultivares de 14% em 1981 e 12,3% em 1982, no estágio V₃ (40 DAS), com decréscimo depois desta fase. Os autores observaram ainda que a

maior utilização do N ocorreu com a dose de 40 kg ha^{-1} de N, em média, 30,3% em 1981 e 27,4% em 1982.

O aproveitamento do N-fertilizante, pelo feijão, aos 23 DAS, decresceu de 37,8% para 19,2%, respectivamente, com a aplicação da dose 2 mg kg^{-1} de N e 60 mg kg^{-1} de N. Já, aos 40 DAS, variou entre 61,7% e 67,1% e, aos 76 DAS, se manteve praticamente constante, com aproveitamento médio de 60,6% (Figura 3e). Para o caupi, nas três épocas avaliadas, à medida que se elevaram as doses de N, ocorreu um decréscimo no aproveitamento do N do fertilizante (Figura 3f), evidenciando redução na sua concentração na parte aérea. A maioria dos estudos demonstra que existe grande variação no aproveitamento do N do fertilizante pelas plantas, raramente ultrapassando 50% do aplicado (ALFAIA, 1997). No presente

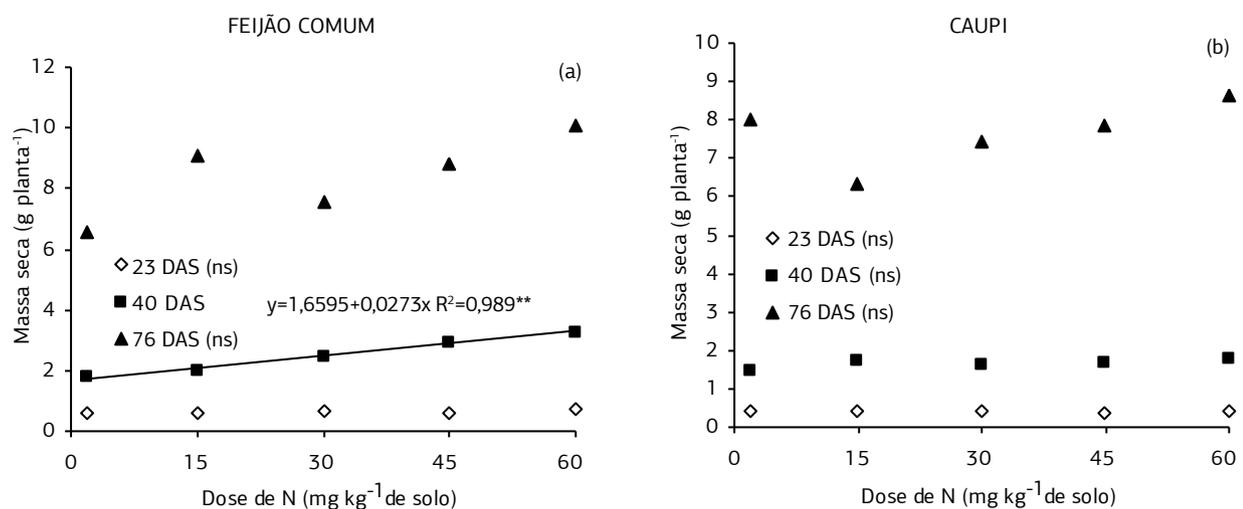


Figura 1. Produção de matéria seca de parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) do feijão comum (a) e caupi (b), aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de N. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições ns: não significativo. **: significativo a 1% de probabilidade.

