**MARCHA DE ABSORÇÃO DO NITROGÊNIO
DO SOLO, DO FERTILIZANTE E DA FIXAÇÃO
SIMBIÓTICA EM CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.)
Walp.) E FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)
DETERMINADA USANDO ^{15}N**

MARCIANO DE MEDEIROS PEREIRA BRITO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. TAKASHI MURAOKA

**Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, área
de concentração: Solos e Nutrição
de Plantas.**

P I R A C I C A B A
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
JUNHO - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Brito, Marciano de Medeiros Pereira
B862m Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do ferti-
lizante e da fixação simbiótica em caupi (*Vigna*
unguiculata (L.) Walp.) e feijão comum (*Phaseolus*
vulgaris L.) determinada usando 15N. Piracicaba,
1992.
197p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Caupi - Nutrição 2. Feijão - Nutrição 3. Nitrogê-
nio 15 - Fixação 4. Nitrogênio 15 em caupi - Absorção
5. Nitrogênio 15 em feijão - Absorção I. Escola Supe-
rior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

**MARCHA DE ABSORÇÃO DO NITROGÊNIO
DO SOLO, DO FERTILIZANTE E DA FIXAÇÃO
SIMBIÓTICA EM CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.)
Walp.) E FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)
DETERMINADA USANDO ^{15}N**

MARCIANO DE MEDEIROS PEREIRA BRITO

Aprovada em: 30/06/1992

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Takashi Muraoka..... CENA/USP

Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin..... CENA/USP

Prof. Dr. Romildo da Silva..... ESAL/Lavras

Prof. Dr. TAKASHI MURAOKA
Orientador

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao "meu" DEUS

**A meus queridos Pais
Gilvando & Ursulina**

**A meus irmãos
Luciano
Marçal
Nilda Maria
Giovana**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

AO PROF. DR. TAKASHI MURAOKA

Pela orientação solícita, pronta e desinteressada, pela paciência, altruísmo e cooperação além do incentivo pois sem isto não seria possível a realização deste trabalho.

**"Pouca ciência
torna os homens orgulhosos;
muita ciência
torna os homens humildes.**

**Assim,
as espigas vazias
elevam a cabeça soberba,
enquanto as cheias
inclinam-se
humildemente,
para a terra."**

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por me conceder constantemente a orientação intelectual e espiritual na condução e conclusão de mais uma etapa de minha vida.

Ao Professor Takashi Muraoka, Dr. pela orientação e incentivo na condução deste trabalho.

Ao Professor Toshiaki Kinjo, Dr.

Ao Professor Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, Dr. pela atenção em relação às análises isotópicas de ^{15}N .

Ao Dr. Roberto Bonetti, pela atenção em relação às análises de redução do acetileno.

Ao Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) pela oportunidade de realizar o Curso de Pós-Graduação.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pela oportunidade de realizar a Dissertação de Mestrado.

Aos Professores Drs.: Carlos Cerri, Marisa Piccolo e Brigitte Eduardo pela colaboração na confecção dos originais da Dissertação de Mestrado.

As bibliotecárias da Biblioteca Central da ESALQ/USP e do CENA/USP.

Aos funcionários da recepção das Bibliotecas da ESALQ e CENA/USP.

Aos colegas Artur Müller, Marcos, Erionaldo, Cássio, Edgar, Jener, Lincoln e, em especial aos Professores Drs. Francisco Neto de Assis e Vera Lúcia Gonçalves de Assis.

Aos funcionários Maria Aparecida, João Salvador, Marileuza, Sandra Tereza, Francisco, Pingin, João Isaac e Márcio.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, prestaram o seu apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Importância das culturas.....	4
2.2. Fixação simbiótica do nitrogênio.....	8
2.3. Efeito do nitrogênio mineral na fixação biológica de N ₂ por leguminosas.....	11
2.4. Métodos de avaliação da fixação biológica do nitrogênio por leguminosas.....	16
2.4.1. Método da diferença do N-total (método Kjeldahl).....	16
2.4.2. Técnica da redução do acetileno.....	19
2.4.3. Técnicas isotópicas para quantificação da fixação do nitrogênio.....	28
2.4.3.1. Determinação da fixação do N ₂ atmosférico marcando-se o nitrogênio do solo.....	33
2.4.4. Método da diluição isotópica do ¹⁵ N (DI) x método da diferença do N-total (MD).....	52

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1. Localização e época dos experimentos.....	56
3.2. Solo.....	59
3.3. Calagem.....	59
3.4. Adubação.....	61
3.5. Cultivares das culturas.....	61
3.6. Sementes, inoculação, semeadura e controle de umidade.....	62
3.7. Aplicação do fertilizante uréia marcada com ¹⁵N.....	62
3.7.1. Experimento I.....	62
3.7.2. Experimento II.....	63
3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas.	63
3.9. Condução do experimento.....	64
3.9.1. Análise do material vegetal.....	64
3.9.1.1. Colheita do material vegetal.....	64
3.9.1.2. Análises do nitrogênio total.....	65
3.9.1.3. Atividade da nitrogenase (redução do acetileno em raízes destacadas)..	66
3.9.1.4. Análise da composição isotópica de ¹⁵N: espectrometria de massas.....	66
3.9.2. Cálculos realizados.....	68
3.9.2.1. Determinação da atividade da nitrogenase.....	68
3.9.2.2. Quantidade de nitrogênio total (QNT).....	69

3.9.2.3. Nitrogênio proveniente do fertilizante.....	70
3.9.2.4. Nitrogênio da fixação (método isotópico).....	70
3.9.2.5. Nitrogênio proveniente do solo.....	71
3.9.2.6. Eficiência de utilização do fertilizante pela cultura (EUF).....	72
3.9.2.7. Nitrogênio da fixação (método da diferença).....	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.1. Experimento I.....	74
4.1.1. Medidas da redução do C_2H_2	74
4.1.2. Produção de matéria seca (MS).....	79
4.1.3. Quantidade de nitrogênio total (QNT).....	85
4.1.4. Percentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (átomos % ^{15}N , %NPPF e %NPPS).....	93
4.1.5. Quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (QNPPF e QNPPS).....	105
4.1.6. Eficiência de utilização do fertilizante (EUF).....	113
4.1.7. Quantificação da fixação do nitrogênio em leguminosas por diluição isotópica.....	116

	Página
4.1.7.1. Percentagem de N nas leguminosas proveniente da fixação (%N _{fix}).....	116
4.1.7.2. Quantidade de N na planta proveniente da fixação (QN _{fix}).....	123
4.1.8. Método da diluição isotópica (DI) x método da diferença (MD).....	131
4.1.8.1. Percentagem e quantidade de N fixado no feijão e caupi obtidos pelos métodos da diluição isotópica e método da diferença.....	131
4.2. Experimento II.....	138
4.2.1. Produção de matéria seca (MS).....	138
4.2.2. Quantidade de nitrogênio total (QNT)....	142
4.2.3. Percentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (átomos %, %NPPF e %NPPS).....	145
4.2.4. Quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (QNPPF e QNPPS).....	151
4.2.5. Eficiência de utilização do N-fertilizante (EUF).....	155
4.2.6. Quantificação da fixação do nitrogênio por diluição isotópica.....	157
5. CONCLUSÕES.....	164
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representação dos princípios envolvidos nas técnicas de ^{15}N para determinar a fixação de N_2 (PEOPLES <i>et al.</i> , 1988).....	35
2. Representação de quatro situações hipotéticas que podem ocorrer durante a experimentação com ^{15}N no campo (Peoples <i>et al.</i> , 1989 citados por PEOPLES & HERRIDGE, 1990).....	36
3. Variação das temperaturas máximas e mínimas, fora (Posto Agrometeorológico) e dentro da casa de vegetação, durante o período de condução do experimento I.....	57
4. Variação das temperaturas máximas e mínimas, fora (Posto Agrometeorológico) e dentro da casa de vegetação, durante o período de condução do experimento II.....	58
5. Variação da atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2 ; $\mu\text{ mol C}_2\text{H}_4/\text{planta/hora}$) durante o ciclo de caupi e feijão.....	76
6. Massa seca (g/panta) da parte aérea das culturas fixadoras e controles, em função das épocas de coleta.....	81
7. Quantidade de nitrogênio total (QNT) (mg/panta) na parte aérea das culturas fixadoras e controles, em função das épocas de coleta.....	89
8. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (mg/planta) na parte aérea das culturas fixadoras (A) e controles (B), em função das épocas de coleta.....	108

9. Percentagem (A) e quantidade (B) de nitrogênio proveniente da fixação ($\%N_{fix}$ e QN_{fix}) (mg/planta) na parte aérea das culturas fixadoras em função das épocas de coleta.....	129
---	-----

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Composição média nas sementes secas de caupi e feijão comum (g.100g sementes ⁻¹ ou, para alguns aminoácidos, mg.gN ⁻¹).....	6
2. Isótopos de nitrogênio.....	29
3. Resultados de algumas análises químicas e físicas do solo utilizado nos experimentos.....	60
4. Atividade da nitrogenase (redução do C ₂ H ₂) em determinado estágio de desenvolvimento de plantas de caupi e feijão (média de 3 repetições).....	75
5. Massa seca (g/planta) da parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	80
6. Quantidade de nitrogênio total (QNT) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	88
7. Massa seca, percentagem e quantidade de nitrogênio total das sementes (cotilédones + tegumento) das quatro culturas utilizadas na semeadura dos experimentos (média de duas repetições).....	92
8. Abundância de ¹⁵ N na parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	94
9. Abundância de ¹⁵ N na parte aérea e vagens de caupi e feijão, em função das épocas reprodutivas (média de 3 repetições).....	97

10. Percentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante (%NPPF) na parte aérea das plantas fixadoras e controles em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	98
11. Percentagem de nitrogênio proveniente do solo (%NPPS) na parte aérea de caupi, feijão, arroz e soja não nodulante em função dos dias de coleta (media de 3 repetições).....	102
12. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (mg/planta) na parte aérea das plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	106
13. Quantidade de N proveniente do solo (QNPPS) (mg/planta) na parte aérea de caupi, feijão, arroz e soja não nodulante em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	110
14. Eficiência de utilização do N-fertilizante (EUF) na parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	114
15. Percentagem de N proveniente da fixação (%N _{fix}) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta(média de 3 repetições).....	117
16. Percentagem de N proveniente da fixação (%N _{fix}) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta, comuns às duas plantas controles (média de 3 repetições).....	118
17. Quantidade de N proveniente da fixação (QN _{fix}) (mg/planta) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	124

18. Quantidade de N proveniente da fixação (QN_{fix}) (mg/planta) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta, comuns às duas controles (média de 3 repetições).....	126
19. Quantidade de N proveniente da fixação (QN_{fix}) (Kg N/ha) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta (média de 3 repetições).....	128
20. Percentagem de N na planta proveniente da fixação ($\%N_{fix}$) em caupi e feijão determinada pela diluição isotópica e método de diferença em função dos dias de coleta usando como plantas controles arroz e soja não nodulante(médiade3repetições).....	132
21. Quantidade de N na planta proveniente da fixação (QN_{fix}) (mg/planta) em caupi e feijão determinada pela diluição isotópica e método da diferença em função dos dias de amostragens, usando como planta controle arroz e soja não nodulante (média de 3 repetições)....	136
22. Massa seca (g/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	140
23. Quantidade de nitrogênio total (QNT) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Médiade3repetições.....	143
24. Abundância de ^{15}N na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Média de 3 repetições.....	146

Página

25. Percentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante (%NPPF) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	148
26. Percentagem de N proveniente do solo (%NPPS) na parte aérea das plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	150
27. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	152
28. Quantidade de nitrogênio proveniente do solo (QNPPS) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	154
29. Eficiência de utilização do fertilizante (EUF) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	156
30. Percentagem de N proveniente da fixação (%N _{fix}) na parte aérea de caupi e feijão que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	158
31. Quantidade de N proveniente da fixação (QN _{fix}) na parte aérea de caupi e feijão, que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. Média de 3 repetições.....	159

32. Efeitos da aplicação de 5 doses na atividade da nitrogenase (μ mol C_2H_4 /planta/hora) em plantas de caupi e feijão em determinado estágio de desenvolvimento (aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura). Média de 3 repetições.....	162
---	-----

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

Autor: MARCIANO DE MEDEIROS PEREIRA BRITO

Orientador: PROF. DR. TAKASHI MURAOKA

RESUMO

Dois experimentos foram realizados com caupi (cv. CNC x 284-4E) e feijão (cv. Carioca), em casa de vegetação, utilizando vasos com 5 Kg de terra (LE), com os objetivos de avaliar, através da técnica da diluição isotópica- ^{15}N e como plantas controles arroz e soja não nodulante: a) as contribuições relativas das fontes de N (N_2 -fixação simbiótica, N-solo e N-fertilizante) aos 17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 e 78 dias após a semeadura (DAS). Comparou-se também duas técnicas para avaliação da fixação de N_2 : método isotópico (DI) e método da diferença (MD) (Exp. 1); b) Os efeitos das doses de N (2, 15, 30, 45 e 60 ppm de N-uréia) aos 23, 40 e 76 DAS sobre a fixação simbiótica de N_2 (Exp. 2). Durante as amostragens avaliou-se a atividade da nitrogenase e na parte aérea das plantas determinou-se a massa seca (MS), N-total (QNT) e ^{15}N .

Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- No Exp. 1, o acúmulo de MS e de N absorvido (QNT) aumentaram significativamente em cada época de desenvolvimento das culturas, sendo maior no período de enchimento das vagens e maturação fisiológica (MF) (58-78 DAS para caupi e 47-78 DAS para feijão).
- Na MF (78 DAS), o caupi acumulou 706,32 mg N/planta, 93% do qual

derivado da fixação ($\%N_{fix}$), 5,8% vindo do solo ($\%NPPS$) e 1,2% do fertilizante ($\%NPPF$). Da máxima QNT acumulada pelo feijão aos 68 DAS (298,12 mg N/planta), esses valores foram de 83%, 13,6% e 3%, respectivamente.

- As baixas contribuições relativas do N do solo e do fertilizante para o N das vagens evidenciaram que a maior fonte de N para esses órgãos foi o N_{fix} (95 e 89% para caupi e feijão, respectivamente).

- Os resultados de $\%N_{fix}$ e QN_{fix} pelo feijão e caupi aos 31, 38, 47, 58, 68 e 78 DAS (controle = arroz) e 31, 58 e 78 DAS (controle = soja não nodulante), indicaram de um modo geral boas concordâncias entre o DI e MD.

- Arroz e soja não nodulante foram adequadas plantas controles durante os períodos citados acima, porém não válido para as demais épocas (17 e 24 DAS) devido a influência do N da semente, principalmente para soja não nodulante.

- No Exp. 2, a QN_{fix} variou de 130,46 a 207,53 mg N/planta (55,59 a 81,49%) para caupi e de 123,73 a 170,64 mg N/planta (55,06 a 71,89%) para feijão, dependendo da quantidade de N aplicado. As baixas temperaturas influenciaram nesses resultados.

- A aplicação de 45 e 60 ppm de N tiveram pouco efeito adverso na $\%N_{fix}$ de caupi e feijão.

- Os experimentos confirmaram a potencialidade que a associação da cv. CNC x 284-4E com a estirpe CM 1528 31-3 tem, de substituir a adubação nitrogenada, quando condições de solo e da planta permitem uma plena simbiose, dispensando inclusive a adubação nitrogenada de arranque. Todavia, a associação cv. Carioca/CM01 31-3 necessita de uma dose de arranque (15 ppm de N) para obtenção de produções econômicas aceitáveis.

ABSORPTION TIME COURSE OF NITROGEN FROM SOIL, FERTILIZER AND SYMBIOTIC FIXATION IN COWPEA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) AND BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) DETERMINED BY ^{15}N

Author: MARCIANO DE MEDEIROS PEREIRA BRITO

Adviser: PROF. DR. TAKASHI MURAOKA

SUMMARY

Two experiments were carried out in green-house with cowpea (cv. CNC x 284-4E) and common bean (cv. Carioca), using pots with 5 Kg soil (Red Yellow medium texture latosol). The objectives of the experiments were to evaluate, through the ^{15}N -dilution technique and using rice and soybean plants as standard crops, the following: a) Relative contributions of N sources (symbiotically fixed N, Soil-N and Fertilizer-N) at 17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 and 78 days after sowing (DAS). Two techniques for evaluating N_2 fixation, namely, the isotopic (ID) and the difference methods (DM), were also compared (Exp. 1). b) The effects of N rates (2, 15, 30, 45 and 60 ppm urea-N) at 23, 40 and 76 DAS on the nitrogen fixation by the crops (Exp. 2). During the samplings, the nitrogenase activity were evaluated and plant above ground parts were collected for the evaluations of dry weight (DW), total N and ^{15}N .

The following conclusion were drawn:

First Experiment:

- The accumulation of plant DW and N taken up (QNT) increased significantly in each growing stage of bean and cowpea. This accumulation was sensibly greater in the pod filling and physiological maturation stage (PM) (58-78 DAS for cowpea and 48-78 DAS for bean).
- Cowpea accumulated, at PM (78 DAS), 706.32 mg N/plant, 93% of which

derived from the fixation (%Ndfa), 5.8% from the soil (%Ndfs) and 1.2% from the fertilizer (%Ndff). The highest value of QNT for bean plants was 298.12 mg N/plant, of which 83%, 13.6% and 3%, respectively for %Ndfa, %Ndfs and %Ndff.

- The low relative contributions of soil and fertilizer N to the pod N evidenced that the major N source for the formation of these organs was the fixed N (95 and 89% for cowpea and bean, respectively).
- The results of N fixed by cowpea and bean at 31, 38, 47, 58, 68 and 78 DAS (rice as standard crop) and 31, 58 and 78 DAS (soybean as standard crop) indicated good agreement between the two methods (ID and DM).
- Rice and non nodulating soybean plants were adequate standards in this pot experiment condition and period above mentioned. However, this was not the case for the other periods (17 and 24 DAS) due to the effect of seed N, mainly for soybean.

Second Experiment:

- The Ndfa ranged from 130.46 to 207.53 mg N/plant (55.59 to 81.49%) for cowpea and 123.73 to 170.64 mg N/plant (55.06 to 71.89%) for bean, depending the rate of applied N. The low temperature affected nitrogen fixation.
- The application of 45 and 60 ppm N had little adverse effect of the nitrogen fixation of cowpea and bean.
- The experiments confirmed the potentiality presented by the association of cowpea cv. CNC x 284-4E with CM 1528 31-3 strain for substituting totally nitrogen fertilizer application, when soil and plant conditions allow complete symbiose, excempting even the starter N fertilizer. However, the association bean cv. Carioca/CM 01 31-3 needs started N fertilizer (15 ppm N) for obtaining acceptable economic yelds.

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas, tanto Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) como feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) são as culturas mais importantes no Brasil do ponto de vista sócio econômico e, apesar da atual situação conjuntural, prosseguem em condições de culturas marginais no nosso país.

A carência energético-protéica é apontada como a principal causa da prevalência da desnutrição, que contribui para elevar os índices de problemas sociais nos países menos desenvolvidos (TEIXEIRA & ROCHA, 1988). O feijão comum e caupi dentre outros contribuem para suprir tal deficiência, constituindo fonte mais acessível de proteínas. Além disso, por serem leguminosas, parte das suas necessidades de nitrogênio é suprida através da fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico (N_2). O sucesso na formação de uma simbiose funcional é dependente de muitos fatores não sequenciais tais como: físicos, ambientais, nutricionais e biológicos.

A capacidade de fixação do nitrogênio pelo feijoeiro parece não ser tão eficiente como na cultura da soja, que praticamente dispensa a adubação nitrogenada. Para obtenção de rendimentos econômicos, é essencial portanto, uma suplementação nitrogenada, principalmente até que a nodulação esteja plenamente estabelecida para que o desenvolvimento da planta não seja afetado pela falta de

nitrogênio. É necessário, no entanto, uma dose de nitrogênio que proporcione esse bom desenvolvimento da planta, mas que ao mesmo tempo não venha prejudicar a fixação do nitrogênio.

Constitui um requisito importante qualquer programa objetivando estudos da fixação biológica do nitrogênio, dispor de um método adequado para medir com precisão a quantidade de N que as culturas obtenham mediante a fixação (HARDARSON & DANSO, 1990). Existem vários métodos que podem ser usados para estudar o N fixado simbioticamente (^{15}N - técnicas isotópicas, método da diferença, método do ureídeos, avaliação dos nódulos, balanço do N, redução do acetileno) (PEOPLES & HERRIDGE, 1990), cada um apresentando vantagens e desvantagens. Desses, porém, o método de diluição isotópica (usando ^{15}N) é o único que permite a quantificação integral direta do N fixado, não determinando apenas a taxa de fixação no momento da amostragem, mas também permitindo distingui-lo do N derivado do solo ou fertilizante. No entanto, apesar de atualmente a maioria das pesquisas considerar a diluição isotópica - ^{15}N como método mais preciso, ainda existem algumas discordâncias no meio científico.

Um experimento de casa de vegetação foi portanto estabelecido com o propósito de:

- a) Avaliar as contribuições relativas das fontes de nitrogênio (N_2 -fixação simbiótica, N-solo e N-fertilizante) no desenvolvimento do caupi e feijão comum ao longo do ciclo.
- b) Avaliar os efeitos das doses de nitrogênio na forma de uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) sobre a fixação simbiótica de N_2 em caupi e feijão comum durante todo ciclo dessas culturas.

c) Comparar duas técnicas para a avaliação da fixação simbiótica de N: método isotópico X método da diferença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância das culturas

A situação mundial das leguminosas de grão não é boa, pois sua produção, além de ser baixa, em relação aos cereais, não acompanhou a explosão populacional, oscilando em torno de 45 milhões de toneladas por ano (VIEIRA, 1988). Entre as leguminosas, as culturas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) desempenham um papel importante, como componente na alimentação humana. Essas culturas são amplamente cultivadas, aceitas e consumidas em muitos países tropicais e subtropicais.