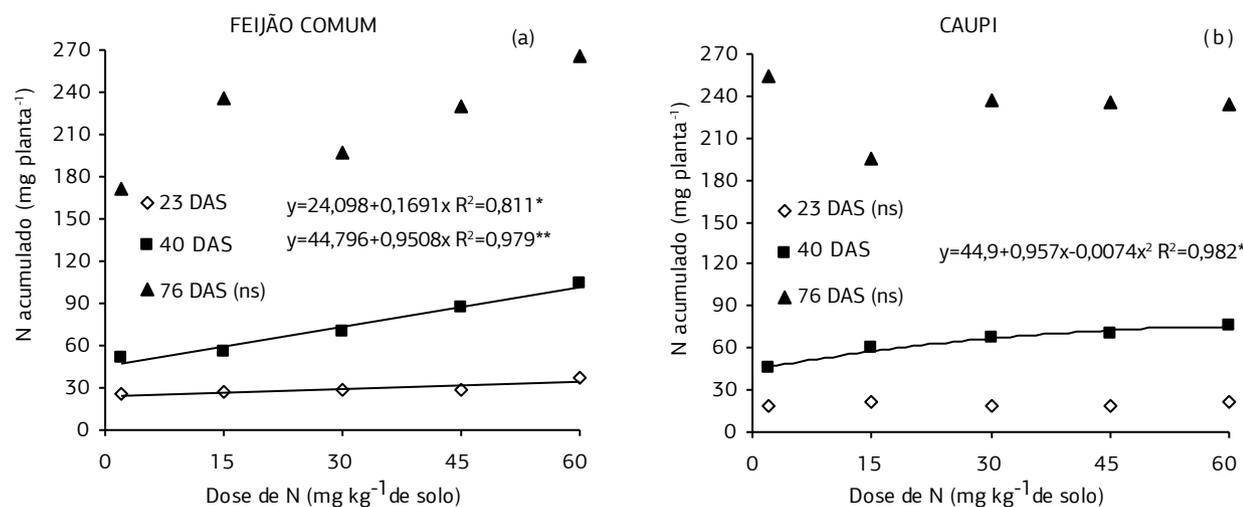


Figura 2. Quantidade de N total acumulada na parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) de feijão comum (a) e caupi (b), aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de N. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições. ns: não significativo. **, *: significativo a 1% e 5% de probabilidade respectivamente.

estudo, o aproveitamento relativamente alto para as duas plantas fixadoras de N, provavelmente está relacionado à condição de vaso, onde o sistema radicular permanece

confinado, explorando todo volume de solo e, também, não ocorrendo perda de N por lixiviação, para camadas fora do alcance das raízes.