Segundo dados fornecidos pela FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (1991), a produção mundial de feijões secos, em 1990 numa área de 26,7 milhões de hectares foi de aproximadamente 16,42 milhões de toneladas, com um rendimento de 617 kg/ha. No Brasil, segundo dados da mesma instituição, numa área de 4,7 milhões de hectares, a produção foi de 2,2 milhões de toneladas com um rendimento de 477 kg/ha. Tanto a FAO (1991) como o ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL (1991) incluem nos dados de área colhida, produção e rendimento, todas as espécies de *Phaseolus* e *Vigna*.

Para VIEIRA (1988), somente duas espécies de leguminosas são realmente importantes no Brasil: o feijão e o feijão-macassar (caupi) e em seguida vem o feijão-fava, cultivado em maior ou

menor extensão em todos os estados, mas cuja produção total está longe de alcançar a significância conseguida por aquelas duas espécies. Acrescenta o mesmo autor que a soja ainda não faz parte de nossos hábitos alimentares, sendo utilizada como oleaginosa e na alimentação animal.

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é nativa da África (ELHASSAN & FOCHT, 1986; LATUNDE-DADA, 1990) e é uma importante fonte de proteína para uma quantidade apreciável de pessoas no oeste africano, nordeste do Brasil (STAMFORD, 1978; EAGLESHAM, 1981; LATUNDE-DADA, 1990), sudeste da Ásia (AHMAD, 1981; ELHASSAN & FOCHT, 1986), América Central, Austrália, Caribe e Estados Unidos (Georgia, Califórnia e Texas, contribuem aproximadamente com 65% do total da produção nesse país) (FERY, 1981; FERY, 1990).

Rachie¹ (1985) citado por FERY (1990), estimou que a produção anual de caupi pode exceder a 2,5 milhões de toneladas de grãos em 9 milhões de hectares, e que o Continente Africano produz aproximadamente dois terços da produção total do mundo. STEELE *et al.* (1985) e FERY (1990) apontam que os principais produtores de caupi são Nigéria, Brasil e Níger; esses três países produzem anualmente três quartos da produção dessa leguminosa. Watt² (1983) citado por STEELE *et al.* (1985) afirma que a cultura no Brasil produz cerca de 0,6 milhões de toneladas anualmente.

¹ RACHIE, K.O. Introduction. In: SINGH, S.R. & RACHIE, K.O. Cowpea research, production and utilization. Wiley, New York. p. XXI-XXVIII, 1985.

² WATT, E.E. The IITA/EMBRAPA/IICA Cowpea Program in Brasil. Internal report of the International Institute of Tropical Agriculture Ibadan. IITA. 1983.

As sementes de caupi apresentam altos teores de proteínas, geralmente entre 19 a 26% (FERY, 1981; LANGER & HILL, 1982) e seu conteúdo de aminoácidos é excelente, apesar de ligeiramente inferior ao feijão comum (LEÓN, 1987). A composição das sementes secas é mostrada na tabela 1.

Tabela 1. Composição média nas sementes secas de caupi e feijão comum (g.100g sementes⁻¹ ou, para alguns aminoácidos, mg.gN⁻¹)

Composição nas sementes	Caupi	Feijão comum	Fonte
Água	11,5	11,0	3
Proteína (Nx6,25)	22,7	22,1	3
Lipídeos	1,6	1,7	3
Carboidratos			
Açúcar	-	3,0	3
Amido	-	42,0	3
Total	61,0	45,0	3
Fibras	4,3	4,2	1
Aminoácidos			
Isoleucina	260	360	2
Leucina	450	540	2
Lisina	410	460	2
Fenilalanina	340	350	2
Tirosina	210	240	2
Metionina	75	70	3
Cistina	70	50	3
Treonina	225	250	3
Tryptofano	70	60	3
Valina	280	290	3

1. FAO¹ (1949) citada por AYKROYD & DOUGHTY (1964)

2. Orr & Watt² (1957) citados por AYKROYD & DOUGHTY (1964)

3. Paul & Southgate³ (1978) citados por NORTON *et al.* (1985)

¹ FAO - Tablas de composición de alimentos para uso internacional. Roma, 1949.

² ORR, M.L. & WATT, B.K. Home Economics Research Rep. nº 4. USDA.1957.

³ PAUL, A.A. ; SOUTHGATE, D.A.T. McCance and Widdowson's the composition of foods. Medical Research Council Special Report nº 297. London: HNSO.1978.

Leguminosa bem adaptada às condições brasileiras de clima e solo, o caupi é bastante cultivado para alimentação humana na região semi-árida do Nordeste (VIEIRA, 1989; SANTOS, 1990), visando não só a obtenção de grãos maduros mas também a obtenção de grãos do chamado "feijão verde" (FERREIRA & SILVA, 1987). Cerca de 70% do feijão produzido no Nordeste corresponde ao caupi (VIEIRA, 1989). Potencialmente, essa leguminosa rica em proteína, juntamente com feijão comum, podem ser produzidas nos solos empobrecidos de N sem adições de N-fertilizantes, e em qualquer solo sem esgotamento das reservas nitrogenadas. Os resíduos podem contribuir com N e outros nutrientes quando incorporados ao solo ou quando fornecido como alimento aos animais. Entretanto, segundo PEOPLES & HERRIDGE (1990) essas características desejáveis das leguminosas podem ser satisfeitas somente quando grandes quantidades de N₂ atmosférico são fixados.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é nativo da América Central e do Sul (Gentry¹, 1969, citado por RENNIE & KEMP, 1982; ZIMMERMANN & TEIXEIRA, 1988) e é extensivamente cultivado nos cinco maiores continentes: África Oriental, América Central e do Norte, América do Sul, Ásia Oriental e Oeste e Sudeste Europeu (ADAMS *et al*, 1985).

Dentre os principais produtores mundiais de feijão destacam-se o Brasil, a Índia, a China Continental, o México e os Estados Unidos (ADAMS *et al*, 1985; TEIXEIRA & ROCHA, 1988). Segundo FAGÉRIA (1989), aproximadamente 50% da produção está

¹ GENTRY, H.S. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. Econ. Bot. 23:55-69, 1969.

concentrada na América Latina e no Caribe embora com baixa produtividade.

A importância econômica e social do feijão é evidenciada pelo contingente de pequenos produtores e pelo consumo generalizado pela população brasileira (TEIXEIRA & ROCHA, 1988), justificando, portanto, esforço de pesquisa para obter melhores informações sobre essa cultura que é muitas vezes alimento substituto de proteínas animais.

2.2. Fixação simbiótica do nitrogênio

O nitrogênio é um nutriente para as plantas que apresenta grande dinâmica de transformações em seu complexo ciclo biogeoquímico (DE-POLLI, 1988).

Essencial para muitos tipos de moléculas orgânicas, sendo exigido em grandes quantidades na produção de proteínas, o nitrogênio é um dos elementos mais abundantes na terra, porém é na forma de N_2 que ele é mais encontrado ocupando aproximadamente 78% da atmosfera (WUTKE, 1972).

Em ecossistemas naturais, a fixação biológica do N_2 e a fotossíntese representam os processos básicos responsáveis pela manutenção da vida na terra, sendo os microorganismos simbióticos os que contribuem com a maior proporção da fixação de N. Para se ter uma idéia da importância da fixação biológica do N_2 , considera-se por exemplo que, industrialmente, para fabricação de adubos, o nitrogênio molecular (N_2) atmosférico é fixado em condições de altas temperaturas e pressões e na presença de hidrogênio oriundo de fósseis, processo

oneroso e dispendioso em energia, pois na forma diatômica, o N_2 é pouco reativo e necessita de muita energia de ativação para ser reduzido a NH_3 (DE-POLLI, 1988).

A disponibilidade de nitrogênio mineral para as plantas está na dependência direta da contínua decomposição da matéria orgânica e da aplicação de adubação nitrogenada, sendo o processo de fixação de N_2 restrito a microrganismos que ocorrem livremente no solo ou em associação com espécies vegetais (ARAÚJO & HENSON, 1988).

Dos sistemas fixadores mais importantes para solos de clima tropical, com mais possibilidades de exploração agrícola, destaca-se o gênero *Rhizobium*, reclassificado, nos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* por JORDAN (1984), ou precisamente, logo após, para o feijão (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) (PINERO *et al.*, 1988) e caupi (*Bradyrhizobium* sp Cowpea) (JORDAN, 1984).

DE-POLLI *et al.* (1988) comentam que a reclassificação do gênero *Rhizobium*, que era baseada na espécie de leguminosas da qual era isolada a bactéria, passou a ser baseada nas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas da bactéria, e que na fase atual, não melhora em nada a classificação dentro do grupo tropical (Cowpea) tendo apenas sido recomendado que após o nome *Bradyrhizobium* fosse colocado o nome do hospedeiro do qual a bactéria foi isolada. Acrescentam, que pouco se conhece ainda sobre as leguminosas tropicais. De fato, FARIA *et al.* (1987) observaram, somente em diversas localidades da região sudeste do Brasil, mais 100 novas ocorrências de espécies de leguminosas arbóreas que nodulam e que ainda não estavam descritas como nodulantes, constituindo, portanto,

uma realização de grande importância, para futuros estudos com biologia do solo.

"Decididamente as plantas não fixam N_2 , mas algumas plantas podem se associar com bactérias fixadoras de nitrogênio" (DEPOLLI *et al.*, 1988). Assim as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* "são de considerável interesse científico e econômico por causa de sua habilidade em produzir nódulos fixadores de dinitrogênio com plantas leguminosas" (HYNES & O'CONNEL, 1990).

A fixação do (di)nitrogênio é o termo técnico para conversão da molécula do dinitrogênio à amônia, e esta reação pode se dar quimicamente ou simbioticamente numa reação catalizada pela enzima nitrogenase (BOTHE *et al.*, 1983).

Várias enzimas são consideradas de importância para a fixação do nitrogênio: nitrogenase (reduz N_2 até amônia); glutamina sintetase e glutamato sintetase (enzimas da assimilação da amônia); fosfoenolpiruvato carboxilase e sacarose sintase (enzimas do metabolismo do carbono); aspartato aminotransferase e uricase (síntese de transportadores de nitrogênio nos nódulos) (SÁNCHEZ *et al.*, 1991). HERRIDGE *et al.* (1978) e ATKINS *et al.* (1984), analisando as frações dos extratos de tecidos nodulares de caupi fixadores de nitrogênio, constataram a presença de glutamato sintetase e glutamina sintetase mas pequena atividade de glutamato dehidrogenase. Foram também detectados altos níveis de uricase e alantoinase.

Leguminosas como feijão e caupi, assim como suas estirpes de *Bradyrhizobium* são mais sensíveis ao estresse ambiental, e condições sub-ótimas para crescimento resultam numa redução da fixação do N_2 . O grau de inibição varia de acordo com a umidade do solo

(ZABLOTOWICZ, *et al.*, 1981; SAITO *et al.*, 1984; WALKER & MILLER, 1986; VENKATESWARLU *et al.*, 1990), a forma de composto nitrogenado aplicado (DART & WINDON, 1970; EAGLESHAM *et al.*, 1983; BEVERLY & JARRELL, 1984; HINE & SPRENT, 1988; JAMRO & LARIK, 1988), o cultivar (ZARY & MILLER, 1980; FERNANDEZ & MILLER, 1985; HUNGRIA & NEVES, 1987; MILLER *et al.*, 1987), a temperatura (GUSS & DÖBEREINER, 1972; ERIKSEN & WHITNEY, 1984; YOURSTONE & WALLACE, 1990), o fotoperíodo (YOURSTONE & WALLACE, 1990) e outros parâmetros.

2.3. Efeito do nitrogênio mineral na fixação biológica de N₂ por leguminosas

Para OLIVEIRA & THUNG (1988), embora seja necessário conhecer as condições de desenvolvimento da cultura do feijão e o cultivar plantado, para a produção de 1.500 kg de grãos, necessitam de aproximadamente 46 kg de N, 9 kg de P₂O₅, 20 kg de K₂O, 8 kg de CaO, 7,5 kg de MgO e 7,5 kg de S. Os autores afirmam ainda que para o feijão continua sendo recomendado aplicação de N, tanto no plantio, quanto em cobertura, 25 a 35 dias após a germinação.

RACHIE & ROBERTS (1974) relatam que são necessários para produzir de 600 a 750 kg/ha de grãos de caupi, em diferentes condições de solos, 40 kg de N, 7,5 kg de P, 40 kg de K, 11,5 kg de Ca, 9 kg de Mg e 4 kg de S. Segundo DANTAS *et al.* (1987), considerando um espaçamento de 1,00 m x 0,50 m com duas plantas por cova (40.000 plantas/ha), um hectare da cultura absorveu 130,1 kg N; 13,7 kg P; 100,5 Kg K; 99,0 Kg Ca; 17,4 kg Mg; 9,5 kg S; 304,6 g B;

46,7 g Cu; 578,6 g Fe; 974,4 g Mn; 4,2 g Mo e 109,3 g Zn. Os mesmos autores afirmaram que para uma produção de 1.210 kg de grãos por hectare, a exportação de macro (kg) e micronutrientes (g) foi de : N=38,0; P=6,8; K=20; Ca=4,5; Mg=3,3; S=1,8; B=72,6; Cu=13,3; Fe=31,46; Mn=79,9; Mo=1,9; Zn=41,1.

O caupi depende do nitrogênio da semente e do solo, até os 20 dias após a germinação. Havendo condições de solo e da planta para uma simbiose efetiva é dispensada a adubação mineral nitrogenada. A partir dos 25 dias da germinação, a necessidade da cultura em nitrogênio é suprida pela fixação do nitrogênio atmosférico, estendendo-se até a floração o que deverá ocorrer entre os 45 e 55 dias, para as culturas de porte determinado, e entre 75 e 90 dias para as de porte indeterminado (OLIVEIRA & DANTAS, 1988). DART & WILDON (1969) declaram que os nódulos geralmente ocorrem nas raízes primárias durante as 2-3 semanas de crescimento, e são geralmente maiores do que os nódulos que se formam nas raízes secundárias.

Desenvolvendo estudos com três culturas, RYLE *et al.* (1979) constataram que os nódulos foram primeiramente visíveis no eixo da raiz principal de soja, caupi e trevo branco, no quinto, quarto e oitavo dia respectivamente após a germinação e aparecimento das primeiras folhas. A maioria dos nódulos desenvolveu leghemoglobina no décimo segundo, décimo primeiro e décimo quinto dia, respectivamente, após o aparecimento das folhas primárias.

SPRENT (1979) e SPRENT & SPRENT (1990) afirmam que é necessário que haja disponibilidade de N combinado para o crescimento do rizóbio até o início da fixação do N₂. Estudos realizados por EZENDINMA (1964); DART & WILDON (1970);

SUMMERFIELD *et al.* (1977); AGBOOLA (1978); HUXLEY (1980); e muitos outros, mostraram que baixas doses de N combinado beneficiam a nodulação, fixação e produção do caupi. Entretanto EAGLESHAM *et al.* (1983) relataram que até pouco antes daquela data nenhuma afirmação conclusiva pôde ser obtida em relação a dose de nitrogênio requerido para maximizar a nodulação e fixação do N₂. Os mesmos autores, ao realizarem experimento utilizando ¹⁵N para avaliar os efeitos das 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 doses de 30 a 180 mg/planta tem efeito sinérgico na fixação de N₂.

Muitas pesquisas tem sido feitas até o momento para estudar a resposta de leguminosas ao N adicionado. É estabelecido por vários pesquisadores que altas quantidades de nitrogênio reduz o processo de infecção nos pelos radiculares (BONETTI, 1982; ABDEL-GHAFFAR *et al.*, 1982), a massa de nódulos (MILLER *et al.*, 1982; GRAHAM & SCOTT, 1984; AGBENIN *et al.*, 1990), a atividade da fixação do N₂ pelas raízes noduladas (LIE, 1974; ABDEL-GHAFFAR *et al.*, 1982) e a quantidade total de N fixado (EAGLESHAM *et al.*, 1982b; SENARATNE *et al.*, 1987; HARDARSON *et al.*, 1991).

O grau de inibição é dependente da concentração e forma do nitrogênio adicionado (nitrato, nitrito, amônio e uréia) (DART & WILDON, 1970; LIE, 1974), da época de aplicação do N, das condições de crescimento da planta, da espécie de planta hospedeira e estirpe de rizóbio utilizado (LIE, 1974; SENARATNE *et al.*, 1987).

Interação entre doses de N adicionadas, cultivares de soja e estirpe de *Rhizobium* tem sido estudadas, e os efeitos positivos e negativos de N na fixação biológica do N₂ tem sido determinados por

vários autores (HARDARSON *et al.*, 1984; DANSO *et al.*, 1987; SENARATNE *et al.*, 1987). RUSCHEL *et al.* (1980) mostraram que plantas de soja nodulante absorveram mais nitrogênio que plantas não nodulantes. Isto sugere um efeito sinérgico do N₂ fixado sobre o N derivado de outras fontes. A aplicação de 25 kg/ha de N mineral deu a máxima absorção de N. Neste nível, a fixação permaneceu alta, mas com 50 kg N/ha diminuiu a fixação.

O feijoeiro tem apresentado um potencial baixo para fixação simbiótica de N₂ atmosférico, principalmente em solos pobres em N, e a adubação nitrogenada tem proporcionado acréscimos consideráveis no rendimento desta cultura. Recentemente HENSON & BLISS (1991) estudaram a aplicação de 50 a 60 kg N/ha em diferentes estádios de crescimento em três cultivares de feijão durante três anos. Todos os tratamentos de N incrementaram a produção, comparado à controle não adubada. O N aplicado durante o estágio vegetativo forneceu maior produção de sementes do que o N aplicado no plantio, floração, durante o enchimento das vagens ou aplicação parcelada.

MURAOKA *et al.* (1984) verificaram que a aplicação de nitrogênio na dosagem de 20 kg N/ha, na forma de sulfato de amônio ou uréia, proporcionou um aumento considerável na produção de feijão (2-2,5 vezes sobre a testemunha). Não se observou diferenças entre as duas fontes tanto na produção como no aproveitamento do nitrogênio. Observaram ainda que a aplicação de 40 kg N/ha, parcelado ou não, não apresentou vantagem sobre aplicação de 20 kg na semeadura.

A fixação de nitrogênio em culturas como feijão comum tem mostrado ser muito sensível a adubação nitrogenada em alguns estudos (AWONAIKE *et al.*, 1980; ABDEL-GHAFFAR *et al.*, 1982;

RUSCHEL *et al.*, 1982) embora feijão fava é tolerante a altas doses de N combinado (RICHARDS & SOPER, 1979). HARDARSON *et al.* (1991), usando o método da diluição isotópica constataram que a fixação de N em feijão fava cultivado no campo diminuiu com o aumento da dose de N aplicada, decrescendo de 85%, com a aplicação de 20 kg N/ha para 75%, 60% e 43%, com 100, 200 e 400 kg N/ha, respectivamente. Concluíram ainda que altas doses de N não podem suprimir completamente a fixação de N₂ em feijão fava.

A inibição da fixação do N₂ em plantas de caupi pela aplicação de N tem também sido constatada em vários trabalhos de pesquisa (SUMMERFIELD *et al.*, 1976; MILLER *et al.*, 1982; BERVELY & JARREL, 1984; ELOWAD *et al.*, 1987).

SUMMERFIELD *et al.* (1976), com base em trabalho de casa-de-vegetação, estimaram que 25 kg/ha de N aplicado durante o enchimento das vagens seria suficiente para causar a senescência dos nódulos dentro de 5 dias.

Pesquisas conduzidas por DART & WILDON (1970), demonstraram que a nodulação e fixação do N₂ em caupi foi influenciada pelas formas e doses de nitrogênio combinado, resultando em decréscimo na nodulação com incrementos nas doses de N. Os compostos nitrogenados inibiram a nodulação na seguinte ordem: nitrato de potássio < uréia < nitrato de amônio < sulfato de amônio.

BERVELY & JARRELL (1984) observaram que a fertilização no pré-plantio incrementou a absorção de N mineral e inibiu a fixação do N₂ na fase inicial de crescimento, mas diferenças nessas medições desapareceram aos 63 DAS.

GRAHAM & SCOTT (1984), estudando os efeitos de cinco doses de N (0, 30, 60, 90 e 120 kg/ha) em caupi, verificaram que a adubação aumentou a produção de vagens, reduzindo porém a nodulação. Mais recentemente, AGBENIN *et al.* (1990) avaliando o efeito de 4 doses de N-uréia (0, 15, 30 e 60 kg/ha em 1986 e 0, 15, 30 e 45 kg/ha em 1987), verificaram que caupi var. Sampea7 respondeu positivamente, embora não significativamente, a aplicação de N até 30 kg N/ha. Os autores constataram que a aplicação de N inibiu a fixação.

2.4. Métodos de avaliação da fixação biológica do nitrogênio por leguminosas

2.4.1. Método da diferença do N-total (método Kjeldahl)

Evidentemente a determinação da quantidade do N fixado pelas leguminosas é essencial tanto para um melhor entendimento dos processos envolvidos, como para avaliar a importância da fixação biológica do nitrogênio.

Segundo TRIVELIN (1982) as primeiras constatações da fixação biológica do N₂ atmosférico ocorreram com a detecção do aumento do nitrogênio em sistemas vivos, por análise direta do N-total (método de Kjeldahl). Esse método baseia-se numa digestão "úmida" do material a ser analisado, onde o N mineral e orgânico é convertido para NH₃ na presença de ácido sulfúrico concentrado e um catalizador. Em seguida, o NH₃ é determinado por destilação ou difusão (BERGERSEN, 1980) e finalmente por titulação ou colorimetricamente (BREMNER, 1965; BERGERSEN, 1980). É um método que requer equipamento relativamente barato (SPRENT, 1979; SPRENT & SPRENT, 1990).

O método de Kjeldahl, supõe que plantas fixadoras e controles crescidas no mesmo solo sob idênticas condições, devam assimilar idênticas quantidades de N do solo e fertilizante, para que a diferença do N total seja somente atribuída a fixação (RENNIE, 1984; FONSECA, 1985; URQUIAGA & BODDEY, 1987).

Na maior parte dos trabalhos sob esta técnica refere-se a soja como planta controle onde são usadas isolinhas não nodulantes (WEBER, 1966; HERRIDGE, 1982). Com plantas de soja, a diferença do N total entre as isolinhas nodulantes e não nodulantes é atribuída a fixação do N₂ (WEBER, 1966). Segundo WEBER (1966) ambas isolinhas apresentam sistemas radiculares diferentes em condições de campo acarretando diferenças nutricionais entre elas. Isso foi constatado nos estudos realizados por DEIBERT *et al.* (1979); WAGNER & ZAPATA (1982); BODDEY *et al.* (1984).

Nos estudos com sistemas simbióticos leguminosa-*Rhizobium*, é necessário o uso de controles adequadas para o desconto do nitrogênio proveniente do solo (TRIVELIN, 1982), sendo a determinação da percentagem do nitrogênio calculada pela equação 1 (RENNIE, 1979):

$$N_{fixado}(\%) = \frac{N_{total_f} - N_{total_c}}{N_{total_f}} \times 100 \quad (1)$$

onde:

f = sistema ou planta fixadora de N₂

c = sistema ou planta não fixadora do N₂ (controle)

HERRIDGE (1982) afirma que há várias técnicas para se estudar a fixação do N_2 e que através de experimentação cuidadosamente controlada, todos os métodos fornecem estimativas justas da fixação.

Apesar de seus limites, o método Kjeldahl é muito útil para conhecer a resposta da inoculação, especialmente em laboratórios que carecem de equipamento especial para utilização de outros métodos, entretanto não pode ser utilizado para dar provas concludentes da capacidade de fixação do N de um organismo (HAMDI, 1985).

O método da "diferença do N-total" é relativamente simples e pode ser usado facilmente quando somente as análises de N-total estão disponíveis (PEOPLES *et al.*, 1988; PEOPLES & HERRIDGE, 1990). Entretanto, segundo BODDEY (1987) e PEOPLES & HERRIDGE (1990) por causa da exigência básica de que a leguminosa e planta controle utilizem quantidades equivalentes de N do solo, a escolha da planta controle é de maior importância.

Há dois princípios básicos inerentes ao uso do método da diferença do N-total (VASILAS & HAM, 1984; BODDEY, 1987; PEOPLES *et al.*, 1988):

- a) O conteúdo de N nas plantas controle não fixadora de N_2 , seja derivado somente do N do solo.
- b) As culturas leguminosa e controle assimilem a mesma quantidade de N do solo.

O ideal é que para os dois tipos de plantas (controle e leguminosa) os sistemas radiculares explorem o mesmo volume de solo, tenha a mesma habilidade para extrair o N-mineral, e acumulem o N do

solo durante o mesmo período de tempo. Mas, nem sempre isso é possível (PEOPLES & HERRIDGE, 1990; WITTY & GILLER, 1991).

Uma planta controle não fixadora de N_2 pode ser:

- a) uma não leguminosa;
- b) uma leguminosa não inoculada (exige que o solo esteja livre de *Rhizobium* nativo efetivo), ou
- c) uma leguminosa não nodulante, preferivelmente uma igual a leguminosa teste (PEOPLES & HERRIDGE, 1990). Todavia, há muitas vezes diferenças consideráveis entre as plantas fixadoras e não fixadoras nas suas capacidades de uso de N do solo, acarretando erros nos cálculos da fixação de N_2 (RENNIE, 1979; RUSCHEL *et al.*, 1979).

De acordo com LEPO & FERRENBACH (1987) medição do incremento do nitrogênio total fixado pelo método Kjeldahl em um organismo ou extrato de células livres fornece uma estimativa direta da fixação de N_2 . Entretanto, em sistemas superiores que fixam nitrogênio, tais como raízes nodulares de leguminosas, a pequena proporção do nitrogênio adicional fixado pode ser obscurecido pelo erro experimental do método. Segundo LEPO & FERRENBACH (1987) métodos tal como esse são adequados para cultura de microrganismos capazes de fixar altas taxas de N_2 .

2.4.2. Técnica da redução do acetileno

A descoberta por DILWORTH (1966) (em Nedlands - Austrália) e SCHÖLHORN & BURRIS (1966) (Wisconsin - EUA), que o acetileno inibe a redução de N_2 pela nitrogenase em extratos de *Crostridium pasteurianum*, e que o acetileno (C_2H_2) é reduzido a etileno

(C₂H₄) (produto determinado por espectrometria de massa e espectroscopia de infra-vermelho) levou HARDY & KNIGHT (1966) a sugerirem então que essa reação poderia permitir uma nova e sensível técnica para medir a atividade da nitrogenase, uma vez que o C₂H₄ poderia ser medido com rapidez e precisão em cromatógrafo gasoso. Tornou-se portanto, segundo BOTHE *et al.* (1983) uma técnica padrão para determinação da atividade da fixação do nitrogênio.

A reação química catalizada pela nitrogenase pode ser representada da seguinte maneira (LJONES, 1974):

As duas proteínas, a Fe-proteína e a Mo-Fe-proteína, são exigidas para catalizar esta reação (LJONES, 1974; EISBRENNER & EVANS, 1983; HAAKER & VEEGER, 1984; VOET & VOET, 1990).

Se a nitrogenase é exposta ao acetileno na ausência de N₂, a reação acima, segundo DANSO (1984), é substituída por:

O consumo de ATP por este sistema enzimático é independente do substrato que está sendo reduzido (HARDY & KNIGHT, 1966). É sabido que C₂H₂ inibe competitivamente a evolução de H₂ (DILWORTH, 1966; HARDY & KNIGHT, 1966; HARDY *et al.*, 1968; RIVERA-ORTIZ & BURRIS, 1975; UPCHURCH, 1987).

As pesquisas realizadas por DILWORTH (1966) e Hardy¹ *et al.* (1967) citados por HARDY *et al.* (1968), também constataram que o consumo de energia pela nitrogenase independia do substrato. Para alguns autores isso significa que a atividade da nitrogenase não se modifica quando o N_2 é substituído pelo C_2H_2 , os produtos formados é que são outros. Atualmente já se sabe que a presença do acetileno na atmosfera de incubação em um sistema fechado causa queda na atividade da nitrogenase de muitas leguminosas (MINCHIN *et al.*, 1983; WITTY *et al.*, 1984; WITTY & MINCHIN, 1988; HERNANDEZ & DREVON, 1991; HUNGRIA *et al.*, 1991). HARDY *et al.* (1968) verificaram que no final da reação não foi identificado outro produto se não o etileno, e que este último não inibe a fixação do N_2 .

KOCH & EVANS (1966) foram os primeiros a usar a técnica de redução do acetileno em nódulos de soja.

É importante que haja uma concentração de acetileno (C_2H_2) suficiente pra saturar a nitrogenase e obter a máxima atividade de redução do acetileno (ARA). Para BODDEY *et al.* (1978), uma atmosfera contendo de 100 a 150 ml/l de acetileno (10 a 15%) é usualmente suficiente para obter a máxima ARA.

Durante as décadas passadas o método da redução do acetileno tem sido significativamente importante, por causa de sua simplicidade e numerosas vantagens (UPCHURCH, 1987), e seria justo afirmar que o desenvolvimento desse método resultou num grande avanço, fornecendo muitas informações sobre fixação do nitrogênio

¹ HARDY, R.W.F.; KNIGHT, E.Jr.; JAKSON, E.K. Substrate versatility of nitrogenase. Bacteriol. Proc. p.112. 1967.

(SPRENT & SPRENT, 1990). A maior vantagem dessa técnica é sua grande sensibilidade e velocidade quando comparada com outros métodos existentes (TURNER & GIBSON, 1980; SPRENT & SPRENT, 1990). Apesar de sua rapidez e sensibilidade o método pode ser afetado por problemas operacionais e interpretativos (BODDEY, 1987; GILLER, 1987; UPCHURCH, 1987).

Tanto o acetileno como o etileno são gases. A aplicação do substrato C_2H_2 e a recuperação do produto C_2H_4 requerem somente técnicas sensíveis de manejo de gases e determinações por cromatografia gasosa (HAMDI, 1985). Teoricamente, a técnica é tão sensível que permite detectar a atividade da nitrogenase por 2 ou 3 células de azotobacter de acordo com HARDY *et al.* (1968), e é aproximadamente mil vezes mais sensível que o do $^{15}N_2$ (HARDY *et al.*, 1968; SAITO, 1978; HAMDI, 1985) e 10^6 vezes que o método Kjeldahl, podendo detectar, portanto, até $<1\mu\mu$ mole C_2H_4 /amostra (HARDY *et al.*, 1968).

Além do cromatógrafo de gás, que é um instrumento comum atualmente, os equipamentos e materiais necessários para essa técnica são, em geral, simples e não muito dispendiosos (BODDEY, *et al.*, 1990). Segundo esses autores a análise é muito rápida, e exemplificaram afirmando que a atividade de redução de acetileno (ARA) de uma leguminosa fixadora ativa pode ser facilmente determinada em menos de cinco minutos, e a análise das amostras é mais rápida ainda (entre 60 e 90 segundos) permitindo muitas determinações por dia.

Entre os inconvenientes do método temos a natureza explosiva do acetileno (HARDY *et al.*, 1968; TURNER & GIBSON, 1980) e a natureza indireta da reação, ou seja, que o acetileno não é o substrato fisiológico (HAMDI, 1985). Em condições normais há a

redução de H^+ e H_3O^+ a H_2 com gasto de energia e desvio de 40%-60% dos elétrons destinados a nitrogenase (SCHUBERT & EVANS, 1976). Essa reação ocorre simultaneamente com a redução de todos os substratos, exceto C_2H_2 , resultando em uma superestimativa do nitrogênio fixado, em altas relações $C_2H_2:N_2$ (HARDY *et al.*, 1973).

Levando em consideração o número de elétrons (e^-) necessários para redução de N_2 e de C_2H_2 deduz-se que quando a enzima nitrogenase realiza a redução do C_2H_2 a C_2H_4 há um gasto de $2e^-$, e na redução do N_2 a NH_4 há um gasto de $6e^-$. Em quase todos os estudos, a proporção entre o acetileno e o nitrogênio reduzido indica que a redução de 3 ou 4 moles de acetileno reflete a atividade da nitrogenase capaz de reduzir 1 mol de nitrogênio (HAMDI, 1985). Já SAITO (1978); HERRIDGE (1982); TRIVELIN *et al.* (1984) afirmam que a técnica de redução do acetileno tem sido largamente empregada para determinação da fixação através da conversão teórica de 3:1 para $C_2H_2:N_2$. No entanto SAITO (1978) e PEOPLES & HERRIDGE (1990) dizem que as relações obtidas por diversos autores variam dentro da faixa de 1,5 a 8,4:1 para pastagens e leguminosas alimentícias e segundo PEOPLES & HERRIDGE (1990) de 1,6 a 4,8:1 para leguminosas arbustivas. De acordo com SAITO (1980) a conversão teórica de 3:1 não mostra a real capacidade da nitrogenase para redução de N_2 em estudos quantitativos da fixação de nitrogênio. Além do mais, como é uma medida indireta da fixação e se utiliza da propriedade bioquímica do sistema fixador de reduzir substratos alternativos há uma superestimativa dessa medida em sistemas que apresentam evolução de H_2 (SAITO, 1978).

Para alguns autores (SAITO, 1978; LIMA, 1981; HUNGRIA & NEVES, 1986; HUNGRIA & RUSCHEL, 1987) o método

da redução de acetileno deve ser reconsiderado quando se quer determinar a razão de C_2H_2 reduzido para N_2 fixado, sendo obrigatoriamente necessário incluir a medida de H_2 evoluído. O uso errado da razão de conversão pode parcialmente ter contribuído para um grande número de subestimativas assim como superestimativas da fixação reportadas na literatura mundial, usando esse método. GOH *et al.* (1978) e SAITO *et al.* (1980) constataram uma superestimação dos dados relativos a fixação de N_2 .

Desde que se observou pela primeira vez a redução do acetileno pela nitrogenase, centenas de trabalhos tem sido publicados nos quais esta técnica foi empregada. Nestes últimos anos muitos problemas associados com o uso desse método, em leguminosas, tem sido constatados (MINCHIN *et al.*, 1983; MINCHIN *et al.*, 1986; WITTY & MINCHIN, 1988; GORDON *et al.*, 1989). A ARA fornece somente uma medida instantânea da atividade da nitrogenase (PEOPLES & HERRIDGE, 1990) e as mudanças diurnas da atividade da nitrogenase na fixação associativa ou simbiótica de N_2 mostra que a ARA obtida em um dado período do dia, não pode ser extrapolada para taxas diárias de fixação (WITTY & MINCHIN, 1988). Fatores que também alteram a magnitude dos erros da ARA incluem tipo do solo, umidade do solo, variedade de planta, idade da planta, estirpe de *Rhizobium*, tratamentos com fertilizantes, temperatura e irradiação, também foram citados por WITTY & MINCHIN (1988). Além disso, tem-se os erros resultantes da recuperação incompleta dos nódulos e danos causados aos mesmos anteriormente ao teste, ou redução na atividade da nitrogenase induzida pela remoção da parte aérea da planta e/ou lavagem do sistema radicular ao removê-lo do solo.

Restrições no uso desse método para estimar a fixação do nitrogênio associado com raízes de gramíneas tem sido relatadas por BODDEY (1987); GILLER (1987) e BODDEY *et al.* (1990). Esses pesquisadores apontaram problemas relacionados aos períodos prolongados de incubação, durante os quais mudanças nos fatores, tais como, população de microrganismos e conteúdo de gás, podem ocorrer.

Anos atrás, entretanto, a importância de um sistema de fluxo contínuo foi defendido (DENILSON *et al.*, 1983; MINCHIN *et al.*, 1983) onde a concentração do etileno nas saídas dos recipientes representou a taxa de redução do acetileno. MINCHIN *et al.* (1983) observaram que nas raízes com nódulos fixos e nódulos destacados de muitas espécies de leguminosas (inclusive caupi e feijão) tem revelado que a atividade da nitrogenase diminui rapidamente na presença de 10% de acetileno, com uma simultânea redução na respiração (produção de CO_2). Um similar declínio na evolução de H_2 e respiração foi observado quando o N_2 foi substituído por argônio (MINCHIN *et al.*, 1983; LAYZELL *et al.*, 1984; MINCHIN *et al.*, 1984) ou hélio (MINCHIN *et al.*, 1983). A queda na atividade da nitrogenase provém da falta de N_2 na atmosfera, ou da inibição da redução de N_2 pelo C_2H_2 e possivelmente está ligada a suspensão da produção de amônia (MINCHIN *et al.*, 1983). Isso causaria segundo WITTY *et al.* (1984) um incremento na resistência dos nódulos à difusão gasosa (oxigênio) para os bacteróides inibindo a atividade da nitrogenase. O mecanismo que permite essa inibição não foi esclarecido até agora (BODDEY *et al.*, 1990; VESSEY & WATERER (1992).

Antes de haver um declínio gradativo na atividade da nitrogenase (até aproximadamente 30 minutos) induzido pelo etileno, a

taxa máxima de produção de etileno que só leva uns poucos minutos, somente pode ser estimada usando-se um sistema de fluxo contínuo (MINCHIN *et al.*, 1983; WITTY & MINCHIN, 1988).

MINCHIN *et al.* (1986) utilizando fluxo contínuo mostraram que tanto a decaptação quanto a remoção das plantas do meio provocam decréscimos substanciais na atividade da nitrogenase e reafirmam que a aplicação da técnica de redução do acetileno requer o uso de plantas intactas em um sistema de fluxo contínuo. WITTY & MINCHIN (1988) propuseram que esse sistema poderia ser modificado para uso no campo. Antes porém DENILSON *et al.* (1983) empregando *in situ* câmaras radiculares em plantas de soja, observaram a mesma limitação inerente ao método da ARA, qual seja, a difícil estimativa de taxas absolutas de fixação de N_2 no campo. A restrição imposta para o crescimento por tais recipientes, pode alterar a morfologia das plantas (principalmente a radicular) que foram escolhidas à crescer continuamente dentro delas (DENILSON *et al.*, 1983). WITTY & MINCHIN (1988) comentam que a alternativa de pressionar o cilindro de teste dentro do solo em torno das plantas pode resultar em podaço lateral das raízes e compactação do solo.

Equipamento com sistema de fluxo contínuo, igualmente, foi desenvolvido por McNEILL *et al.* (1989) e transferido para uso com leguminosas não perturbadas crescidas no campo. Segundo esses autores os resultados contraditórios obtidos para a atividade da nitrogenase nas condições do citado experimento, devem ser tratados com precaução e concluem afirmando a necessidade de desenvolver futuros trabalhos envolvendo esse sistema em condições de campo, com objetivo de aprimorá-lo.

De acordo com GORDON *et al.* (1989), usando avaliação de fluxo contínuo, dificuldades tem sido encontradas em relação ao acetileno reduzido para o nitrogênio fixado. Concluíram que os dados forneceram evidências de que o método de redução do acetileno não pode fornecer dados precisos assim como uma indicação da fixação de N_2 pelos nódulos radiculares.

BODDEY *et al.* (1990) afirmam como é exatamente difícil atender as exigências do sistema de fluxo contínuo, ainda em condições de casa de vegetação e sendo impossível no campo, a utilização da técnica torna-se quase inútil para estimação da fixação biológica do N_2 com leguminosas.

SPRENT & SPRENT (1990) corroborando com outros autores, afirmaram que grandes precauções devem ser exercidas no uso de métodos de redução do acetileno, particularmente para leguminosas noduladas. Por esses motivos a presente revisão limitou-se em não citar estimativas da fixação baseadas no método de redução do acetileno.

Segundo BARRAQUIO *et al.* (1986) e SPRENT & SPRENT (1990) a técnica de redução do acetileno na sua mais simplista forma, continuará a ser útil para estudos qualitativos para determinar o potencial da atividade de fixação de N_2 em diferentes amostras ou variedades de plantas. Portanto, a redução de C_2H_2 a C_2H_4 , somente identifica se a nitrogenase está presente ou não no sistema em particular, e apenas experimentos com ^{15}N são capazes de demonstrar mais precisamente se a cultura é beneficiada pela fixação simbiótica e/ou associativa distinguindo o N derivado do solo, do fertilizante e da atmosfera.

2.4.3. Técnicas isotópicas para quantificação da fixação do nitrogênio

O nitrogênio tem oito isótopos, cuja massa atômica varia de 12 a 19 (Tabela 2) (WALKER *et al.*, 1977). Destes, o ^{14}N e ^{15}N são isótopos estáveis enquanto que o restante são radioativos (AXMANN & ZAPATA, 1990).

A descoberta do isótopo estável (ou pesado) ^{15}N há aproximadamente 62 anos (NAUDÉ, 1930) abriu caminho para estudos agronômicos utilizando esse elemento como traçador especialmente em pesquisas agrícolas. O método para a concentração do ^{15}N por reação química de troca entre o gás amônia e solução de sulfato de amônio foi relatado por UREY *et al.* (1937). Logo depois o ^{15}N foi usado para pesquisas sobre metabolismo animal (SCHOENHEIMER *et al.*, 1938) e para metabolismo de planta de trigo-sarracenô (VICKERY *et al.*, 1939).

O nitrogênio atmosférico é composto por duas formas estáveis de isótopo de N, onde a razão de 99,6337% dos átomos são ^{14}N (JUNC & SVEC, 1958) e 0,3663% é ^{15}N (JUNC & SVEC, 1958; MARIOTTI, 1983; FOCHT & POTH, 1987; WEAVER, 1988) ocorrendo numa razão quase constante de 272:1 átomos (0,3663 átomos % de ^{15}N ou 3.663 ppm de ^{15}N) (RENNIE *et al.*, 1978; TRIVELIN & BOARETTO, no prelo). No solo e nas plantas podem haver pequenas variações dessas proporções (FIORE, 1989). O grau de enriquecimento é geralmente expresso em porcentagem de átomos de ^{15}N em excesso sendo obtido, subtraindo-se a abundância natural (0,3663%) do valor encontrado na amostra (HARDARSON & DANSO, 1990).

Tabela 2. Isótopos de nitrogênio

Massa atômica	Abundância natural*	Meia vida**
	-----%-----	
12	-	0,011 s
13	-	9,97 min
14	99,6337	-
15	0,3663	-
16	-	7,10 s
17	-	4,17 s
18	-	0,63 s
19	-	0,42 s

* JUNC & SVEC (1958)

**Meia vida em segundos (s); dados compilados de WALKER *et al.* (1977)

O uso do isótopo ^{15}N permite que produtos da fixação de N_2 sejam identificados dentro do N-total das plantas, através da derivação da proporção $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nos tecidos das plantas acima da abundância natural (FIORE, 1989; HARDARSON & DANSO, 1990).

A literatura sobre o uso de ^{15}N em estudos agronômicos é muito volumosa envolvendo estudos sobre absorção e utilização de N-fertilizante pelas culturas, fixação simbiótica e não simbiótica de N, mineralização e nitrificação de N, nitrificação e imobilização de N, bem como o balanço completo de N nas plantas.

Através de processos físicos ou físico-químicos laboratoriais (BENDASSOLI *et al.*, 1988a, 1988b) altera-se a concentração do isótopo menos abundante na natureza, o ^{15}N , em relação

a sua concentração natural (0,3663%), para mais, tendo-se então como produto um material enriquecido em ^{15}N . Deste processo resulta também o produto com a concentração menor do que a natural, e diz-se que o material é empobrecido em ^{15}N (MURAOKA, 1991).

Depois da constatação da ocorrência dos isótopos estáveis de N, ^{14}N e ^{15}N , BURRIS & MILLER (1941) foram os primeiros a indicarem a aplicação do ^{15}N como marcador para auxiliar os estudos do mecanismo da fixação biológica do nitrogênio. Os mesmos autores em seu estudo com *Azotobacter vinelandii* (fixador-livre de nitrogênio) assinalaram que, a utilização do $^{15}\text{N}_2$ confirmaria e poderia auxiliar nas descobertas de muitos organismos fixadores, além de viabilizar a avaliação da fixação do N_2 atmosférico, por microrganismos simbióticos de plantas ou microrganismos de vida livre. Pouco tempo depois BURRIS *et al.* (1943), em uma pesquisa utilizando o $^{15}\text{N}_2$ em caupi, ervilha e soja, demonstraram que a fixação nessas leguminosas ocorria nos nódulos radiculares e o nitrogênio fixado era transferido para outras partes das plantas.