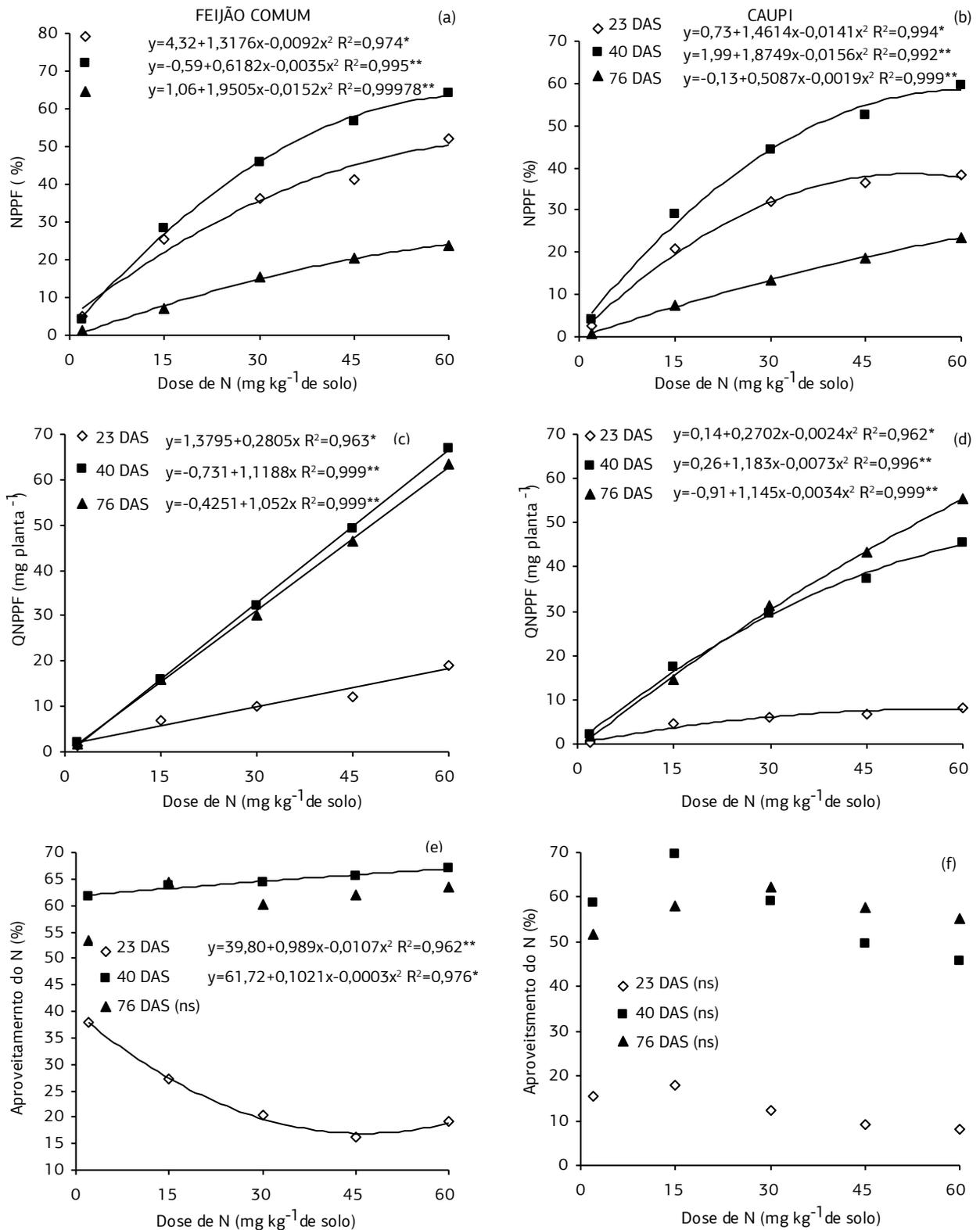


Figura 3. Porcentagem (%NPPF) (a e b) e quantidade (QNPPF) (c e d) e aproveitamento do nitrogênio (e e f) do fertilizante pela parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) de feijão comum e caupi, aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura (DAS), em função de doses de N. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições. ns: não significativo. **, *: significativo a 1% e 5% de probabilidade respectivamente.

A porcentagem de nitrogênio proveniente da fixação simbiótica (%NPPFB) no feijão (Figura 4a) e no caupi (Figura 4b) decresceu proporcionalmente ao incremento da dose de N, demonstrando que o aumento na concentração de N mineral na solução do solo desfavoreceu o processo de simbiose entre a planta e o rizóbio.

O tratamento que recebeu a menor dose de N (2 mg kg^{-1}) exibiu a maior média ($207,53 \text{ mg planta}^{-1}$) de QNPPFB, correspondendo a 81,49% do nitrogênio total. As plantas de feijão submetidas às doses de 2 ou 15 mg kg^{-1} de N de solo tiveram as maiores médias de %NPPFB, de 71,62% e 71,89% respectivamente, não diferindo entre si.

O maior valor de QNPPFB no feijão foi obtido no tratamento 15 mg kg^{-1} de N, evidenciando que a aplicação de pequenas doses de N mineral no início do desenvolvimento do feijoeiro foi favorável à planta hospedeira, certamente em virtude de promover maior envio de

fotossintatos ao sistema radicular e, assim, promover aumento no crescimento da raiz, aumentando os sítios de formação de nódulos e consequentemente aumento na fixação biológica de nitrogênio (FRANCO e DÓBEREINER, 1968; HUXLEY, 1980; TSAI et al., 1993).

A planta de caupi submetida à dose de 2 mg kg^{-1} de N proporcionou maior %NPPFB em relação aos demais tratamentos e, à medida que se elevou a concentração de N no vaso, decresceram as %NPPFB. Com base nesses resultados, confirmam-se as observações de outros estudos de que altas doses de N afetam a fixação em caupi (MILLER et al., 1982; BERVERLY e JARREL, 1984; GRAHAM e SCOTT, 1984; AGBENIN et al., 1990; ALFAIA 1997). Neste contexto, EAGLESHAM et al. (1982) concluíram que embora as taxas de utilização do N-fertilizante pelo caupi tenham sido baixas, de 12% e 28% com a aplicação de 25 e 100 kg ha^{-1} de N respectivamente, a menor dose promoveu