Existem basicamente duas formas para uso de isótopos para quantificar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas: uso de atmosfera com o gás N_2 enriquecido com ^{15}N (método direto) (BURRIS & WILSON, 1957) e marcação do N do solo com ^{15}N (método indireto) (AMARGER *et al.*, 1979).

Segundo BURRIS (1974) é fundamental usar o isótopo de ^{15}N na forma gasosa para determinação da FBN, e que constitui um método absoluto de alta sensibilidade, não estando sujeito a quaisquer fatores de correção, servindo como padrão para avaliar outros métodos da fixação do N_2 como por exemplo a redução do acetileno.

O método consiste em expor os sistemas fixadores (nódulos radiculares) à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, por um período de tempo determinado em câmaras adaptadas para permitir adição e remoção do gás (HAUCK & BREMNER, 1976; VOSE *et al.*, 1981). Os únicos pré-requisitos para utilização dessa técnica é que o N_2 marcado esteja totalmente puro e que o enriquecimento dos tecidos das plantas seja suficientemente alto para que não possa ser confundido com a abundância natural (BODDEY, 1987; FIORE, 1989). Uma desvantagem que se apresenta como fator limitante no uso de atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$ na medida da FBN, segundo BURRIS (1974) e TRIVELIN & BOARETTO (no prelo) é o custo do isótopo, pois geralmente trabalha-se com altos enriquecimentos de ^{15}N . De acordo com SPRENT & SPRENT (1990), devido ao alto custo do $^{15}\text{N}_2$ só uma parte do gás (10% N_2) é geralmente usada e é admitido 70% de um gás inerte (geralmente Argônio-A ou às vezes Hélio-He), oxigênio e dióxido de carbono (na quantidade desejada) balanceando o conteúdo da mistura de gases. Acrescentam esses autores que o tempo mínimo de incubação normalmente usado é de 1 h.

Se a planta inteira for exposta a uma atmosfera de $^{15}\text{N}_2$ por muito tempo pode surgir problemas, segundo BODDEY (1987) e FIORE (1989), devido a necessidade do conteúdo de O_2 , CO_2 , transpiração, intensidade e qualidade de luz e temperatura para manter uma fotossíntese normal.

Algumas câmaras para estudar a FBN com $^{15}\text{N}_2$ foram descritas por WITTY & DAY (1978) e YOSHIDA & YONEYAMA (1980), no entanto, mesmo nessas câmaras não tem sido possível crescer plantas desde a semente até a maturação em atmosfera marcada.

YOSHIDA & YONEYAMA (1980) usaram esta técnica e constataram grande vazamento de gases diminuindo consideravelmente a concentração de $^{15}\text{N}_2$ durante o experimento.

Se somente as raízes das plantas são expostas ao $^{15}\text{N}_2$, o equipamento necessário para os estudos no campo, torna-se menos difícil de ser confeccionado (TRIVELIN, 1982).

TRIVELIN (1982) em trabalho conduzido em vasos marcou a atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento em testes de fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico em plantas de feijão (do 19º ao 67º dia após o plantio-DAP) e soja (24º ao 70º DAP), ou seja em praticamente quase todo o ciclo das culturas, obteve respectivamente: 80 mg de N/planta (65% do N-total/planta) e 265 mg de N/planta (71% do N-total/planta). O mesmo autor concluiu que a marcação da atmosfera com $^{15}\text{N}_2$ não influenciou no desenvolvimento das leguminosas.

Outras pesquisas com marcação da atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$ em estudos da fixação do dinitrogênio foram realizadas com feijão (RUSCHEL *et al.*, 1979; MONTANGE *et al.*, 1981; DUBOIS & BURRIS, 1986) e caupi (DOUGLAS & WEAVER, 1986; DOUGLAS & WEAVER, 1989).

As limitações na utilização de atmosferas marcadas com $^{15}\text{N}_2$ em estudos da FBN, principalmente em condições de campo, podem ser superadas se a fixação de N_2 for determinada indiretamente através da técnica por diluição isotópica, marcando-se o nitrogênio do solo.

O método da marcação do solo com ^{15}N ao invés de marcar o dinitrogênio atmosférico, permite quantificar separadamente qualquer contribuição da fixação biológica de N_2 em leguminosas cultivadas em condições de campo (RENNIE, 1982; FRIED *et al.*, 1983)

e em experimentos de vaso (BODDEY *et al.*, 1983; RENNIE & RENNIE, 1983).

O material vegetal marcado com ^{15}N vem sendo determinado por espectrometria de massa (AXMANN, 1990; BARRIE, 1991), espectrometria de emissão ótica (PRESTON, 1991) e espectrometria nuclear de ressonância magnética (MARTIN, 1985; ROBERTS, 1987).

2.4.3.1. Determinação da fixação do N_2 atmosférico marcando-se o nitrogênio do solo

Para calcular o N_2 fixado usando a técnica da diluição isotópica marcando-se o nitrogênio do solo, é usada a seguinte equação, primeiramente descrita por McAULIFFE *et al.* (1958):

$$\%N \text{ Proveniente da fixacao} (\%N_{\text{fix}}) = \left(1 - \frac{\text{Átomos} \%^{15}\text{N}_{\text{excesso na leguminosa}}}{\text{Átomos} \%^{15}\text{N}_{\text{excesso na planta controle}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Desde que essa técnica foi aplicada em plantas de trevo por McAULIFFE (1958), vem sendo extensivamente usada para quantificar a contribuição do N_2 atmosférico à nutrição de leguminosas.

De acordo com o princípio da diluição isotópica as culturas fixadoras e controle recebendo no mesmo solo e sob mesma taxa de N-fertilizante, com igual enriquecimento em ^{15}N , absorveriam a

mesma proporção de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do solo (N-fertilizante + N-nativo do solo) (FRIED & MIDDELBOE, 1977; BROADBENT *et al.*, 1982; RENNIE & RENNIE, 1983; WATANABE *et al.*, 1990) mas não necessariamente a mesma quantidade de N (FRIED & MIDDELBOE, 1977; DANSO, 1984).

Nos estudos de traçadores isotópicos de N, o sistema sob estudo (fixadora e controle) é suprido com materiais com proporções de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ apreciavelmente diferentes da abundância natural de ^{15}N . Outrossim, ao tomar uma amostra do sistema que se estuda é essencial que a relação de isótopos de nitrogênio seja também marcadamente diferente da abundância natural de ^{15}N . Por exemplo, no caso de plantas fixadoras e controles a absorção do fertilizante enriquecido com ^{15}N que se adicionou ao solo resultará na relação de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ maior do que 0,3663% dentro das plantas. O aumento da razão isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) das plantas em relação a abundância natural é um reflexo do grau de absorção do fertilizante marcado com ^{15}N , enquanto que a diminuição do átomos % de ^{15}N em excesso no nitrogênio do fertilizante (diminuição da relação $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) é uma indicação da magnitude em que as plantas absorveram o N das fontes disponíveis não marcadas do solo. Todavia, na presença de N_2 , a planta fixadora diminui ainda mais a relação isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) devido a incorporação do N procedente do ar não marcado, enquanto que isto não ocorre na planta não fixadora (controle) (HARDARSON & DANSO, 1990). Portanto o decréscimo da razão de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na cultura fixadora (leguminosa) com relação a cultura controle dá indicação da fixação do N_2 e pode ser usada para estimar o N-fixado pela planta fixadora (DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990), (ver Figura 1).

Figura 1. Representação dos princípios envolvidos nas técnicas de ^{15}N para determinar a fixação de N_2 (PEOPLES *et al.*, 1988).

FRIED & MIDDELBOE (1977) mostraram que a fixação do N_2 em leguminosas poderia ser quantificada através da expressão 2 quando o fertilizante nitrogenado com igual marcação de ^{15}N fosse aplicado nas culturas leguminosa e controle.

A quantificação da fixação de N_2 por diluição isotópica requer uma planta controle não fixadora apropriadamente para que a contribuição do N do solo e/ou do fertilizante na planta fixadora, possa ser determinada (RENNIE, 1982). Portanto, uma condição básica deve ser satisfeita, segundo FRIED & MIDDELBOE (1977) e TRIVELIN & BOARETTO (no prelo), que as culturas (fixadora e controle) absorvam quantidades de nitrogênio do solo e fertilizante- ^{15}N em mesma proporção,

ou seja: $(NPPS/NPPF)_{\text{leguminosa fixadora}} = (NPPS/NPPF)_{\text{controle}}$. Para que essa condição seja assegurada os sistemas radiculares de ambas as culturas devem ser o mais idênticos possíveis (FOCHT & POTH, 1987). Isso porém nem sempre acontece (Figura 2) porque os padrões de crescimento

Figura 2. Representação de quatro situações hipotéticas que podem ocorrer durante a experimentação com ^{15}N no campo (Peoples¹ *et al.*, 1989, citados por PEOPLES & HERRIDGE, 1990).

e enraizamento das plantas controle são mudadas por variações do solo e ambientais, e divergem daquelas das plantas fixadoras (WATANABE,

¹PEOPLES, M.B.; FAIZAR, A.W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. (ed.). Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. p. 76. Monograph nº 11, ACIAR, Canberra. 1989.

1991). O desvio do cumprimento do princípio básico causa um erro na estimativa do N derivado da atmosfera (CHALK, 1985). Virtualmente quase todos os problemas e discussões associados com a aplicação da técnica isotópica resulta da necessidade de verificar que a condição básica acima é válida (CHALK, 1985; BODDEY, 1987).

A exatidão e precisão do método de diluição isotópica depende portanto, em grande parte, da seleção de uma cultura referência não fixadora adequada (DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990). A cultura referência, constitui a principal fonte de erro na técnica de ^{15}N para determinação da fixação de N_2 em experimentos de campo (FRIED *et al.*, 1983). Ainda assim, é o único método que permite distinguir no nitrogênio total da planta, as contribuições do N proveniente do solo, do fertilizante e da atmosfera (DANSO, 1986).

Para a soja, o uso de uma isolinha não nodulante tem permitido inúmeros estudos, porém, são ainda desconhecidas plantas de caupi não fixadoras (ELHASSAN & FOCHT, 1986; ELOWAD *et al.*, 1987; FOCHT & POTH, 1987). Plantas de caupi são sempre noduladas no solo, presumivelmente porque os seus rizóbios são ubíquos e também porque caupi é menos hospedeiro específico do que soja (ELHASSAN & FOCHT, 1986). Segundo FOCHT & POTH (1987) nos casos onde isolinhas não nodulantes não são conhecidas, uma planta não nodulante pode ser usada no lugar para estimar a quantidade de N_2 fixado pelos métodos isotópicos.

Atualmente já se conhece uma isolinha de feijão não nodulante: cv. CIAT-125 (TSAI, 1992, comunicação pessoal¹). Todavia,

¹TSAI, S.M. (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, Piracicaba, SP). Comunicação pessoal, 1992.

é sabido que nem todos os sistemas radiculares de genótipos de feijão e seus padrões de distribuição no solo são semelhantes, e isso foi observado por KURUVADI & AGUILERA (1990) ao estudarem 20 cultivares de feijão nas profundidades de 0-20, 21-40, 41-60, 61-80 e 81-100 cm.

Alguns autores têm sugerido que as duas culturas (controle e teste) podem conseguir diferentes enriquecimentos do seu nitrogênio derivado do solo se houver gradiente de ^{15}N com a profundidade (EDMEADES & GOH, 1979; VOSE & VICTORIA, 1986). As Figuras 2a-c ilustram três possíveis situações das leguminosas e plantas controle que estão provavelmente a ocorrer em experimentos no campo usando o enriquecimento de ^{15}N . A Figura 2d ilustra uma condição de abundância natural (sem marcação com N enriquecido) onde a composição de ^{15}N do N do solo disponível a planta é relativamente uniforme no perfil do solo.

Quando o fertilizante inorgânico solúvel marcado com ^{15}N é adicionado a superfície do solo, o enriquecimento de ^{15}N do solo mostra um decréscimo considerável com a profundidade (PEOPLES & HERRIDGE, 1990). Isto não só ocorre com o N enriquecido do solo, mas também com o nitrogênio mineral disponível do solo (BODDEY, 1987).

Na Figura 2a as raízes da leguminosa exploram um volume de solo maior, atingindo a região não enriquecida artificialmente com ^{15}N , enquanto que as raízes da planta controle restringem-se a zona de maior enriquecimento. A absorção de N do solo pela leguminosa de uma região não enriquecida, quando se compara a composição de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ da leguminosa e controle, conduziria a uma superestimação da fixação

de N_2 (VOSE & VICTORIA, 1986; PEOPLES & HERRIDGE, 1990). Na situação contrária (Figura 2b), onde as raízes da planta controle cresceram abaixo da zona enriquecida em ^{15}N , a absorção do N do solo não enriquecido resultaria em uma diminuição no conteúdo de ^{15}N no material vegetal e conduziria a uma subestimação da fixação pela leguminosa (VOSE & VICTORIA, 1986; PEOPLES & HERRIDGE, 1990).

Na situação ideal (Figura 2c), onde as raízes das plantas leguminosa e controle exploram um similar volume de solo e de enriquecimento em ^{15}N , determinações precisas de fixação simbiótica de N_2 podem ser esperadas (VOSE & VICTORIA, 1986). Entretanto, futuros erros poderão acontecer se houver um declínio com o tempo na proporção de $^{15}N/^{14}N$ resultante de uma perda do ^{15}N disponível a planta devido a absorção, lixiviação ou imobilização e a continuada liberação do ^{14}N dos compostos nitrogenados via mineralização da matéria orgânica do solo.

Segundo TRIVELIN (1982); VOSE & VICTORIA (1986); MURAOKA (1991) nos experimentos em que plantas fixadoras e não fixadoras são crescidas em vasos, onde geralmente ocorrem boa distribuição de ^{15}N e raízes explorando um mesmo volume de solo, podem haver boas estimativas da fixação do N_2 pelo método da diluição isotópica do ^{15}N .

Para testar o princípio fundamental do método da diluição isotópica, WAGNER ZAPATA (1982) postularam que se a proporção enxofre-S marcado com ^{35}S para o S não marcado das culturas testes e controles fossem iguais, a proporção de N marcado com ^{15}N para o N não marcado também seria igual. Assim, conduziram experimentos

marcando-se o solo com $(^{15}\text{NH}_4)_2^{35}\text{SO}_4$ e utilizando plantas inoculadas de feijão fava (*Vicia faba*) e soja (*Glycine max* L. Merr.). Doses maiores de N foram aplicadas as culturas controles (cevada, grama Sudão, rabanete-de-óleo e soja não nodulante) e usou-se os cálculos do valor-A para estimar a FBN e comparar a disponibilidade de S para as plantas testes e controles. Concluíram que todas as controles mostraram valores satisfatórios de fixação com um erro de estimativas menor do que 10%. Em seus experimentos com feijão fava os Valores-A do solo na colheita final foram de 434, 490 e 705 kg N/ha para rabanete-de-óleo, cevada e grama Sudão, respectivamente. Isto fornece estimativas de fixação para feijão fava de 144, 139 e 125 kg N/ha. Os dados de estimativas da fixação da soja variou na primeira colheita de 4 a 27 kg N/ha e na segunda colheita de 40 a 59 kg N/ha dependendo da controle usada. WAGNER & ZAPATA (1982) também mostraram que em ambos experimentos o rabanete-de-óleo acumulou uma menor proporção de S marcado para não marcado (alto Valor A) do que as outras controles e a proporção do valor-A de N para valor-A de S de feijão fava foi muito diferente de todas as outras controles. Isto sugeriu que igualdade de enriquecimento de ^{15}N no N derivado do solo das culturas fixadoras e controle não necessariamente poderia ser indicado pela igualdade do Valor-A de enxofre nas culturas.

As duas maneiras para determinar o N_2 fixado, quando se usa fertilizantes enriquecidos com ^{15}N , são os métodos da diluição isotópica e o Valor-A (FRIED, 1985; HARDARSON & DANSO, 1990). Embora diferentes equações tenham sido usadas para cada método (FRIED & BROESHART, 1975; FRIED & MIDDELBOE, 1977)

conceituadamente e matematicamente ambos são similares (Danso¹ *et al.*, 1986, citados por HARDARSON *et al.*, 1991). Os métodos diferem somente se a mesma quantidade de fertilizante marcado com ^{15}N for aplicado para a cultura fixadora e não fixadora (método de diluição isotópica) ou se diferentes doses de N são aplicadas entre as culturas fixadoras e controles (método Valor-A) (HARDARSON *et al.*, 1991).

HARDARSON *et al.* (1991) usaram os métodos da diluição isotópica e Valor-A para determinar a fixação biológica do nitrogênio em feijão fava crescidos em condições de campo, com diferentes doses de N. Os dois métodos mostraram valores similares de percentagem de nitrogênio derivado da atmosfera. Idealizaram então uma equação para os dois métodos, para evitar a necessidade de calculos diferentes para o método isotópico de ^{15}N , e mostraram mais uma vez que a diluição isotópica e Valor A são métodos matematicamente e conceituadamente idênticos.

Nas pesquisas com isótopo ^{15}N deve-se ter algumas precauções para que não haja violação dos princípios básicos e exigências inerentes ao método (WITTY & GILLER, 1991). A seguir são relacionados alguns desses cuidados.

a) Na cultura referência (controle) não deve haver fixação do nitrogênio atmosférico (FRIED *et al.*, 1983; DANSO, 1984, 1988; PEOPLES & HERRIDGE, 1990). Se necessário a técnica de redução do acetileno

¹DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G.; ZAPATA, F. Assessment of dinitrogen fixation potentials of forage legumes with ^{15}N technique. In: HAQUE, I.; JUTZI, M.; NEATE, P.J.H. (ed.). Potentials of forage legumes in farming systems of sub-Saharan Africa. p.26-57. 1986. ILCA, Ethiopia.

(HARDY *et al.*, 1968) pode ser útil para comprovar a presença ou ausência da atividade da fixação do N_2 .

b) Os períodos de crescimento ou estádios fisiológicos das plantas fixadoras de N_2 e não fixadoras devem ser análogos e ter uma fase de maturação aproximadamente ao mesmo tempo (RENNIE, 1982; HARDARSON & DANSO, 1990).

c) A profundidade radicular das culturas controle e fixadora devem ser similares, ou ambas as culturas devem explorar o mesmo volume de solo (BODDEY *et al.*, 1983; DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990).

d) A dose de nitrogênio aplicado a cultura leguminosa não deve inibir a fixação de N_2 (BODDEY, *et al.*, 1983; VOSE & VICTORIA, 1986).

e) O fertilizante- ^{15}N deve ser aplicado apropriadamente a fim de que as plantas fixadora e controle tenham iguais acessos (TALBOTT *et al.*, 1982; VOSE & VICTORIA, 1986; DANSO, 1988).

f) Durante o período de crescimento, ambas as culturas deverão ser afetadas igualmente pelas mudanças nas condições ambientais (DANSO, 1984) tais como temperatura e água.

g) Desde que a proporção $^{15}N/^{14}N$ de um solo no qual o fertilizante enriquecido- ^{15}N tenha sido aplicado tenha mostrado declinar severamente com o tempo (especialmente durante os períodos iniciais após a aplicação de ^{15}N) (PEOPLES & HERRIDGE, 1990), é essencial que ambas as culturas absorvam similares proporções $^{15}N/^{14}N$ durante a totalidade do período de crescimento da cultura fixadora, caso contrário a proporção de $^{15}N/^{14}N$ do solo avaliado na cultura referência poderia diferir daquela da cultura fixadora (DANSO, 1988). Isto significa que ambas as culturas (fixadora e controle) devem ser semeadas e colhidas ao mesmo tempo

(BODDEY *et al.*, 1983; BODDEY, 1987; DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990).

h) Não deve haver discriminação isotópica significativa nas diferentes partes das plantas, especialmente na controle (VOSE *et al.*, 1981; VOSE & VICTORIA, 1986).

i) A inoculação das plantas fixadoras não deve alterar essencialmente seu sistema radicular e hábito de crescimento (VOSE & VICTORIA, 1986).

j) Em experimentos de campo a área do solo que vai ser aplicado o nitrogênio marcado com ^{15}N deve ser maior do que a área colhida para evitar a possibilidade de exploração diferencial da borda da área não marcada pelas culturas controle e fixadora (BODDEY, 1987).

Algumas vantagens são consideradas no procedimento da diluição isotópica do ^{15}N :

a) pode mostrar um valor preciso (embora não exato) para a fixação do N_2 em condições de campo e de casa de vegetação.

b) Fornece uma medição integrada da quantidade de N fixado acumulado por uma cultura durante a época de crescimento (DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990).

c) É possível determinar efeitos sinérgicos ou depressivo do N-fertilizante sobre a fixação de N_2 a partir da absorção do N do solo ou fertilizante (DANSO, 1986).

d) É o único método que permite avaliar as contribuições para os diferentes órgãos da planta ou para a planta inteira do nitrogênio do solo, fertilizante e nitrogênio atmosférico (VOSE & VICTORIA, 1986; HARDARSON & DANSO, 1990).

e) Pode ser usado na maior parte dos ensaios agronômicos ou em programas de melhoramentos de plantas (St CLAIR *et al.*, 1988;

PEREIRA *et al.*, 1989; St CLAIR & BLISS, 1991; WOLYN *et al.*, 1991) que tem por objetivo melhorar a capacidade de fixação de N_2 de algumas leguminosas alimentícias. Segundo DANSO (1986, 1988) essas avaliações podem ser feitas por simples comparação dos átomos % de ^{15}N em excesso dentro de tratamentos ou entre genótipos, sem qualquer necessidade de uma cultura referência.

DANSO (1986) relatou que as idéias errôneas e os inevitáveis problemas práticos associados a técnica do ^{15}N não podem ser admitidos para obscurecerem as inúmeras reais vantagens do método da diluição isotópica do ^{15}N . WATANABE (1991) criticou o trabalho de CHALK (1985) e afirmou que ao invés de apontar dificuldades é mais construtivo desenvolver e sugerir maneiras para resolver os possíveis erros inerentes ao método. Entretanto, isso vem sendo feito por CHALK e colaboradores (HAMILTON *et al.*, 1991, 1992).

Segundo WITTY & GILLER (1991) tais erros podem somente ser detectados pelas irregularidades entre as estimativas feitas de várias maneiras, por exemplo usando diferentes plantas referências, ou diretamente por considerações teóricas e modelos matemáticos. Os erros, tais como, aqueles devido a distribuição irregular do N do solo ou fertilizante pode ser percebido pelos altos coeficientes de variação.

Alguns estudos com ^{15}N , visando determinar a fixação biológica do N_2 por leguminosas pelo método da diluição isotópica, foram realizados por vários pesquisadores tanto a nível de campo ou em vasos em casa de vegetação, com culturas de interesse como: caupi, feijão, soja, feijão-fava, e outras.

O método da diluição isotópica é adequado para experimentos de medida da fixação biológica de N em condições de

campo e em experimentos de vaso. FIORE (1989) e TRIVELIN & BOARETTO (no prelo) afirmam no entanto que apesar de ser uma importante ferramenta para estudos da FBN, o uso de compostos enriquecidos em ^{15}N tem uso restrito devido a disponibilidade limitada do material, altos custos, dificuldades instrumentais e custos analíticos, além da sua aplicação em condições de campo ficar limitada a microparcelas.

BARTHOLOMEW *et al.* (1950), conduzindo experimento utilizando o isótopo ^{15}N como traçador, trabalhou com aveia adubada em diferentes doses de N na forma de sulfato de amônio, e observaram que o nitrogênio proveniente do fertilizante alcançou de 4,7 a 17,9% do total de N na planta, e a eficiência de recuperação do fertilizante foi da ordem de 11,0 a 29,3%.

NEPTUNE & MURAOKA (1978) estudando diferentes doses de uréia ^{15}N , em feijoeiro cultivar Carioca, aplicado na semeadura e em diferentes estádios de desenvolvimento, encontraram uma eficiência de utilização do fertilizante (EUF %) que variou entre 11,24% e 35,70%, sendo que o feijoeiro aproveitou melhor o fertilizante nitrogenado fornecido antes ou durante o florescimento do que na semeadura.

MEIRELLES *et al.* (1980) usando sulfato de amônio (100 kg N/ha) marcado com ^{15}N , com feijoeiro cultivar Rosinha, mostraram que a absorção máxima de N pela planta ocorreu aos 60 dias após a germinação, mas a máxima eficiência de utilização do fertilizante (30%) ocorreu aos 45 dias após a germinação, sugerindo que, após estes dias, não é conveniente a aplicação de N.

Uréia marcada com ^{15}N foi aplicada ao solo, e seu destino foi estudado por LIBARDI *et al.* (1982), durante três cultivos

sucessivos de feijão. Os resultados mostraram que 31,2% do N do primeiro cultivo são provenientes do fertilizante, o que representou uma eficiência de utilização (EUF) de 38,5%. Para o segundo e terceiro cultivos as porcentagens do N na planta, proveniente do fertilizante aplicado ao primeiro cultivo, foram de 6,2 e 1,4%, correspondendo a EUF de 4,6 e 1,2%, respectivamente, dando uma EUF total de 44,3% do N aplicado ao primeiro cultivo.

Os dados publicados usando técnicas isotópicas para quantificar a fixação do N_2 no campo têm mostrado que algumas cultivares de feijão podem obter aproximadamente 50% do seu N-total da fixação e pode fornecer até 100 kg de N fixado/ha por ano (RENNIE & KEMP, 1983). RUSCHEL *et al.* (1982) estimaram a fixação em condições de campo de cinco cultivares de feijão, usando o método do ^{15}N e como planta controle o trigo anão, constataram que as quantidades de N-fixado variaram entre 24,59 kg de N/ha no cv. Goiano precoce (de 60 dias) a 64,91 kg de N/ha no cv. Carioca (de 90 dias). A percentagem de N-fixado foi de 57-68% para os cultivares de 90 dias e de 37% para Goiano precoce de 60 dias. A recuperação do fertilizante foi de 17-30% de uma aplicação de 20 kg N/ha.

FONSECA (1985) pesquisando em casa de vegetação a capacidade de fixação de N, através do uso de ^{15}N , em feijão cv. Carioca obteve na parte aérea valores entre 61 a 74% de fixação de N, correspondendo entre 69 e 100 mg N/planta.

Uma quantidade relativamente baixa de N disponível durante o desenvolvimento inicial da planta de feijão geralmente aumenta a nodulação e o crescimento da planta (MURAOKA, 1984; WESTERMANN *et al.*, 1985).

TSAI (1990) em estudos de campo, confirmou a necessidade de inoculação com *Rhizobium* em plantas de feijão, o qual forneceu um incremento de 62% na produção de grãos (1191 kg/ha sobre 733 kg/ha) sob baixa condição de N do solo. Observou também, que pequenas doses de N-fertilizante (10-20 kg N/ha) teve um efeito benéfico na nodulação quando incrementos da massa de nódulos e atividade dos mesmos foram observados quando comparado o controle.

SANABRIA (1990) e SANABRIA *et al.* (1991) estimaram a fixação em condições de campo de dez cultivares de feijão, usando o método do ^{15}N e como plantas controles foi utilizado trigo, milho e soja não nodulante. Segundo esses autores as diferenças de percentagem de N-fixado entre as dez cultivares não foram significativas e variou de 69-73%,

A assimilação e distribuição do N nas partes vegetativas e reprodutivas de leguminosas de grãos comestíveis são processos importantes para produções de sementes (WESTERMANN *et al.*, 1985; MURAOKA *et al.*, 1991). WESTERMANN *et al.* (1985) demonstraram em casa de vegetação que a proporção de ^{15}N em cada parte da planta de feijão dependeu do estado de desenvolvimento e da fonte de ^{15}N e foi independente do cultivar.

Estudos recentes com ^{15}N indicam que a aplicação foliar de N durante o desenvolvimento pode ser benéfico para algumas leguminosas.

Para avaliar a taxa de absorção foliar de ^{15}N -uréia aplicado em *Phaseolus vulgaris* L. e sua translocação para outras partes das plantas. Vários experimentos foram conduzidos por MURAOKA *et al.* (1991), e demonstraram que o N pulverizado foi rapidamente

absorvido através das folhas. Após 15 minutos (min), aproximadamente 18% do nitrogênio aplicado foi absorvido, atingindo 26% após 30 min e 33% após 60 min. A utilização máxima do nitrogênio aplicado foi 65%, obtido na amostragem final (quinto dia). Os autores afirmaram que sob condições ambientais normais este valor não seria obtido. MURAOKA *et al.* (1991) ainda observaram que a translocação do N ocorreu rapidamente, e que após 16 horas aproximadamente 5% do N total absorvido já havia sido translocado, aumentando para 22% no terceiro dia, 29% no quarto dia e 38% no quinto dia.

TSAI (1990) observou que quando uma dose adicional de 10 kg N/ha é pulverizado sobre as folhas de feijão antes do florescimento, a produção foi significativamente incrementada de 806 kg/ha a 1222 kg/ha em contraste a 1082 kg/ha obtido no tratamento com N adicionado ao solo.

DUBOIS & BURRIS (1986) estudaram a absorção e distribuição de $^{15}\text{NH}_4^+$, $^{15}\text{NO}_3^-$ e $^{15}\text{N}_2$ em feijão crescido em casa de vegetação com uma cultivar comercial (Sanilac) e 2 linhagens (UW 24-21, UW 24-55) aplicando ^{15}N no estágio R3 50% de floração). Verificaram que todas as 3 linhagens mostraram incrementos rápidos no teor de N de flores/frutos até estágio R3. Entretanto, a percentagem de N nesses tecidos diminuiu após o estágio R3. Observaram também que a fixação do N_2 mobilizou o N diretamente às flores/frutos sendo mais de 50% do N-fixado depositado nas flores/frutos dentro dos 5 dias depois do tratamento.

RENNIE & KEMP (1984) relataram uma média total de fixação de N_2 de 46-135 mg N/planta na maturidade fisiológica por vários cultivares de feijão (cvs. Aurora, Kentwood e Galt). Taxas de

fixação relatadas por DUBOIS & BURRIS (1986) para UW 24-21 e UW 24-55 no estágio R3 (50% da floração) de 140,6 e 142,9 mg/planta, respectivamente, mostram que as duas linhagens foram similares em atividade de fixação de N_2 àquelas dos estudos de RENNIE & KEMP (1984).

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma importante cultura alimentícia na agricultura de países tropicais e subtropicais, onde suas sementes apresentam-se como a principal fonte de proteínas. Segundo PEOPLES *et al.* (1985) essa cultura obtém o nitrogênio para o desenvolvimento das vagens de uma combinação do transporte pelo xilema e floema e a maior parte do N recém fixado é suprido pelo floema para o desenvolvimento das vagens de caupi, através da troca direta do N entre o xilema e floema e da ciclagem através de caules e folhas. Por não terem usado o N marcado em seu experimento isso não foi possível ser determinado, como também a distribuição quantitativa do N_2 fixado.

PATE *et al.* (1985) informaram que a translocação de N das raízes para as vagens de caupi diretamente pelo xilema, foi completa em minutos, enquanto o transporte pelo floema levou horas. HERRIDGE *et al.* (1978) e DOUGLAS & WEAVER (1986) demonstraram, após expor os nódulos radiculares ao $^{15}N_2$, que o N_2 biologicamente fixado foi rapidamente transferido dos nódulos e raízes para parte aérea. Então, DOUGLAS & WEAVER (1989), objetivando quantificar o N fixado que é incorporado aos tecidos vegetativos antes de ser mobilizado para vagens, colheram amostras de órgãos de plantas de caupi (cvs. Bush Purple Hull, Mississippi Silver e California Blackeye número 5) dois dias após a exposição das raízes e nódulos intactos ao

$^{15}\text{N}_2$ e comprovaram que 40 a 50% do N_2 fixado estava contido nas vagens. O N restante foi distribuído por toda porção vegetativa da planta com 30 a 40% nos ramos e folhas, indicando que muito do N recém fixado deve ciclar nestes tecidos antes de alcançar as vagens.

Os ureídeos, alantoína e ácido alantóico representam os principais compostos nitrogenados solúveis predominantemente transportados no xilema de plantas noduladas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (HERRIDGE *et al.*, 1978) e muitas outras leguminosas de origem tropical (PEOPLES & HERRIDGE, 1990).

Através dos estudos com traçadores $^{15}\text{N}_2$ e $^{14}\text{CO}_2$ HERRIDGE *et al.* (1978) constataram que os ureídeos transportados no xilema de plantas de caupi (cv. Caloona) representaram aproximadamente de 60 a 80% do N total fixado pelos nódulos radiculares, o restante sendo glutamina, asparagina e aminoácidos.

Vários estudos com ^{15}N foram empreendidos para determinar a contribuição do manejo agronômico, tais como associação com milho (EAGLESHAM *et al.*, 1981; OFORI *et al.*, 1987; KESSEL & ROSKOSKI, 1988; PATRA *et al.*, 1989), densidade de plantas (BASANTES MORALES, 1990) ou através do aumento do N disponível no solo por adubação (EAGLESHAM *et al.*, 1977; HUXLEY, 1980; EAGLESHAM *et al.*, 1982a, 1982b; LUYINDULA & WEAVER, 1989; AWONAIKE *et al.*, 1990) sobre a fixação do nitrogênio em cultivares de caupi.

Em um experimento de casa de vegetação, EAGLESHAM *et al.* (1977) verificaram que as taxas máximas de assimilação de N ocorreram durante o enchimento das vagens do cv. K2809, com os nódulos contribuindo com dez vezes mais nitrogênio do

que a dose aplicada (25 ppm). A fixação de N_2 supriu com mais de 80% do N-total da planta durante o crescimento, e contribuiu significativamente para o N das vagens. Trabalhando com o mesmo cultivar, HUXLEY (1980) observou que a origem dos 88% do nitrogênio total da semente foi do N-simbiótico e que a 40 a 50% do nitrogênio armazenado nas estruturas vegetativas moveu para sementes durante o seu desenvolvimento.

A partição do nitrogênio fixado dentro das vagens de caupi cv. Bush Purple Hull foi medido usando ^{15}N , por LUYINDULA & WEAVER (1989) em casa de vegetação. Dois tratamentos foram incluídos: 40 mg N/planta (como dose inicial) e um total de 240 mg N/planta (dividido por todo período de crescimento). Esses autores verificaram que do total de nitrogênio distribuído até as vagens, 53 e 58% foi da fixação, para o primeiro e segundo tratamento, respectivamente.

Resultados recentes obtidos por AWONAIKE (1991) em condições de campo, mostraram que as contribuições relativas de N do solo, fixação e fertilizante na variedade de caupi Ife Brown diferiu em diferentes estádios de crescimento. No estágio de crescimento vegetativo, o N-nativo do solo contribuiu com a maior parte do N acumulado (79,5%), decrescendo progressivamente a 32,3% na maturidade fisiológica. A contribuição do N_2 atmosférico incrementou de 17,5% no estágio vegetativo para 65% na maturidade fisiológica. A percentagem de contribuição do fertilizante aplicado foi menor do que 5% independente do estágio de crescimento da planta.

YONEYAMA *et al.* (1990) em estudos de campo, usando o método da abundância natural do ^{15}N , estimaram que o

nitrogênio proveniente da atmosfera em caupi (genótipo EC 6215) foi de 61%, 47% e 42% nas doses 0, 100 e 200 kg N/ha, respectivamente.

AWONAIKE *et al.* (1990) usando sulfato de amônio (20 kg N/ha) marcado com ^{15}N , e milho como planta controle, avaliaram o nitrogênio fixado na maturidade fisiológica de três variedades de caupi no campo. Os resultados mostraram que todas as variedades de caupi foram apreciavelmente influenciadas pela inoculação e os valores médios de fixação foram: 116,87 e 74 kg N/ha para Ife BPC, Ife Brown e AFB 1757, respectivamente.

2.4.4. Método da diluição isotópica do ^{15}N (DI) x método da diferença do N-total (MD)

A otimização do potencial de muitas leguminosas para fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) em diferentes condições ambientais exige metodologias adequadas para distinguir entre a contribuição deste citado processo, da absorção do nitrogênio do solo e fertilizante. A maioria dos métodos padece de sérias desvantagens e portanto não pode fornecer estimativas quantitativas exatas do N_2 fixado (DANSO, 1988).

Somente duas técnicas são adequadas para estimar a integrada fixação de N_2 , durante o período de crescimento: O método da diferença do N-total (MD) e o método baseado no princípio da diluição isotópica do ^{15}N (DI) (RENNIE, 1984). Os princípios de cada método estão descritos nos sub-ítems 2.4.1 e 2.4.3.1 desta revisão de literatura, respectivamente.

Com o objetivo de conferir a validade dos métodos para avaliar a contribuição da fixação biológica do N_2 , muitos autores

(WILLIAMS *et al.*, 1977; RENNIE, 1979; RUSCHEL *et al.*, 1979; VOSE *et al.*, 1981; BROADBENT *et al.*, 1982; TALBOTT *et al.*, 1982; BODDEY *et al.*, 1983; MARTENSSON & LJUNGGREN, 1984; RENNIE, 1984) têm comparado as estimativas obtidas pela técnica de diluição isotópica com aquelas da diferença.

RENNIE (1979) utilizou como controle na medida da fixação do N₂ em *Phaseolus vulgaris* L., plantas de feijão não inoculadas cultivadas em vasos com solo esterilizado, e concluiu que o método da diferença forneceu valores negativos do nitrogênio fixado quando comparado ao método isotópico.

A fixação do N₂ por feijão e soja calculada pelo MD comparado com estimativas por DI tem mostrado boas concordâncias nos solos pobres em N (RENNIE, 1984), ou naqueles em que a recuperação do ¹⁵N foi igual na leguminosa e planta controle (WATANABE *et al.*, 1990). Em tais condições, concordâncias das estimativas são matematicamente inevitáveis, embora não constituam em si uma confirmação de que ambas as técnicas são exatas (URQUIAGA & BODDEY, 1987).

TALBOTT *et al.* (1982) mencionaram que embora observações de campo da quantidade de N₂ fixado pela soja estimado pelo método da DI e MD foram altamente correlacionados ($r=0,89$ para o ano de 1977; $r=0,92$ para 1978) observações da percentagem de N fixado variaram entre os dois métodos ($r=0,32$ para 1977; $r=0,69$ para 1978) o qual foi atribuído a variação espacial do N disponível do solo. Concluíram que o método do ¹⁵N forneceu estimativas mais precisas para a % N fixado porque a concentração de ¹⁵N na isolinha não nodulante foi menos variável que a acumulação de N-total.

RENNIE (1984), comparando os dois métodos, observou que houve boas concordâncias entre eles em 70% dos experimentos em que se estimou quantitativamente a fixação de N_2 e em 60% quando se estimou em termo percentual. WITTY (1983) e RENNIE (1984) observaram que os dois métodos forneceram resultados similares quando a quantidade de fertilizante recuperado pelas plantas fixadoras e referência foram similares. Isso exige portanto segundo BROADBENT *et al.* (1983), que a composição isotópica do conteúdo de N disponível não mude com o tempo, ou que o padrão de absorção do N-fertilizante + N-nativo do solo da leguminosa e planta controle seja idêntico durante todo período.

WILLIAMS *et al.* (1977) alegaram que o método da diferença tem geralmente subestimado a fixação em condições de campo, comparado com o método da diluição isotópica, e segundo BOLE & RENNIE (1983) isso é devido a uma menor eficiência no uso do N-fertilizante (e provavelmente o N do solo) pela leguminosa.

AMARGER *et al.* (1979) também desenvolveram estudos comparativos entre os dois métodos e seus resultados experimentais de campo demonstraram ocorrer uma menor absorção do N do solo por plantas inoculadas de soja, dando valores subestimados para proporção do N-fixado determinado por diferença.

Em estudos com lisímetros (WILLIAMS *et al.*, 1977; RENNIE *et al.*, 1982) ou em condições de vasos (MARTENSSON & LJUNGGREN, 1984) onde as culturas leguminosa e controle exploram totalmente o conteúdo de N do solo, as concordâncias entre os dois métodos podem ser melhores, como observado por BROADBENT *et al.* (1982). Porém BODDEY *et al.* (1984) constataram que estimativas da

fixação de N_2 para soja foram geralmente maiores pelo MD do que pela DI sendo a maior absorção do N-fertilizante pelas plantas noduladas do que pelas isolinhas não nodulantes. WAGNER & ZAPATA (1982) também constataram uma maior absorção do N-fertilizante por soja nodulada em condições de campo comparado a plantas não noduladas. Segundo VOSE *et al.* (1981) e HERRIDGE (1982), se a absorção do N do solo pelas plantas noduladas for maior, a fixação do N_2 será superestimada pelo MD. HERRIDGE (1982) afirma que o potencial de assimilação de N de muitas não leguminosas não é tão alto para leguminosas, resultando também numa super estimativa da fixação de N_2 .

Práticas para minimizar a variação das estimativas pelo MD e DI em pesquisas sobre fixação de N_2 foram sugeridas por TALBOTT *et al.* (1982) e incluem: (1) a seleção de uma área no campo com distribuição uniforme de N do solo; (2) aplicação e incorporação uniforme do ^{15}N ; (3) utilização de um melhor controle local através de plantas adjacentes não fixadoras; (4) escolha de um delineamento experimental apropriado e tamanho da amostragem, e (5) bom estabelecimento das parcelas.

De acordo com CHALK (1985) o método da DI oferece grande sensibilidade comparado ao MD. Todavia, segundo o mesmo autor, na ausência de evidência de que plantas fixadoras e controle obtém a mesma proporção de N do solo e do fertilizante, não se pode assumir que a técnica de diluição isotópica forneça uma estimativa mais exata do N_2 fixado do que o método da diferença, podendo também dar estimativas negativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos para:

1. Experimento I: Avaliação da fixação simbiótica ao longo do ciclo e comparação de duas técnicas para estudos com a fixação de N_2 : diluição isotópica do ^{15}N x método da diferença.
2. Experimento II: Avaliar efeitos das doses de N do solo na fixação biológica do N_2 .

3.1. Localização e época dos experimentos

Os experimentos foram instalados e conduzidos em casa de vegetação, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Piracicaba-SP, de 05 de janeiro a 23 de março de 1990 (Experimento I) e de 19 de junho a 03 de setembro de 1990 (Experimento II).

As temperaturas máximas e mínimas, dentro e fora da casa de vegetação, durante o período de condução de ambos os experimentos podem ser vistas nas Figuras 3 e 4. As temperaturas fora da casa de vegetação foram obtidas no posto Agrometeorológico do Departamento de Física e Meteorologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (22°42'30" de latitude sul, 47°38'00" de longitude oeste e 580 m de altitude).

— POSTO METEOROLÓGICO --- CASA DE VEGETAÇÃO

— POSTO METEOROLÓGICO --- CASA DE VEGETAÇÃO

Figura 3. Variação das temperaturas máximas e mínimas, fora (Posto Agrometeorológico) e dentro da casa de vegetação durante o período de condução do experimento I.

Figura 4. Variação das temperaturas máximas e mínimas, fora (Posto Agrometeorológico) e dentro da casa de vegetação, durante o período de condução do experimento II

3.2. Solo

Foi usado nos experimentos uma amostra de terra coletada da camada de 0 a 20 cm de profundidade de um solo da área experimental da ESALQ, Fazenda Sertãozinho, Município de Piracicaba-SP, classificado como um Latossolo Vermelho Amarelo textura média.

O solo foi convenientemente seco ao ar, destorreado, misturado e passado em peneira com malha de 4 mm de abertura e depois acondicionados em vasos com capacidade para 5 kg. O fundo e as paredes dos vasos foram revestidas com plástico para que não houvesse perda de ^{15}N e outros nutrientes por lixiviação.

Algumas características químicas e físicas estão apresentadas na Tabela 3.

3.3. Calagem

A calagem foi feita baseada nos resultados da análise do solo (Tabela 3) e de acordo com os métodos para recomendação de calagem da ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS E CORRETIVOS AGRÍCOLAS (1986). O calcário dolomítico foi aplicado para os experimentos I e II 32 dias antes do plantio na dose de 5,10 g/vaso e o solo devidamente umedecidos (leia item 3.6) para mais prontamente elevar a reação do solo ao valor desejado.