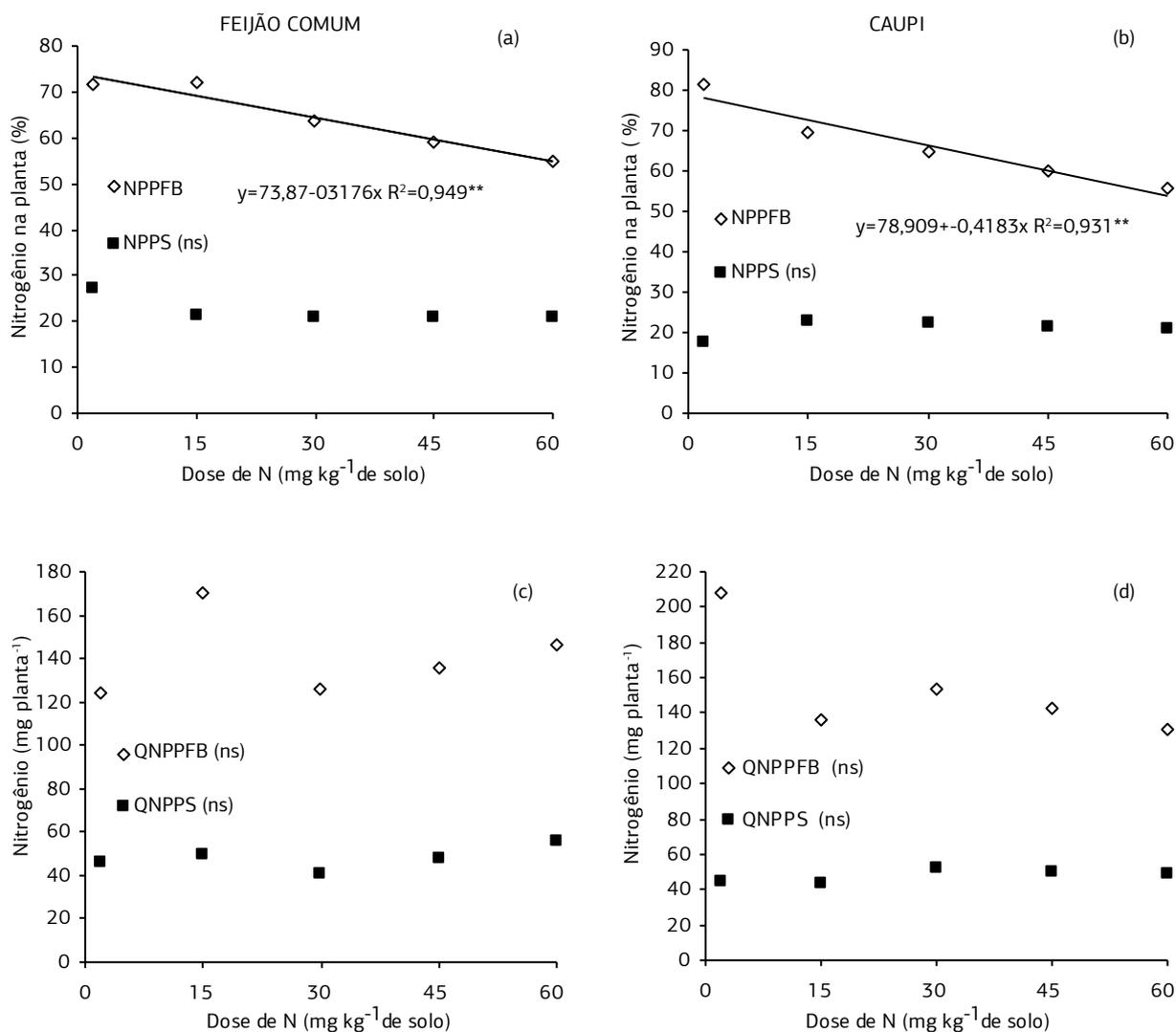


Figura 4. Porcentagem de nitrogênio na planta (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens) de feijão comum (a) e caupi (b) proveniente da fixação biológica (%NPPFB) e do solo (%NPPS) e quantidade nitrogênio na planta de feijão comum (c) e caupi (d) proveniente da fixação biológica (QNPPFB) e do solo (QNPPS), aos 76 dias após a semeadura, em função de doses de N. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições. ns: não significativo. **: significativo a 1% de probabilidade.

efeito adverso sobre o desenvolvimento dos nódulos e a maior dose de N, proporcionou efeito adverso prolongado na formação e desenvolvimento dos nódulos.