Tabela 3. Resultados de algumas análises químicas e físicas do solo utilizado nos experimentos

Análise Química ¹												
pH	pH	M.O. ²	P	PO ₄ ³	K	Ca	Mg	Na	H+Al	SB ³	CTC ⁴	V ⁵
(H ₂ O)	(CaCl ₂)		(Resina)	(H ₂ SO ₄)	—	(HCl 0,05N)	—					
		%	µg/cm ³	—meq/100g terra (TFSA)—								%
5,21	4,2	2,05	6	0,046	0,049	0,93	0,24	0,037	4,3	1,3	5,6	22,6
				Zn	Cu	Mn	Fe					
				—DTPA—								
				—ppm—								
				3,4	0,6	4,2	58,0					
Análise Física ⁶												
Areia			Silte		Argila		Classe textural					
Grossa	Fina	Total										
%												
19	53	72	6		22		Média arenosa					

¹Análise química realizada no Laboratório de Fertilidade do solo - CENA/USP

²Matéria Orgânica

³Soma de Bases

⁴Capacidade de Troca Catiônica

⁵Saturação de Bases

***Análise física realizada no laboratório de Análise de Solos do Departamento de Ciência do Solo - ESALQ/USP**

3.4. Adubação

Na metade do tempo de incubação da calagem, foi feita a adubação com 100 ppm de fósforo na forma de superfosfato simples e 50 ppm de potássio, na forma de cloreto de potássio para o experimento I.

Adubou-se o experimento II com 100 ppm de fósforo na forma de superfosfato simples, 100 ppm de potássio na forma de cloreto de potássio, como também micronutrientes na forma de solução (MnCl_2 1,81 g/litro; ZnSO_4 0,22 g/litro; CuSO_4 0,08 g/litro; H_2MoO_4 0,02 g/litro; H_3BO_3 2,86 g/litro).

Com exceção do superfosfato simples, os demais adubos foram dissolvidos e/ou diluídos em água e a solução aplicada aos vasos.

O adubo nitrogenado enriquecido com ^{15}N foi aplicado nas doses e modos previamente estabelecidos, como será abordado no sub-ítem 3.7.

3.5. Cultivares das culturas

As leguminosas fixadoras corresponderam as culturas de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar CNC x 284 - 4E cedido pelo CNPAF-EMBRAPA e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Carioca (Seção de Fertilidade do Solo do CENA).

Como plantas controles foram utilizadas: arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar IAC-25 e soja não nodulante (*Glycine max* L. Merrill) cultivar D-71-9331.

3.6. Sementes, inoculação, semeadura e controle de umidade

As sementes de leguminosas fixadoras (caupi e feijoeiro) foram inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* antes da semeadura. Para o caupi utilizou-se a estirpe CM 1528 31-3 e para o feijoeiro a estirpe CM01 31-3. Os inóculos foram fornecidos pela Seção de Microbiologia do Solo do CENA/USP.

Procedeu-se a semeadura das culturas testes e controles em vasos contendo 5 kg de terra, no dia 05 de janeiro de 1990 para o experimento I (germinação deu-se após 5 dias da semeadura) e 19 de junho de 1990 para o experimento II (germinação deu-se após 6 dias da semeadura). Foi feito desbaste nos dois experimentos, deixando-se três plantas por vaso.

A terra dos vasos foi umedecida procurando-se manter 80% da capacidade de embebição total. As regas foram feitas diariamente conforme a redução de umidade nos vasos devido a evapotranspiração.

3.7. Aplicação do fertilizante uréia marcada com ^{15}N

3.7.1. Experimento I

Foi aplicado uma quantidade de nitrogênio correspondente a dose de 10 ppm de N (equivalente a 27 kg N/ha, considerando uma massa de terra de 5 kg por vaso) ou 50 mg N/vaso. Para facilitar a aplicação do fertilizante marcado preparou-se uma solução contendo 11,11 g de uréia ($\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$) enriquecida com 10 átomos % de ^{15}N em excesso diluída em 2 litros de água. Após o desbaste das

plantas, aplicou-se no experimento o adubo marcado em 20 ml da solução por vaso, com pipeta volumétrica, e de maneira bem uniforme.

3.7.2. Experimento II

Após o desbaste das plantas cinco doses de N-fertilizante foram aplicadas na forma de uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) : 2, 15, 30, 45 e 60 ppm. A primeira dose com enriquecimento de 30 átomos % ^{15}N em excesso, a segunda com 10 átomos % ^{15}N em excesso e as demais com 4,991 átomos % ^{15}N em excesso. Para facilitar a aplicação uniforme do fertilizante nos vasos preparou-se soluções como segue:

Primeira dose (10 mg N/vaso): 0,611 g de uréia enriquecida/1100 ml de água; aplicou-se 40 ml/vaso.

Segunda dose (75 mg N/vaso): 4,583 g de uréia enriquecida/ 550 ml de água; aplicou-se 20 ml/vaso.

Para a terceira dose (150 mg N/vaso), a quarta dose (225 mg N/vaso) e a quinta dose (300 mg N/vaso) preparou-se uma solução de 2,5 litros contendo 41,667 g de uréia, e aplicou-se 20, 30 e 40 ml/vaso, respectivamente para terceira, quarta e quinta doses.

As doses 2, 15, 30, 45 e 60 ppm de N corresponderam aproximadamente a 5,3, 40, 80, 120 e 160 kg N/ha.

3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas

Experimento I : O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso em esquema fatorial 8x2 com três repetições, sendo os fatores oito épocas de coletas e duas culturas. As médias obtidas foram

submetidas a análise de variância, tendo sido realizado o teste F e Tukey através do SANEST-Versão 2.1 (ZONTA & MACHADO¹, sem data). Para expressar as respostas das culturas às épocas foi ajustado funções usando análise de regressão.

Experimento II: Os tratamentos foram dispostos em delineamento em blocos ao acaso, num esquema fatorial 5x2x3 com três repetições, onde os fatores foram doses de nitrogênio, duas culturas e três épocas. Para qualificar os efeitos dos tratamentos sobre as plantas estudadas os valores médios dos dados, obtidos para cada repetição, foram submetidos a análise de variância pelo SANEST-versão 2.1 tendo sido realizado o teste F e Tukey para avaliação do efeito das 5 doses de N sobre as plantas estudadas, assim como das épocas, de acordo com o preconizado por (ZONTA & MACHADO¹, sem data). Também foram feitas análises de regressão.

3.9. Condução do experimento

3.9.1. Análise do material vegetal

3.9.1.1. Colheita do material vegetal

As colheitas das plantas dos experimentos, foram realizadas através de amostragens ao longo do ciclo como a seguir:

¹ ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. SANEST- Sistema de análise estatística para microcomputadores, v. 21. 148p. (s.l. e s.d.) (mimeografado).

a) **Experimento I:** Amostragens aos 17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 e 78 dias após a semeadura (DAS), exceto nas épocas 24, 38, 47 e 68 DAS para a soja não nodulante.

b) **Experimento II:** Amostragens aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura (DAS)

O material colhido de cada vaso (folhas + ramos + pecíolos + pedúnculos), e em caso de presença de vagens estas foram separadas da parte aérea, e as folhas senescentes que caíram durante o experimento foram colocadas em sacos de papel em estufa ventilada a 70°C até atingir peso constante, determinando-se então a matéria seca total das vagens e da parte aérea das plantas por vaso. Após, foram moídas em moinho tipo Wiley e novamente moídas em moinho TEKMAR A-10 adquirindo constituição mais fina, para depois proceder as análises de nitrogênio total e composição isotópica do nitrogênio.

3.9.1.2. Análises do nitrogênio total

O nitrogênio total das amostras de plantas foram determinadas pelo método semi-micro Kjeldahl descrito por BREMNER & MULVANEY (1982) com propósitos para análise isotópica de ^{15}N . Para tanto 100 mg de material vegetal seco e moído, foi digerido em solução digestora de ácido sulfúrico, e o digerido destilado em soda (NaOH) e titulado com H_2SO_4 0,05N.

3.9.1.3. Atividade da nitrogenase (redução do acetileno em raízes destacadas)

A atividade da enzima nitrogenase foi medida indiretamente através do método da atividade de redução do acetileno-ARA (HARDY *et al.*, 1968).

Após a coleta as raízes nodulantes dos experimentos I e II foram colocadas em frascos de vidro de 1000 ml e em seguida fechados hermeticamente. Retirou-se, previamente, 10% da atmosfera do vidro, a fim de que a pressão não fosse alterada, e injetou-se 10% de C_2H_2 nos vidros. Após 30 minutos retirou-se amostras com seringas plásticas de 1 cm³, e injetou-se 0,5 cm³ em cromatógrafo de gás tipo BECKMAN modelo GC-65, usando-se detector de ionização de chama de H_2 a 125°C e coluna contendo Poropak N de 80 a 100 mesh a 50°C. Todo procedimento foi de acordo com SAITO (1978).

Preparou-se padrão de 500 ppm de C_2H_4 para determinação do controle, vidros sem raízes e com injeção de C_2H_2 .

3.9.1.4. Análise da composição isotópica de ^{15}N : Espectrometria de massas

As amostras foram processadas de acordo com o método de Rittemberg (Rittemberg¹, 1946 citado por TRIVELIN *et al.*, 1973), partindo do destilado final obtido na análise da percentagem de

¹ RITTEMBERG, D. Preparation and measurement of the isotopic tracers. In: WILSON, D.W.; NIER, A.D.C.; RIAMAN, S.P. p. 31. J.M. Edwards, an Arbor, Michigan. 1946.

nitrogênio total (Kjeldahl) que foi novamente acidificado com H_2SO_4 0,1N e concentrado por evaporação, o NH_4^+ foi convertido a N_2 por oxidação com hipobrometo de lítio (LiOBr) (ROSS & MARTIN, 1970; PORTER & O'DEEN, 1977). As análises da composição isotópica do nitrogênio contido nas amostras foram efetuadas num espectrômetro de massas ATLAS VARIAN MAT modelo CH-4 na Seção de Isótopos Estáveis do CENA.

Os resultados da composição isotópica do N_2 foram obtidos em uma varredura de massas correspondentes às intensidades (I) I_{28} ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$); I_{29} ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$); I_{30} ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$). De acordo com TRIVELIN *et al.* (1973) mesmo tomadas as maiores precauções sempre existe alguma contaminação da amostra pelo ar atmosférico, e sabendo-se porém a concentração de nitrogênio (N), oxigênio (O_2) e argônio (A) do ar atmosférico pode-se estudar uma correção para as medidas. Esta correção pode ser estabelecida com base nas medidas das massas de intensidade I_{32} ($^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) ou I_{40} (^{40}A). Os cálculos podem ser visto em detalhe em TRIVELIN *et al.* (1973).

Os íons de diferentes massas que penetram no coletor são registrados em forma de picos, formando o espectro de massas ao produto da altura em mm de um "pico" (intensidade das massas) pela sensibilidade do registrador em Volts, denomina-se intensidade da massa considerada. O cálculo da concentração em ^{15}N de uma amostra baseia-se na medida da intensidade da corrente de íons (I) podendo ser expressa pela seguinte equação:

$$\text{Átomos}\%^{15}\text{N} = \frac{(I_{29} + I_{30})}{2(I_{28} + I_{29} + I_{30})} \times 100 \quad (3)$$

Considerando-se o equilíbrio isotópico existente entre as diversas espécies moleculares a equação pode ser simplificada para (de acordo com Birkefeld¹ *et al* (1962) citados por PROKSCH 1969):

$$\text{Átomos}\%^{15}\text{N} = \frac{100}{2R+1} \quad (4)$$

onde

R= relação entre as intensidades das moléculas de [¹⁴N¹⁴N]/[¹⁵N¹⁴N]

3.9.2. Cálculos realizados

3.9.2.1. Determinação da atividade da nitrogenase

A determinação da quantidade de C₂H₄ formado foi calculada pela seguinte equação:

$$C_2H_4 \text{ (n moles/h)} = K \times K' \times \left(\frac{\text{volume do frasco}}{\left(\frac{\text{volume injetado (cm}^3\text{)}}{\left(\frac{\text{tempo de incubação (h)}}{1} \right)} \right)} \right) \quad (5)$$

¹BIRKEFELD, M.; MAASE, G.; ZAHN, H. Massenspektrometrische Isotopenanalyse. V E B Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin. 1962.

onde

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

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 nmoles C_2H_4 /planta/hora e (ou) $\mu\text{mol } C_2H_4$ /planta/hora a partir dos valores obtidos pela altura do pico em relação ao padrão de 500 ppm de etileno.

3.9.2.2. Quantidade de nitrogênio total (QNT)

As quantidades de nitrogênio total nas plantas foram calculadas de acordo com a equação 6:

$$QNT = \frac{RMS \times N(\%)}{100} \quad (6)$$

onde:

QNT = quantidade de nitrogênio total na planta (mg/vaso) ou (mg/planta)

RMS = Rendimento de matéria seca (mg/vaso) ou (mg/planta)

N (%) = teor de nitrogênio na planta (%)

3.9.2.3. Nitrogênio proveniente do fertilizante

Na determinação da percentagem de nitrogênio nas plantas provenientes doo fertilizante (%NPPF) foi calculado pela expressão 7:

$$\%NPPF = \frac{(\text{átomos } \%^{15}\text{N}_{\text{planta}} - \%A.N.)}{(\text{átomos } \%^{15}\text{N}_{\text{fertilizante}} - \%A.N.)} \times 100 \quad (7)$$

onde:

átomos % ^{15}N planta = percentagem de átomos de ^{15}N presentes na parte da planta em questão.

átomos % ^{15}N fertilizante = percentagem de átomos de ^{15}N presente no fertilizante.

%A.N. = átomos % de abundância natural de ^{15}N (0,3663%)

A quantidade de nitrogênio nas plantas provenientes do fertilizante (QNPPF) foi calculada utilizando-se a equação 8:

$$QNPPF = \frac{\%NPPF \times QNT}{100} \quad (8)$$

3.9.2.4. Nitrogênio da fixação (método isotópico)

A percentagem de nitrogênio na planta proveniente da fixação para as culturas de caupi e feijão usando como controles soja não

nodulante e arroz, no estudo com adição de fertilizante ^{15}N foi obtida pela expressão 9:

$$\%N_{\text{fix}} = \left[1 - \frac{(\text{átomos}\%^{15}\text{N})_{\text{leguminosa}} - 0,3663}{(\text{átomos}\%^{15}\text{N})_{\text{controle}} - 0,3663} \right] \times 100 \quad (9)$$

A quantidade de N na planta proveniente da fixação (QN_{fix}) para as culturas fixadoras de N (mg/vaso ou mg/planta) foi obtida pela equação 10:

$$QN_{\text{fix}} = \frac{\%N_{\text{fix}}}{100} \times QNT \quad (10)$$

tendo sido apresentados $\%N_{\text{fix}}$ na equação 9 e QNT na expressão 6.

Os cálculos da quantidade de nitrogênio fixado extrapolado de g/vaso para kg/ha foram feitos com base em 100 mil covas/ha, considerando um espaçamento entre linhas de 0,5 m e 5 covas por metro (cada cova com 3 plantas).

3.9.2.5. Nitrogênio proveniente do solo

As percentagens de N nas plantas provenientes do solo, foram obtidas pela equação 11:

$$\%NPPS = 100 - \%NPPF - \%N_{fix} \quad (11)$$

As quantidades de nitrogênio nas plantas proveniente do solo (mg/vaso ou mg/planta) foram calculadas por diferença entre as quantidades de N total, N-proveniente do fertilizante e quantidade de N na planta proveniente da fixação:

$$QNPPS = QNT - QNPPF - QN_{fix} \quad (12)$$

3.9.2.6. Eficiência de utilização do fertilizante pela cultura (EUF)

A Taxa de Utilização do N Fertilizante pela cultura foi calculada pela equação:

$$EUF = \frac{QNPPF}{QNAF} \times 100 \quad (13)$$

onde: QNPPF = quantidade de N na planta proveniente do fertilizante (mg/vaso ou mg/planta) calculada na equação 8.

QNAF = quantidade de N aplicado ao solo como fertilizante (mg/vaso ou mg/planta).

Todas as fórmulas mostradas acima, desde o sub-ítem 3.9.2.2. até 3.9.2.6 estão contidas em HARDARSON & DANSO (1990).

3.9.2.7. Nitrogênio da fixação (método da diferença)

A percentagem de nitrogênio fixado na planta para as culturas caupi e feijão usando como controles soja não nodulante e arroz, no estudo do método da diferença foi obtido pela expressão:

$$N\text{-fixado}(\%) = \frac{N\text{ total}_f - N\text{ total}_c}{N\text{ total}_f} \times 100 \quad (14)$$

A quantidade de N_{fixado} para as culturas fixadoras (mg/vaso ou mg/planta) foi obtido por:

$$QN\text{fixado} = N\text{ total}_f - N\text{ total}_c \quad (15)$$

onde:

f = sistema ou planta fixadora de N_2

c = sistema ou planta não fixadora de N_2 (controle)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO I

4.1.1. Medidas da Redução do C_2H_2

Os resultados referentes à estimativa da atividade da enzima nitrogenase (N_2 -ase) nas plantas de caupi e feijão encontram-se na Tabela 4 e estão representados na Figura 5.

O potencial da atividade da fixação medido pela atividade da nitrogenase ($\mu \text{ mol } C_2H_4 \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$) ao longo do ciclo, variou de forma semelhante para ambas as culturas (Figura 5). O feijão alcançou o seu pico próximo a floração (38 DAS) logo após decaiu drasticamente, permitindo estimar que a fixação do nitrogênio a partir da décima semana após a semeadura, foi, praticamente zero. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por FRANCO *et al.* (1979) em feijoeiro cv. Rico 23 e por CONTADO (1990) em cv. Negro Argel.

Constata-se, na Tabela 4 que, o caupi apresentou as taxas de redução do acetileno (C_2H_2) mais elevadas que o feijão em todas as épocas analisadas (embora que aos 17,47, 58, 68 e 78 DAS não houve diferença estatística entre as médias), caracterizando diferenças acentuadas em relação a fixação entre essas culturas, principalmente entre os 31 e 38 DAS. Neste aspecto, os resultados se assemelham com os obtidos por NEVES *et al.* (1982) e caracterizam a maior parte da

Tabela 4. Atividade da nitrogenase (redução do C₂H₂) em determinado estágio de desenvolvimento de plantas de caupi e feijão (Média de 3 Repetições).

C U L T U R A S	Dias Após a Semeadura (DAS)						
	17	24	31	38	47	58	78
	$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$						
Caupi	0,44ca	46,77aba	35,88 ba	71,04aA	36,78 bA	22,98bca	4,92ca
Feijão	0,07La	26,14a B	18,91abB	31,74aB	21,29abA	12,57abA	0,09bA
	M É D I A						
	0,26d	36,46ab	27,40bc	51,39a	29,04bc	17,77cd	2,51d
							1,13d
Teste F épocas	= **						
Teste F culturas	= **						
Teste F interação	= **						
CV	= 45,4%						

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.
Letras maiúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas.

Figura 5. Variação da atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2 ; μ mol C_2H_4 /planta/hora) durante o ciclo do caupi e feijão.

atividade da nitrogenase está mais concentrada na fase de crescimento reprodutivo das plantas (PEREIRA *et al.*, 1978; NEVES *et al.* 1982).

De acordo com a Figura 5 o caupi apresentou um pico aos 38 DAS indicando que o potencial de atividade máxima da enzima nitrogenase ocorreu dias antes da plena floração (floração 47 DAS) e, em seguida começou a cair bruscamente principalmente a partir dos 58 DAS.

Desde que a técnica de redução do acetileno foi

sugerida por HARDY & KNIGHT (1966) muitos pesquisadores têm utilizado esse método em plantas de feijão e caupi devido a sua sensibilidade elevada, baixo custo e rapidez das análises. Todavia, pode ocorrer uma série de limitações no seu uso visto que é uma avaliação enzimática momentânea e o acetileno inibe não só a evolução de H_2 pelos nódulos (RIVERA-ORTIZ & BURRIS, 1975; SCHUBERT & EVANS, 1976; SAITO, 1978, LIMA, 1981; HUNGRIA & RUSCHEL, 1987; UPCHURCH, 1987) como pode inibir a própria atividade da nitrogenase através da redução da permeabilidade dos nódulos ao oxigênio, o que pode provocar uma diminuição de até 50% na atividade da nitrogenase (MINCHIN *et al.*, 1983). No entanto HUNGRIA & NEVES (1986) em estudos utilizando incubação em sistemas de fluxo contínuo de acetileno, verificaram em vários cultivares de feijão que o declínio na atividade da nitrogenase causado pelo acetileno foi, em média, de apenas 2,95% sendo observado uma variação máxima de 9,67% e discordaram das limitações sugeridas por MINCHIN *et al.* (1983).

HUNGRIA & RUSCHEL (1987) verificaram uma eficiência relativa baixa dos elétrons destinados a nitrogenase, por consequência até 51% dos elétrons foram perdidos pela nitrogenase, com a perda de energia que poderia está sendo utilizada para os processos de crescimento das plantas.

Há evidências atualmente, e, quase um consenso geral, de que avaliações em sistemas de fluxo contínuo apresentam algumas limitações, em particular para leguminosas (DENILSON *et al.*, 1983; WITTY & MINCHIN, 1988; GORDON *et al.*, 1989; McNEILL *et al.*, 1989; BODDEY *et al.*, 1990; HERRIDGE, 1990; SPRENT & SPRENT,

1990) principalmente em condições de campo (DENILSON *et al.*, 1983; McNEILL *et al.*, 1989), e que o método inicial da redução do acetileno não pode fornecer dados precisos assim como uma indicação quantitativa da fixação de N_2 por sistemas fixadores de plantas.

A avaliação da fixação de N_2 no presente experimento pelo método da redução do acetileno apenas serviu para se ter uma estimativa do potencial de atividade da nitrogenase nas oito épocas estudadas (17, 24, 31, 38, 47, 58, 68 e 78 DAS). Para obter avaliações mais precisas das taxas de redução do acetileno em condições de vasos se faz necessário a determinação da evolução do H_2 e utilização de sistema de fluxo contínuo. A não realização dessas exigências no presente estudo, se deve ao fato de não fazer parte diretamente dos objetivos do trabalho.

Segundo LIMA (1981) e HUNGRIA & RUSCHEL (1987) a análise de dados obtidos nestas condições, mostra que os resultados da taxa de redução do acetileno pode conduzir a grandes erros de interpretação se o consumo de elétrons com a evolução do H_2 não for considerado.

Apesar da técnica de ARA, na sua mais simplista forma, apresentar limitações, continuará a ser útil para organismos de vida livre e para testes rápidos não quantitativos na presença da nitrogenase ativa (SPRENT & SPRENT, 1990). A prova é, que alguns trabalhos recentes utilizando a ARA foram realizados exclusivamente, com feijão (ISOI & YOSHIDA, 1991) e sanfeno-*Onobrychis viciifolia* (PRÉVOST & BROMFIELD, 1991) e ainda, paralelamente à diluição isotópica com caupi (WATANABE *et al.*, 1990; YONEYAMA *et al.*, 1990) e soja (CHIU *et al.*, 1990; WATANABE *et al.*, 1990; YONEYAMA *et al.*,

1990).

Embora sistemas modificados de fluxo contínuo (MINCHIN *et al.*, 1983) poderem auxiliar os entendimentos básicos da fisiologia das culturas, não podem da mesma forma ser substitutos para obtenção de dados quantitativos sobre fixação biológica do N_2 . Todavia, foi mais um avanço nas pesquisas Bioquímicas de sistemas simbióticos de plantas.

4.1.2. Produção de matéria seca (MS)

Os dados referentes a produção de massa seca (g/planta) da parte aérea das culturas fixadoras (caupi e feijão) e não fixadoras (arroz e soja não nodulante) durante as oito épocas de coleta podem ser vistos na Tabela 5. A Figura 6 apresenta os gráficos obtidos através da regressão polinomial para as épocas de coleta das quatro citadas culturas.

Analisando as médias por cultura (Tabela 5) observa-se que as produções de massa seca das culturas fixadoras de N_2 diferiram estatisticamente entre si, onde o caupi apresentou maior valor que o feijoeiro. Entre as plantas controles, a soja não nodulante apresentou maior média em relação ao arroz diferindo também estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De modo geral, observando-se a Tabela 5 e Figura 6, o crescimento vegetativo das culturas (fixadoras e controles), representado pela massa seca da parte aérea, seguiu o comportamento esperado, aumentando com o decorrer do tempo. Particularizando, no grupo das plantas fixadoras, o caupi apresentou os maiores incrementos de massa seca em função das seis últimas épocas de coleta, superando

Tabela 5. Massa seca (g/planta) da parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	Dias Após a Semeadura							Média por Cultura
	17	24	31	38	47	58	68	
<hr/>								
FIXADORAS	g/planta							
	TOTAL ¹							
	1,17gA	2,65fgA	4,82 fA	7,76eA	13,79dA	19,74cA	24,25bA	27,54 aA
	1,48dA	2,51cdA	2,92cdB	4,04cB	7,28bB	7,77bB	10,20aB	8,12abB
	Teste F culturas = **							12,72A
	Teste F épocas x culturas= **							5,54B
	CV = 9,9%							
<hr/>								
CONTROLES	VAGENS							
	TOTAL							
	Arroz	0,06fB	0,24f	0,54fB	1,10e	2,38d	3,39cB	5,25b
	Soja não nod.	0,59dA		3,82cA			6,49bA	6,22aB
	Arroz : Teste F = **							7,35aA
	CV = 6,9%							2,55B
	Arroz e Soja não nodulante : Teste F culturas = **							4,56A
	Teste F épocas x culturas= **							
	CV = 4,8%							

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem as linhas e as maiúsculas às colunas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + p-dúnculos e vagens quando presentes)

²CAUPI ; ³FEIJÃO

*soja não nodulante

Figura 6. Massa seca (g/planta) da parte aérea das culturas fixadoras e controles, em função das épocas de coleta.

estatisticamente o feijão a nível de 5% de probabilidade. O acúmulo de matéria seca do feijoeiro apresentou duas fases importantes: uma de incremento rápido a partir da floração (38 DAS) até atingir um máximo no início da maturação das vagens (68 DAS), e um pequeno declínio na etapa final de maturação (78 DAS). Entretanto, esse declínio no valor absoluto da média não foi significativamente diferente em relação as três épocas anteriores (47, 58 e 68 DAS). Fase inicial similar de acúmulo rápido de matéria seca para feijão, como observado neste trabalho, tem

sido descrita por outros trabalhos (HUNGRIA & RUSCHEL, 1987; SILVA, 1988; REYES CUESTA, 1991).

O caupi também apresentou incrementos rápidos nas médias a partir da floração, que ocorreu neste caso aos 47 DAS, atingindo o máximo na época final de maturação das vagens (78 DAS). Todas as médias durante este período diferiram estatisticamente entre si (TUKEY- 5%). Resultados similares para a mesma cultura foram observados por EAGLESHAM *et al.* (1977); CASTRO *et al.* (1984); FERNANDEZ & MILLER (1986); FERNANDEZ & MILLER (1987); SILVEIRA *et al.* (1989) trabalhando com diversos cultivares. Recentemente AWONAIKE *et al.* (1991) mostraram que o maior aumento do acúmulo de massa seca em caupi cv. Ife Brown foi registrado nos 10 dias entre o enchimento médio das vagens e estádios de crescimento da maturidade fisiológica. Observaram ainda, que mais da metade da massa seca total durante o período de crescimento, foi acumulado dentro deste intervalo, e que as vagens contribuíram significativamente sobre o aumento observado.

No presente estudo, os pecíolos, pedúnculos (quando presente), ramos e folhas de caupi, constituíram 50,07% (13,79 g/planta) do total geral de massa seca do experimento (27,54 g/planta) durante o estágio vegetativo (até 47 DAS) e 31,30% (8,62 g/planta) desse total, após a floração (47 DAS) até a maturidade fisiológica (78 DAS). Do total de massa seca acumulada no intervalo de 47 a 78 DAS (13,75 g/planta) esses órgãos contribuíram com aproximadamente 66,91% (9,2 g/planta) e as vagens com 18,63% (5,13 g/planta). As vagens participaram com apenas aproximadamente 3,29% (0,65 g/planta) do total da matéria seca produzida no estágio de enchimento das vagens (58

DAS) mas representaram 22,47% (maior valor, 5,45 g/planta) na maturação fisiológica das vagens aos 68 DAS.

EAGLESHAM *et al.* (1977) constataram que a maior parte da acumulação da matéria seca total da planta inoculada de caupi cv. K2809 ocorreu após o florescimento, e, durante o período reprodutivo (primeira floração à maturidade, 42 dias) as plantas acumularam três vezes mais matéria seca (150,9 g) do que durante o crescimento vegetativo (45,6 g em 48 dias). Praticamente a mesma proporção foi observada para o cv. CNC x 284-4E do presente experimento, que acumulou 2,6 vezes mais matéria seca (19,78 g/planta) durante o período reprodutivo de 40 dias (da pré-floração ao final da maturação fisiológica - 38 à 78 DAS) do que durante o crescimento vegetativo (7,76 g/planta em 38 dias).

A produção de matéria seca de caupi e feijão depende não somente de uma adequada produção de assimilados fotossintéticos, mas também de uma adequada capacidade de armazenamento dos fotossintatos para atender o período reprodutivo que é o principal responsável pelos aumentos no total da matéria seca dessas culturas. Segundo CASTRO *et al.* (1984) e FERNANDEZ & MILLER (1987) a evolução de matéria seca em caupi está relacionada com a área foliar e a taxa assimilatória líquida. Isso também foi comprovado em feijão (REYES CUESTA, 1991). O nitrogênio é importante para o desenvolvimento da área foliar de caupi (FERNANDEZ & MILLER, 1987; SILVEIRA *et al.*, 1989) que pode vir da inoculação por rizóbium e/ou adubação nitrogenada (FERNANDEZ & MILLER, 1985 e 1986).

Os resultados obtidos por SILVEIRA *et al.* (1989) indicaram a existência de uma relação positiva entre o acúmulo de N e

a produção de matéria seca, nas plantas inteira de caupi cv. Epace 1, Epace 6 e Epace 8. Observaram que até o período de florescimento e início de formação das vagens (44-56 dias após a germinação), a aquisição de N é diretamente proporcional à produção de matéria seca.

Plantas sob adequadas condições ambientais aumentam a taxa de produção de matéria seca. Em feijoeiro a taxa fotossintética é reduzida pela deficiência de nitrogênio e incrementada pelo aumento do teor de N nas folhas (REYES CUESTA, 1991) e índice de área foliar (SILVA, 1988).

Como já foi dito anteriormente, no final do experimento (78 DAS) o feijão carioca apresentava-se em final de ciclo (estádio final de maturação das vagens), apresentando folhas em senescência. Seu crescimento é do tipo indeterminado 3, prostrado com tendência a trepador. O caupi cv. CNC x 284 - 4E mostrava-se também em final de ciclo, com folhas em senescência, e a quase totalidade das vagens em maturação fisiológica. A soja não nodulante cv. D-71-9331 em estágio de formação das vagens sendo que as mesmas além de atrofiadas, apresentavam-se chôchas devido a não produção de fotossintatos suficiente, pela não fixação de N_2 e porque a dose de N aplicada em todos os vasos (10 ppm) além de ser baixa serviu apenas para marcar o solo com ^{15}N e fornecer uma adubação nitrogenada adequada que estimulasse a nodulação das plantas testes (caupi e feijão). FRANCO & DÖBEREINER (1968) verificaram que, em feijoeiros inoculados a adubação nitrogenada de 10 ppm de N influencia positivamente a nodulação. Finalmente o arroz, aos 78 DAS, encontrava-se em fase de enchimento de panícula, evidenciando diferentes estádios fisiológicos das culturas fixadoras e controles.

Pela Tabela 5 vê-se que os incrementos na massa seca da parte aérea de arroz e soja não nodulante aumentaram significativamente com o decorrer do tempo atingindo o máximo aos 78 DAS. As médias de ambas culturas diferiram estatisticamente entre si (Tukey a 5%) em todos estádios de desenvolvimento. Observa-se, ainda, que os valores de massa seca da parte aérea do feijoeiro acompanhou o aumento das médias de soja não nodulante e isto mostra que este controle seria adequado na quantificação da fixação biológica do N_2 do feijoeiro, embora tenha apresentado valores negativos de N fixado aos 17 DAS pelo método da diluição isotópica do ^{15}N como será visto posteriormente.

A semelhança apresentada nas produções de massa seca da parte aérea de feijão e soja não nodulante nas diferentes épocas (31, 58 e 78 DAS), é importante levando-se em consideração de que o controle adequado no método por diluição isotópica para quantificar a fixação biológica do nitrogênio deve apresentar idade fisiológica próxima da fixadora (BODDEY *et al.*, 1983; BODDEY, 1987; DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990).

4.1.3. Quantidade de nitrogênio total (QNT)

Os resultados de quantidades de nitrogênio total (QNT) por planta (mg/planta) da parte aérea das culturas fixadoras e controles em oito épocas de coleta, são apresentados na tabela 6.

Comparando as Figuras 6 e 7 percebe-se um comportamento da quantidade de nitrogênio total (mg/planta) das culturas caupi e feijão de ordem cúbica e tendendo a acompanhar o rendimento

de matéria seca (g/planta) já que ao se calcular a QNT multiplica-se a % N ao rendimento de matéria seca da parte aérea das plantas (equação 6). A QNT absorvida pela planta como um todo ou por suas partes é função do teor de nitrogênio nela contido e do seu rendimento de matéria seca.

Os resultados do presente estudo concordam com os relatados por EAGLESHAM *et al.* (1977) para caupi crescido em casa de vegetação, e para feijão (PEREIRA, *et al.*, 1989) e caupi (AWONAIKE, *et al.*, 1991) em condições de campo, onde observaram que o N total acumulado seguiu uma tendência similar àquela da matéria seca.

Pela Tabela 6 observa-se que houve diferenças nas médias de QNT entre as culturas e épocas de coleta, tanto entre fixadoras como nos controles (Teste $F \leq 0,01$). Vê-se que no grupo das plantas fixadoras o caupi e feijão apresentaram diferenças significativas entre si, onde o feijão apresentou aproximadamente 40% do total médio de N acumulado na parte aérea do caupi (veja, média por cultura, Tabela 6).

Percebe-se que o caupi, entre todas as culturas, foi o que acumulou a maior quantidade de N na parte aérea em quase todas as épocas de coleta. A parte aérea (caule + ramos + pedúnculos + folhas + frutos) alcançou o valor máximo de N na oitava época (78 DAS) cuja média foi 706,32 mg N/planta.

A cultura absorveu sensivelmente nitrogênio, apresentando médias diferentes ao nível de 5% de probabilidade no período compreendido desde a pré-floração (38 DAS) até o final de desenvolvimento das vagens (58 DAS). Esses resultados concordam com os obtidos por vários pesquisadores (EAGLESHAM *et al.*, 1977; NEVES

et al., 1982; AWONAIKE *et al.*, 1991). Comparando-se as diferentes médias das épocas 38 DAS e 78 DAS, percebe-se que houve um ganho líquido significativo na QNT com o teor de N na maturidade fisiológica (78 DAS) estando aproximadamente 2,5 vezes maior do que a pré-floração (38 DAS).

No que se refere ao nitrogênio acumulado pelo feijão, verificou-se que a cultura absorveu significativamente (ao nível de 1% de probabilidade) o nitrogênio até a penúltima época de análise (68 DAS), período de maturação das vagens, vindo a diminuir em seguida (78 DAS), no entanto essa diminuição não mostrou diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Estes resultados concordam com os obtidos por NEPTUNE & MURAOKA (1978); URQUIAGA CABALERO (1982); RENNIE & KEMP (1984); WESTERMANN *et al.* (1985) que observaram a máxima absorção de nitrogênio por esta cultura foi na época compreendida entre a floração até o período mais intenso de desenvolvimento das vagens.

Durante o enchimento das vagens e maturação fisiológica (58-78 DAS para caupi e 47-78 DAS para feijão), período de rápida mobilização de assimilados para as vagens, houve uma aceleração da senescência e abscisão foliar de ambas as culturas em virtude de alta demanda de fotossintatos para o enchimento das sementes. Os valores crescentes de matéria seca (Tabela 5, sub-ítem 4.1.2.) durante todo ciclo das culturas se devem às coletas das folhas maduras já senescentes como relatado no sub-ítem 3.9.1.1.

Exceto para a ligeira redução do incremento de N total de caupi no estágio vegetativo de 24 à 31 DAS (124,83 mg/planta) para o estágio de pré-florescimento de 38 DAS (83,6 mg/planta), houve um

*soja não nodulante

Figura 7. Quantidade de nitrogênio total (QNT) (mg/planta) na parte aérea das culturas fixadoras e controles, em função das épocas de coleta.

aumento significativo até a sucessiva colheita de 47 DAS (227,51 mg/planta), época da floração, correspondendo a 45% do N total acumulado até aquele período. Nos períodos subsequentes a QNT por estágio de crescimento, caiu em valores de 152,61, 31,68 e 16,98 mg N/planta para os estádios de 58, 68 e 78 DAS, respectivamente (os valores fora e entre parênteses podem ser calculados pela Tabela 6). Esse

decréscimo da QNT na maturidade fisiológica foi ocasionado pela senescência dos nódulos radiculares e a consequente diminuição da principal fonte de N nesse período que foi a fixação do N_2 , pois a quantidade de N-fertilizante aplicado foi pequena (10 ppm).

Embora as produções de massa seca da soja não fixadora e feijão tenham sido similares na maturidade fisiológica (78 DAS) (Tabela 5), a quantidade de nitrogênio total no feijão foi apreciavelmente mais alto (238,96 mg N/planta) (Tabela 6). O período de maior absorção de N total (N-nativo + N-fertilizante) na soja não nodulante ocorreu durante os estádios vegetativos de 17-31 DAS (26,33 mg N/planta dentro de um período de 14 dias ou 50,44% do total acumulado até aquele período). Presume-se que grande parte dos 7,34 mg de nitrogênio contido na semente de soja não nodulante (Tabela 7) representou uma pequena parcela do N total durante o período vegetativo, desde a germinação até 31 DAS. Nos períodos subsequentes houve uma pequena redução nos valores (embora que não estatisticamente) devido a diluição do N nos tecidos em crescimento da planta, ao esgotamento do N da semente e ao reduzido fornecimento de N do solo + N fertilizante.

De acordo com a média por cultura da Tabela 6, as quantidades de N total nas plantas controles são estatisticamente diferentes entre si. O maior valor médio por cultura ficou com a soja não nodulante (43,43 mg/planta) e o menor valor com o arroz (30,33 mg/planta).

Percebe-se pela Tabela 6 que a média por cultura apresentado pelo arroz representou praticamente 7,7% do valor de caupi e 19,4% do valor do feijão. As plantas nodulantes de caupi e feijão foram sempre superiores quanto ao teor de nitrogênio total na parte aérea

analisada, indicando que essas leguminosas possuidoras de uma fonte externa de N, mostrou um 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).

Os conteúdos de N total na parte aérea das leguminosas foram similares nos estádios vegetativos iniciais das plantas (17 e 24 DAS). Segundo SRIVASTAVA (1975) os primeiros 10 dias de crescimento das plântulas de *Phaseolus vulgaris* L. é mantido pelo nitrogênio das reservas de proteínas cotiledonares. No presente estudo estima-se que até 17 DAS grande parte do nitrogênio total contido nas sementes (Tabela 7) contribui para o crescimento das plantulas de feijão e caupi, assim como o nitrogênio proveniente do solo.

SPRENT & THOMAS (1984) sugeriram que o estado de deficiência de N exibido por muitas espécies leguminosas de hábito de germinação epígea, como *Phaseolus vulgaris* L. e *Glycine max* (L.) Merr., é devido ao primeiro N-fixado ser drenado preferivelmente para o desenvolvimento dos nódulos e ao maior comprometimento proporcional das reservas de N da semente para as primeiras folhas. De fato, experimentos com ^{15}N tem demonstrado isso em *Glycine max* (L.) Merr. (YONEYAMA & ISHIZUKI, 1982) e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (ATKINS *et al.*, 1989). Assim, foi importante a aplicação de uma baixa dose inicial de N (10 ppm) às plantas de caupi e feijão (susceptíveis a deficiência de N na fase inicial de crescimento) de forma que estimulasse a nodulação e não afetasse a fixação pelos sistemas simbióticos. Deste modo os dados das Tabelas 5 e 6 e dos Gráficos 6 e 7 confirmam as observações de diversos autores (FRANCO & DÖBEREINER,

Tabela 7. Massa seca, percentagem e quantidade de nitrogênio total das sementes (cotilédones + tegumento) das quatro culturas utilizadas na semeadura dos experimentos. (Média de duas repetições¹).

CULTURAS	MASSA SECA mg/semente	NITROGÊNIO	
		%	mg/semente
Caupi	175,6ab	4,01 b	7,04a
Feijão	194,3a	3,68 b	7,15a
Arroz	31,6 c	1,06 c	0,34 b
Soja não Nodulante	151,5 b	4,85a	7,34a
Teste F	**	**	**
CV	5,6	5,6	6,6

¹Cada repetição realizada com um grupo de 5 sementes.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%.

1968; SUMMERFIELD *et al.*, 1977; HUXLEY, 1980; MINCHIN *et al.*, 1981) de que a aplicação de uma pequena dose inicial de nitrogênio pode ser muito favorável ao desenvolvimento inicial das plantas hospedeiras, diminuindo o período inicial de deficiência de nitrogênio que se prolonga até o estabelecimento dos sistemas simbióticos. Em consequência disso, as plantas corresponderam com o envio de maiores quantidades de fotossintatos aos nódulos, havendo um aumento nas taxas de fixação de N_2 e também da matéria seca e quantidade de nitrogênio total das plantas, como discutido anteriormente.

4.1.4. Percentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (átomos % ^{15}N , % NPPF e % NPPS)

As abundâncias de ^{15}N (átomos %) na parte aérea das plantas leguminosas e controles nas diferentes épocas de coleta encontram-se na Tabela 8.

Pela tabela 8 vê-se que as abundâncias de ^{15}N das culturas fixadoras, foram sempre menores que as dos controles, em todas as épocas de coleta com exceção da época 17 DAS onde só a soja não nodulante apresentou menor valor (2,125 átomos % ^{15}N).

O fato das culturas fixadoras apresentarem, de um modo geral, menores valores de átomos % ^{15}N que as controles, caracteriza a diluição do N absorvido do solo (N-nativo do solo e ^{15}N -fertilizante) devido o N proveniente da fixação. Para as plantas fixadoras o N_2 fixado faz com que a razão isotópica $^{15}N/^{14}N$ apresente-se mais baixa que nos controles, caracterizando a base do método de diluição isotópica para

Tabela 8. Abundância de ^{15}N na parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	Dias Após a Semeadura						Média por cultura		
	17	24	31	38	47	58		68	78
----- Átomos % ¹⁵ N -----									
FIXADORAS									
Caupi	2,480aA	1,807bB	0,876cB	0,665cdB	0,533dB	0,498dB	0,552dB	0,503dB	0,989B
Feijão	2,557aA	2,288aA	1,599bA	1,048cA	0,783cA	0,858cA	0,799cA	0,888cA	1,352A
Teste F culturas	= **								
Teste F épocas x culturas	= **								
CV	= 10,0%								
----- VAZENS -----									
	¹ C					0,433a B	0,455aB	0,440aB	0,443B
	² F					0,544abA	0,524bA	0,572aA	0,547A
Teste F culturas	= **								
Teste F épocas x culturas	= NS								
CV	= 4,0%								
----- TOTAL -----									
Arroz	4,144aA	2,823b	2,499cA	2,308cd	2,219de	2,111deA	2,090de	2,040eA	
Soja não nod.	2,125bB	2,371aA				2,028b A		2,055bA	
Arroz : Teste F	= **								
CV	= 3,5%								
Arroz e soja não nodulante : Teste F culturas = **									
Teste F épocas x culturas = **									
CV	= 3,2%								

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas.