A porcentagem (%NPPS) (Figura 4a) e a quantidade de nitrogênio do solo (QNPN) (Figura 4b) nas plantas de caupi e feijão se manteve mais ou menos constantes, não sofrendo influência das doses de N. Tal fato indica que, provavelmente, as distintas doses de N não influenciaram a mineralização do N orgânico do solo e/ou a magnitude de absorção do N desta fonte.

Comparando-se os valores de QNPPF (Figura 3c,d), aos 76 DAS, com os de QNPPFB QNPPS (Figura 4c,d), observa-se que, à exceção dos tratamentos que receberam 45 ou 60 mg kg⁻¹ N, cujos os valores foram parecidos, nos demais tratamentos a contribuição das fontes de N para o N acumulado no feijão e no caupi seguiram a ordem decrescente NPPFB > NPPS > NPPF. De maneira geral, as doses de N influenciaram negativamente a fixação simbiótica do N₂, que variou de 55,6% a 81,5% para o caupi, e de 55,1% a 71,9% para o feijão comum. MENDES et al. (2008) relataram que sempre que a disponibilidade de N no solo é abundante, este é absorvido em detrimento ao N da fixação, enquanto o N-fixado é a maior fonte do nutriente quando o N do solo torna-se limitante.

Os resultados referentes à estimativa da atividade da nitrogenase, aos 76 DAS, tanto para o feijão como para caupi não se ajustaram significativamente aos modelos testados (Figura 5). Os valores do início até em torno da metade do ciclo do caupi e feijão (23 e 40 DAS) revelaram valores baixos, evidenciando menor atividade de fixação biológica de N nestas fases, comparada à fase após o florescimento. O sucesso na formação de uma simbiose funcional é dependente de muitos fatores não

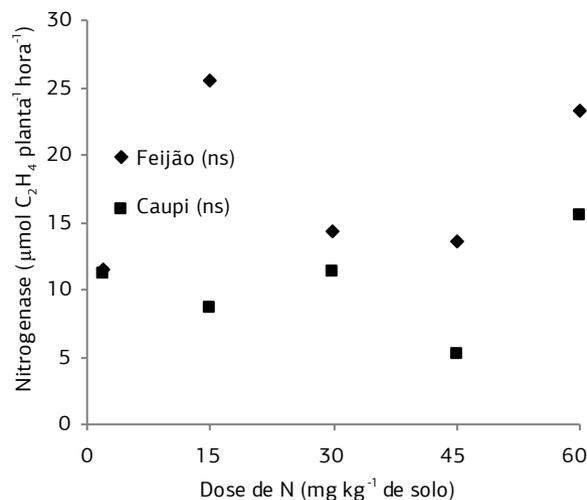


Figura 5. Atividade da redução do acetileno (ARA) nos nódulos de feijão comum e caupi, aos 76 dias após a semeadura, em função de dose de N e épocas de coleta. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições. ns: não significativo.

sequenciais tais como: físicos, ambientais (umidade, temperatura, intensidade da luz), nutricionais e biológicos (HUNGRIA et al., 1991). Além de fatores relacionados à planta (variedade) e à estirpe, bem como pela interação entre estes (SOARES et al., 2006a,b). Assim, vários fatores influenciam o desenvolvimento vegetativo, a atividade do rizóbio e a nodulação, sendo, muitas vezes, considerados mais importantes do que a adubação nitrogenada (EAGLESHAM et al., 1983; XAVIER et al., 2007).

As reduções no crescimento em plantas dependentes de N₂ ocorrem, principalmente, em virtude da baixa disponibilidade de N na fase prévia ao início da fixação de N₂, e podem ser diminuídas ou evitadas com a adubação de arranque no momento da semeadura. Essa prática é recomendada por vários pesquisadores (SUMMERFIELD et al., 1977; HUXLEY, 1980; HUNGRIA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 2003), em virtude de estimular o crescimento da planta e evitar que passe por estado de carência antes do início da fixação, possibilitando boa nodulação. No presente estudo, os resultados de MSPA (Figura 1b), QNT (Figura 2b), %NPPFB (Figura 4b) e QNPPFB (Figura 4d) no tratamento que recebeu apenas 2 mg kg⁻¹ de N confirmam a potencialidade de que a associação do caupi com o rizóbio pode substituir totalmente a adubação nitrogenada mineral e que, havendo condições de solo e da planta para a plena simbiose, é dispensável inclusive a adubação de arranque (semeadura). Neste contexto, ALFAIA (1997), em condições de campo, em um Latossolo Amarelo, não obteve efeito significativo da aplicação de 30 kg ha⁻¹ de N, atribuindo a falta de resposta à FBN. MARTINS et al. (2003) verificaram que a inoculação com rizóbio (BR 3267) em caupi, em área de sequeiro, promoveu aumento de 35% na produtividade de grãos, equivalente à aplicação de 50 kg ha⁻¹ de N mineral. SOARES et al. (2006a) verificaram que a inoculação em campo com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B contribuiu para o aumento no rendimento de grãos, semelhantemente ao tratamento que recebeu 70 kg ha⁻¹ de N, sem inoculação, e superior ao da estirpe BR 2001, que também foi utilizada no presente estudo.

Em feijão, busca-se substituir parcial ou totalmente a adubação nitrogenada, por meio da fixação simbiótica. No entanto, de acordo com os valores obtidos de MSPA (Figura 1a) e de QNT (Figura 2a) associados aos valores de %NPPFB (Figura 4a) e de QNPPFB (Figura 4c) do tratamento que recebeu 15 mg kg⁻¹ de N, indicam que a combinação do feijão comum com o rizóbio necessita dessa dose de arranque para a obtenção de produtividades econômicas aceitáveis.

Vale lembrar que no presente estudo não foi mensurado as contribuições das fontes N₂-fixação simbiótica, N-solo e N-uréia para sistema radicular do feijão comum e do caupi, representando, portanto, substantiva do total de N recuperado ou acumulado pelas plantas.

4. CONCLUSÕES

1. O incremento na dose de nitrogênio proporciona redução na fixação simbiótica de nitrogênio nas plantas de feijão comum e de caupi.
2. A fixação simbiótica de nitrogênio fornece a maior parte do N acumulado nas plantas de feijão e caupi, seguida, em ordem decrescente, pelo solo e uréia.
3. A fixação simbiótica de N₂ em feijão-caupi submetido à inoculação pode substituir totalmente a adubação nitrogenada, inclusive a dose de arranque (semeadura).
4. O aproveitamento do N da uréia, aos 76 DAS, foi, em média, de 60,7% pelo feijão comum e de 57,1% pelo caupi e sua participação no N acumulado na planta de feijão foi proporcional à dose aplicada.
5. A associação simbiótica em feijão comum necessita de uma dose de arranque (40 kg ha⁻¹ de N) para a obtenção de produtividade economicamente aceitável.
6. A absorção do N do solo não é influenciada pela dose de fertilizante nitrogenado.

AGRADECIMENTOS

A International Atomic Energy Agency (IAEA), pelo apoio financeiro para realização da pesquisa; à CAPES, ao CNPq e à FAPESP, pela concessão de bolsa, respectivamente, ao primeiro, segundo e terceiro autores.

REFERÊNCIAS

AGBENIN, M.W.; COYNE, D.P.; DAVIS, J.H.C.; GRAHAM, P.H.; AGBENIN, J.O.; LOMBIN, G.; OWONUBI, J.J. Effect of boron and nitrogen fertilization on cowpea nodulation, mineral nutrition and grain yield. *Fertilizer Research*, v.22, p.71-78, 1990.

ALFAIA, S.S. Destinos de fertilizantes nitrogenados (¹⁵N) em um Latossolo Amarelo cultivado com feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.). *Acta Amazônica*, v.27, p.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. (Org.). *Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. v.1, p.343-368.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS E CORRETIVOS AGRÍCOLAS -ANDA. *Acidez do solo e calagem*. São Paulo, 1986. 16p. (Boletim técnico 1)

BERVERLY, R.R.; JARREL, W.M. Cowpea response to N from, rate and liming application. *Agronomy Journal*, v.76, p.663-668, 1984.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. The ¹⁵N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. in the field. *Soil Biology and Biochemistry*, v.15, p.25-32, 1983.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KENEY, D.R. (Ed.). *Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties*. 2.ed. Madison: ASA, 1982. v.2, cap.31, p.595-624. (Agronomy; a series of monographs, 9)

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL – CIAT (Cali, Colômbia). Research constraints provisionally by CIAT. In: WOKSHOP ON ADVANCED *PHASEOLUS* BEANS RESEARCH NETWORK, 1990. Cali: CIAT, 1990. 30p. (Impresso)

DAY, P. R. Particle fractionation and particle-size analysis. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Madison: ASA, 1965. p. 545-567. (Part. I)

EAGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A.; RAO, V.R.; ESKEW, D.L. Mineral N effects on cowpea and soybean crops in a Nigerian soil. I. Development, nodulation, acetylene reduction and grain yield. *Plant and Soil*, v.68, p.171-181, 1982.

EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEEGER, R. Fertilizer-N effects on N₂ fixation by cowpea and soybean. *Agronomy Journal*, v.75, p.61-66, 1983.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/setembro/4a-semana/brs-Xquexique-primeira-cultivar-de-feijao-caupi-biofortificada>>. Acesso em 30 de set. 2008.

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. 2007.

FRANCO, A.A.; DÓBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do N por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.3, p.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. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, p.1145-1150, 2002.

GRAHAM, R.A.; SCOTT, T.W. Response of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) to nitrogen and inoculation in Trinidad. *Tropical Agriculture*, v.61, p.56-58, 1984.

HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A. Use of ¹⁵N methodology to assess biological nitrogen fixation. In: HARDARSON, G. (Ed.). *Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships*. Vienna: IAEA, 1990. p.129-160. (Training course series, 2)

HARDY, R.W.F.; HOSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluations. *Plant Physiology*, v.43, p.1185-1207, 1968.

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, DF: 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. *Journal of Experimental Botany*, v.42, p.839-844, 1991.

- HUXLEY, P.A. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*) IV. Uptake and distribution of a single dose of early applied nitrogen. *Tropical Agriculture*, v.57, p.193-202, 1980.
- 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. 2005.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. Rhizobium tropici, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.41, p.417-426, 1991.
- 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. *Biology and Fertility of Soils*, v.38, p.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. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, p.1053-1060, 2008.
- MILLER Jr., J.C.; SCOTT, J.S.; ZARY, K.W.; O'HAIR, S.K. The influence of available nitrate levels on nitrogen fixation in tree cultivars cowpea. *Agronomy Journal*, v.74, p.14-18, 1982.
- 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. *Horticultura Brasileira*, v.21, p.77-80, 2003.
- OLIVEIRA, I.P.; DANTAS, J.P. Nutrição mineral do caupi. In: ARAÚJO, J.P.; WATT, E.E. O caupi no Brasil. Brasília: ITA/ EMBRAPA, 1988. p.405-430.
- OLIVEIRA, I.P.; THUNG, M.D.T. Nutrição mineral. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do feijoeiro – fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.175-212.
- PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N.; OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.33, p.219-226, 2009.
- PORTER, L.K.; O'DEEN, W.A. Apparatus for preparing nitrogen from ammonium chloride for nitrogen-15 determinations. *Analytical Chemistry*, v.49, p.514-516, 1977.
- RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. ¹⁵N-determined time course for N₂ fixation in two cultivars of field bean. *Agronomy Journal*, v.76, p.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. Michigan: Ann Arbor, 1946. p.31
- SAITO, S.M.T.; MATSUI, E.; SALATI, E. ¹⁵N₂ fixation, H₂ evolution and C₂H₂ reduction relationship in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, v.49, p.37-42, 1980.
- SAS INSTITUTE. The SAS-System for Windows release 6.11 (software). Cary, 2001.
- SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I - Caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, p.795-802, 2006a.
- SOARES, A.L.L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R. VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II - Feijoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, p.803-811, 2006b.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms pure and applied aspects. London: Chapman and Hall, 1990, 256p.
- SUMMERFIELD, R.J.; DART, P.J.; HUXLEY, P.A.; EAGLESHAM, A.R.J.; MINCHIN, F.R.; DAY, J.M. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). I. Effect of applied nitrogen and symbiotic nitrogen fixation on growth and seed yield. *Experimental Agriculture*, v.13, p.129-142, 1977.
- 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 and Soil*, v.152, p.131-138, 1993.
- URQUIAGA, S.; BODDDEY, 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 and Soil*, v.102, p.291-294, 1987.
- XAVIER, T.F.; ARAÚJO, A.S.F.; SANTOS, V.B.; CAMPOS, F.L. Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v.37, p.56-564, 2007.