$^1\text{CAUPI}$ $^2\text{FEIJÃO}$ $^3\text{SOJA NÃO NODULANTE}$

quantificação do N_2 proveniente da atmosfera (McAULIFFE *et al.*, 1958; FRIED MIDDELBOE, 1977; BROADBENT *et al.*, 1982; RENNIE & RENNIE, 1983; HARDARSON & DANSO, 1990; TRIVELIN & BOARETTO, no prelo).

Segundo WITTY & RITZ (1984); JENSEN (1986); WITTY & GILLER (1991) a quantidade de N da semente pode ser considerada nos estudos com diluição isotópica do ^{15}N , principalmente nas colheitas iniciais. Se o nitrogênio não marcado da semente de soja não nodulante do presente estudo, representou uma grande fração do N total na colheita inicial de 17 DAS, sugere-se então que este reduziu ainda mais o enriquecimento de ^{15}N fornecendo valores de átomos % ^{15}N inferior aos das plantulas de caupi e feijão (Tabela 8).

Observando os dados apresentados pelas plantas controles (Tabela 8), vê-se que não houve diferença estatística na concentração de ^{15}N em ambas culturas (arroz e soja não nodulante) aos 31, 58 e 78 DAS e de um modo geral evidenciaram percentagens de átomos de ^{15}N maiores do que das plantas fixadoras. Nas plantas controles a ausência de fixação biológica do N fez com que apresentassem maiores valores de abundância de ^{15}N .

Entre as culturas fixadoras, o feijão foi o que apresentou maior valor médio (1,352 átomos % ^{15}N) seguido pelo caupi (0,989 átomos % ^{15}N , Tabela 8). Esses resultados concordam com os obtidos por BASANTES MORALES (1990) em seu estudo sobre diferentes densidades de plantas, onde observou entre as culturas fixadoras, que o feijoeiro apresentou o maior valor médio (1,077 átomos % ^{15}N) seguido pela soja e o caupi (0,934 e 0,800 átomos % ^{15}N , respectivamente). Esse autor constatou que o N-fixado pela primeira cultura foi inferior as duas

últimas.

O menor valor na média por cultura de abundância de ^{15}N (átomos %) no caupi com relação ao feijão estaria indicando que a primeira, ou absorveu menos do ^{15}N -fertilizante, o que não é verificado em termos de quantidade de N proveniente do fertilizante (QNPPF) (Tabela 12) ou mais provavelmente a quantidade de N fixado foi maior que o feijão (como veremos posteriormente), já que o ^{14}N proveniente da atmosfera com abundância natural de ^{15}N favoreceu a diluição da concentração do ^{15}N da parte aérea do caupi. Observa-se ainda que ocorreram diferenças nas médias de abundância de ^{15}N entre as duas culturas, em quase todas épocas de coletas, a exceção foi aos 17 DAS.

De acordo com a Tabela 9, percebe-se que os enriquecimentos de ^{15}N das vagens nas três colheitas finais (58, 68 e 78 DAS) foram menores do que a parte aérea das duas leguminosas em estudo (caupi e feijão), embora sem diferenças estatísticas significativas. Assim esses resultados se assemelham com àqueles obtidos por ZAPATA *et al.* (1987a) onde indicaram que plantas de soja crescidas em solos enriquecidos com ^{15}N frequentemente encerram menores concentrações de ^{15}N nas vagens do que na parte aérea. Segundo DANSO & KUMARASINGUE (1990), analisando resultados experimentais com soja, encontraram diferenças significativas nas concentrações de ^{15}N nos diferentes órgãos, geralmente nódulos < vagens < raízes < parte aérea. Em plantas de ervilha JENSEN (1986) observou a seguinte ordem: caule + folhas > casca > sementes.

A alta mobilidade e dinâmica dos compostos nitrogenados dentro das plantas explicaria a pouca variação na composição isotópica do N (Tabela 9) entre a parte aérea e vagens de

Tabela 9. Abundância de ^{15}N na parte aérea e vagens de caupi e feijão, em função das épocas reprodutivas (Média de 3 repetições).

CULTURA		DIAS APÓS A SEMEADURA		
		58	68	78
		Átomos % ¹⁵ N		
Caupi	Parte Aérea	0,498a	0,552a	0,503a
	Vagens	0,433a	0,455a	0,440a
Teste F épocas x órgãos = NS				
CV = 2,8%				
Feijão	Parte Aérea	0,858a	0,799a	0,888a
	Vagens	0,544a	0,524a	0,572a
Teste F épocas x órgãos = NS				
CV = 5,6%				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

ambas as leguminosas (caupi e feijão).

Na Tabela 10 são apresentados os dados médios das percentagens de nitrogênio nas plantas proveniente do fertilizante (%NPPF), obtidos por meio da equação 7 nas diferentes épocas de amostragens. Foram encontradas variações significativas (Teste F significativo a 1% de probabilidade) entre as épocas para a parte aérea de todas as culturas (fixadoras e controles), com exceção das vagens de caupi e feijão.

Tabela 10. Percentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante (%NPPF) na parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	Dias Após Semeadura							Média por cultura	
	17	24	31	38	47	58	68		78
FIXADORAS									
Caupi ¹	21,95aA	14,95ab	5,29cB	3,10cdB	1,73 dB	1,33dB	1,59dA	1,22dB	6,40B
Feijão	22,74aA	19,95aA	12,79bA	7,08c A	4,32cdA	3,40dA	2,96dA	3,55dA	9,60A
	22,35a	17,45b	9,04c	5,09d	3,03de	2,37e	2,28e	2,39e	
	MÉDIA								
Teste F épocas	= **								
Teste F culturas	= **								
Teste F interação	= **								
CV	= 14,6%								
	<div><div><div>2^c</div><div>3^F</div></div><div><div>0,69 aB</div><div>1,85abA</div><div>Teste F culturas</div><div>Teste F épocas x culturas = NS</div><div>CV</div></div><div><div>0,92aB</div><div>1,63bA</div><div>= **</div><div>= 15,5%</div></div></div>								<div>VAGENS</div> <div>0,77aB</div> <div>2,13aA</div> <div>= **</div> <div>= 15,5%</div>
	TOTAL								
CONTROLES									
Arroz	39,22aA	25,50b	22,14cA	20,16cd	19,23de	18,11deA	17,89de	17,37eA	
Soja não nod. ⁴	18,26bB		20,81aA			17,25bA		17,53bA	
	Arroz : Teste F = **								
	CV = 4,1%								
	Soja não nodulante : Teste F épocas x culturas = **								
	CV = 3,7%								
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.									
Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas.									
¹ Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)									
<div><div>2^{CAUPI}</div><div>3^{FEIJÃO}</div><div>4^{SOJA NÃO NODULANTE}</div></div>									

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

²CAUPI ³FEIJÃO ⁴SOJA NÃO NODULANTE

Nota-se que as médias das percentagens do N nas plantas fixadoras (caupi e feijão) proveniente do fertilizante apresentaram, com exceção dos 17 DAS diferenças significativas entre as duas culturas nos 24, 31, 38, 47, 58 e 78 DAS, de modo semelhante ao ocorrido com os resultados de abundância de ^{15}N (Veja Tabela 8). O feijão acusou maior média de %NPPF por cultura (9,60%) seguido pelo caupi (6,40%). Entre épocas, a máxima %NPPF ocorreu na fase inicial de desenvolvimento de ambas as culturas (17 DAS) sendo 21,95% e 22,74% para caupi e feijão, respectivamente, porém não diferiram estatisticamente entre si.

No que diz respeito a %NPPF do caupi, foram encontradas diferenças significativas (Tukey-5%) entre as épocas 17, 24 e 31 DAS para a parte aérea, havendo uma queda aos 31 DAS período em que a planta começou a utilizar mais o N proveniente da fixação, com objetivo de atender o fluxo de N em direção as vagens nos estádios de crescimento subsequentes.

Vê-se, também, que a %NPPF na parte aérea das plantas de caupi e feijão foram iguais estatisticamente entre as épocas 47, 58, 68 e 78 DAS demonstrando a alta mobilidade do nitrogênio nos órgãos das plantas, principalmente para atender a produção das vagens. As vagens de um modo geral também não apresentaram diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% nas três épocas determinadas, vindo a confirmar o que foi dito anteriormente sobre a dinâmica dos compostos nitrogenados dentro da planta. A alta mobilidade do N, também é justificado pela pouca variação na composição isotópica do N (átomos % ^{15}N) no período de desenvolvimento e maturação das vagens de ambas as culturas (de 58-78 DAS para caupi e 47-78 DAS para feijão).

A redistribuição do N mineral absorvido no período vegetativo nos componentes da planta de vários cultivares de feijão, foi observado por HUNGRIA *et al.* (1985), onde os autores detectaram uma elevada mobilidade do N mineral que se deslocou preferencialmente para as sementes.

Nas épocas 31, 58 e 78 DAS as plantas controles (arroz e soja não nodulante) mostraram praticamente a mesma %NPPF (Tabela 10) assim como pode ser observado pelos valores de % ^{15}N na Tabela 8. Essas observações vêm confirmar que a quantificação da fixação biológica em leguminosas durante esse período em experimentos de vasos, o tipo de planta controle não é uma limitação para o método de diluição isotópica do ^{15}N , como as vezes é constatado em estudos de campo (EDMEADES & GOH, 1979; BROADBENT *et al.*, 1982; WITTY, 1983) onde as plantas controles (soja não nodulante e arroz) poderiam explorar diferentes volumes de solo e conseqüentemente a proporção de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ do solo avaliado nessas culturas poderia diferir daquelas das plantas fixadoras.

De acordo com os valores da tabela 10, exceto durante os estádios de crescimento vegetativo de caupi (17 e 24 DAS) e feijão (17, 24 e 31 DAS), em que o N-fertilizante contribuiu com aproximadamente 12 a 23% do N total das plantas, a dose de N de 10 ppm aplicada em cada vaso teve pequena contribuição para nutrição dessas leguminosas. Não houve diferenças significativas entre as médias de caupi a partir do estágio de 38 DAS até a maturação fisiológica (78 DAS). O mesmo aconteceu com as médias de feijão no período compreendido entre 47 e 78 DAS. Em ensaios com soja em condições de campo ZAPATA *et al.* (1987a) verificaram que o N-fertilizante (numa

dose de 33 kg N/ha) contribuiu com aproximadamente 15% do N-total da planta durante o estágio de crescimento vegetativo e por somente 2,5% do N-total na maturidade fisiológica.

AWONAIKE *et al.* (1991) constataram que o ^{15}N -fertilizante aplicado (20 kg N/ha) respondeu por apenas uma pequena porção do N-total de caupi cv. Ife Brown em qualquer estágio de desenvolvimento e foi menor que 5 kg N/ha ou 3% do N-total acumulado na colheita final.

Calculando-se as médias dos grupos de culturas leguminosas e controles pelos valores da Tabela 10 e comparando-as diretamente sem artifício estatístico, percebe-se que as plantas fixadoras apresentaram o menor valor médio das duas culturas (8%) frente ao valor médio das duas plantas controles (20,45%). Isto significa que nos controles o N-fertilizante contribuiu com cerca de 2,6 vezes mais do N-total que nas fixadoras.

As percentagens de N proveniente do solo (%NPPS) na parte aérea das plantas leguminosas e controles nas diferentes épocas de coleta encontram-se na Tabela 11.

Considerando arroz como controle, as maiores contribuições do N do solo ao nitrogênio total da parte aérea de caupi ocorreram nas épocas 17 e 24 DAS correspondendo a 34,01 e 43,67% respectivamente. Essa relativa contribuição diminuiu com as sucessivas épocas de coleta (31 e 38 DAS), sendo que a época 38 DAS correspondeu ao período de pré-floração e aumento considerável da fixação biológica para atender a fase reprodutiva da planta. Logo em seguida praticamente os valores de %NPPS foram estabilizados. Esses resultados estão relacionados com as observações dos estudos realizados

Tabela 11. Percentagem de N proveniente do solo (%NPPS) na parte aérea de caupi, feijão, arroz e soja não nodulante em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

Fixadoras	Controles	Dias Após Semeadura								Média por Cultura	
		17	24	31	38	47	58	68	78		
caupi	Arroz	8									
		TOTAL									
		34,01a A	43,67aB	18,61bB	12,29bcB	7,27c B	6,02cB	7,29cA	5,78cB	16,87B	
		35,14bcA	58,28aA	45,00bA	28,04cdA	18,15deA	15,37eA	13,59eA	16,86eA	28,80A	
		Média									
		34,58b	50,98a	31,81b	20,17c	12,71d	10,70d	10,44d	11,32d		
		Teste F épocas	= **								
		Teste F culturas	= **								
		Teste F interação	= **								
		CV	= 16,7%								
caupi	Soja não nodulante	TOTAL									
		-	-	19,67aB	-	-	6,39bB	-	5,72bB	10,59B	
		-	-	48,67aA	-	-	16,31bA	-	16,68bA	27,22A	
		MÉDIA									
		-	-	34,17a	-	-	11,35b	-	11,20b		
		Teste F épocas	= **								
		Teste F culturas	= **								
		Teste F interação	= **								
		CV	= 25,0%								
		caupi	Soja não nodulante	TOTAL							
60,78eB	74,50d			77,86cA	79,84bc	80,77ab	81,89aba	82,11ab	82,63aA		
81,74aA				79,19bA			82,75aA		82,47aA		
Média											
Arroz: Teste F = **											
CV = 1,2%											
Arroz e soja não nodulante: Teste F épocas x culturas = **											
CV = 1,02%											
TOTAL											
MÉDIA											
VAGENS											
C	3,32aB	3,62aB	3,62aB	3,62aB	3,62aB	3,62aB	3,62aB	3,62aB	3,47B		
F	8,86aA	10,05aA	10,05aA	10,05aA	10,05aA	10,05aA	10,05aA	10,05aA	9,46A		
Teste F épocas	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **	Teste F épocas = **			
Teste F épocas x culturas	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS	Teste F épocas x culturas = NS			
CV	= 15,9%										

por AWONAIKE *et al.* (1991), de que o N do solo, em contraste ao nitrogênio proveniente da atmosfera, foi a mais importante fonte de N do caupi (cv. Ife Brown) durante o crescimento vegetativo, diminuindo significativamente durante os estádios reprodutivos quando o nitrogênio fixado aumentou até a colheita final.

Pela Tabela 11 vê-se que as maiores %NPPS na parte aérea do feijão (cv. Carioca) (arroz como controle) ocorreram no período vegetativo de 17 a 31 DAS, diminuindo nas épocas posteriores. Esses decréscimos nos valores de %NPPS para feijão assim como para caupi estão relacionados, tanto com o aumento da fixação, como o decréscimo da quantidade do N-nativo disponível do solo. Tais resultados reforçarão os encontrados em caupi por AWONAIKE *et al.* (1991) e em soja por ZAPATA *et al.* (1987a) que observaram uma tendência similar, e atribuíram o importante decréscimo no nitrogênio proveniente do solo no período final de crescimento ao insuficiente nitrogênio do solo para o crescimento das culturas. RENNIE & KEMP (1984) constataram que a %NPPS foi a principal contribuição para o N-total durante o crescimento inicial de plantas de feijão até que a fixação do N₂ foi incrementada.

Nos estudos com feijão fava em condições de campo, ZAPATA *et al.* (1987b) observaram que na maturidade fisiológica (126 dias após o plantio), a cultura tinha acumulado 209 kg N/ha, do qual 79% foi proveniente da fixação, aproximadamente 20% do solo e apenas 1% do fertilizante (dose de 20 kg N/ha).

É sabido que a demanda de N para o desenvolvimento das vagens de leguminosas é alto (EAGLESHAM *et al.*, 1977; EAGLESHAM *et al.*, 1982a; WESTERMANN *et al.*, 1985; ZAPATA *et al.*, 1987a). No presente estudo as vagens de caupi e feijão continham

aproximadamente 4 e 9% NPPS, respectivamente (Tabela 11). Praticamente não houve diferenças significativas entre as médias de %NPPS nas três épocas estudadas (58, 68 e 78 DAS). Nesta fase, as baixas contribuições relativas de %NPPS e %NPPF para o N-total das vagens evidenciam que a maior fonte de N para formação desses órgãos foi o N proveniente da fixação.

Entre as plantas controles (Tabela 11) não foi observado diferenças na %NPPS, nas épocas 31, 58 e 78 DAS, no entanto, aos 17 DAS houve uma diferença significativa (Tukey a 5%) entre as médias do arroz (60,78%) e soja não nodulante (81,74%). O maior valor de %NPPS obtido pela soja não nodulante se deve possivelmente ao maior desenvolvimento do seu sistema radicular promovendo maior absorção do N do solo em relação ao arroz. Por ter germinação epígea, as plântulas de soja não nodulante foram coletadas aos 17 DAS juntamente com seus cotilédones (o contrário do arroz) o que pode também ter contribuído para aumentar os valores de %NPPS, pois em plantas não nodulantes o N contido nas sementes é indistinguível do N na planta proveniente do solo. No caso da soja não nodulante o teor de nitrogênio presente nas sementes antes da semeadura foi de 4,85% (Tabela 7, sub-ítem 4.1.3.).

Os resultados de %NPPS aos 17 DAS (Tabela 11) para plantas fixadoras (feijão e caupi) e controle (soja não nodulante), as primeiras dependente da segunda, confirmam as observações de DANSO & KUMARASINGHE (1990) de que como deve ser crítico e difícil a escolha da cultura referência nas colheitas iniciais ou quando o N₂ fixado pelas plantas leguminosas é baixo. Isso foi observado também por outros pesquisadores (WITTY & RITZ, 1984; WITTY & GILLER, 1991).

4.1.5. Quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (QNPPF e QNPPS)

Na Tabela 12 são apresentados os dados médios da quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) expressadas em mg N/planta nas oito épocas de coleta (obtidas por meio da equação 8), baseada na quantidade de N-total e o valor da percentagem do nitrogênio proveniente do fertilizante).

Com relação a QNPPF, observa-se que esta não variou entre as épocas para parte aérea e vagens em separado das culturas fixadoras. Entretanto nas controles houve uma variação significativa ($F \leq 0,01$). Pelos dados disponíveis, a variação ocorreu até 31 DAS para arroz e soja não nodulante e permaneceram sem variação nos períodos subsequentes até a colheita final (78 DAS).

Os resultados de média por cultura da Tabela 12 indicam que o caupi apresentou uma maior QNPPF (9,50 mg N/planta) diferindo estatisticamente (Tukey - 5%) em relação ao feijão (8,81 mg N/planta). A maior quantidade de N na planta de caupi proveniente do fertilizante comparada a do feijão, associada ao resultado de QNT (Tabela 6) está indicando que essa cultura pode obter além do N-fertilizante mais nitrogênio de outras fontes tais como N-nativo do solo e/ou N-fixação simbiótica durante o seu crescimento. Todavia considerando a QNPPF que foi destinada às vagens, o feijão superou significativamente o caupi nas médias por cultura da fase produtiva dessas leguminosas (de 58 a 78 DAS), sugerindo maior aproveitamento do N-fertilizante para as vagens pelo feijoeiro.

Tabela 12. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (mg/planta) na parte aérea das plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

CULTURA	Dias Após a Semeadura					Média por Cultura				
	17	24	31	38	47	58	68	78		
FIXADORES										
Caupi	10,33aba	10,31aba	10,11aba	8,60aba	8,62aba	8,73aba	10,73aa	8,54ba	9,50A	
Feijão	11,16a A	9,58aba	8,31b B	8,39b A	8,47b A	7,52 ba	8,72bb	8,36ba	8,81B	
	10,75a	9,95ab	9,21bc	8,50bc	8,55bc	8,13c	9,73ab	8,45bc		
Teste F épocas	= **									
Teste F culturas	= **									
Teste F interação	=NS									
CV	= 8,8%									
	MÉDIA					VAGENS				
	TOTAL					2 C	0,26bb	2,22aa	1,69aba	1,39B
						3 F	2,16aa	2,67aa	2,86a A	2,57A
						Teste F culturas = **				
						Teste F épocas x culturas = NS				
						CV = 44,0%				
CONTROLES										
Arroz	1,09db	2,69c	4,64db	8,13a	8,32a	8,31aa	9,14a	8,95aA	5,75B	
Soja não nodulante	4,70ca		10,86aa			8,42ba		8,21bB	8,05A	
	TOTAL									
Arroz: Teste F	= **									
CV	= 6,1%									
Arroz e soja não nodulante: Teste F culturas	= **									
Teste F épocas x culturas	= **									
CV	= 5,0%									

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às linhas e maiúsculas às colunas.

¹ parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

² CAUPI

³ FEIJÃO

Houve uma variação significativa ($F \leq 0,01$) com relação a QNPPF (mg N/planta) dentro das épocas para a parte aérea das culturas fixadoras e controles com exceção das vagens de caupi e feijão. As diferenças entre as médias de caupi e feijão ocorreram nas épocas 31 e 68 DAS não diferindo nas demais.

Analisando os resultados obtidos na parte aérea de feijão no estágio vegetativo inicial (17-24 DAS), verifica-se que esses valores não apresentaram diferenças significativas entre si durante esse período. O valor máximo de QNPPF ocorrido aos 17 DAS (11,16 mg N/planta) diferiu das seis últimas épocas de coleta e correspondeu a aproximadamente 67% do N-fertilizante aplicado/planta e 22,74% do N total absorvido até aquele período. Apesar da pequena dose aplicada no início do experimento (50 mg N/vaso), o fertilizante foi uma das importantes fontes de N durante o início da fase vegetativa (17 DAS) diminuindo significativamente no final do ciclo da cultura (78 DAS) onde o valor da QNPPF foi da ordem de 3,55% do N-total.

Os resultados apresentados pela Figura 8A evidenciam o efeito das épocas na quantidade do N nas plantas de caupi e feijão proveniente do fertilizante em mg/planta, que diminui de forma linear com o decorrer do tempo, indicando translocação do N-fertilizante para as vagens.

Pelos resultados de média por cultura das plantas controles, observa-se que houve diferença estatística entre elas, ou seja, a soja não nodulante apresentou o maior valor médio de QNPPF (8,05 mg/planta) seguido pelo arroz (5,75 mg/planta) (Tabela 12). De acordo com a Figura 8B, a tendência de variação da QNPPF para as culturas de arroz e soja não nodulante foi de ordem quadrática, sendo que a soja não

* soja não nodulante

Figura 8. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (mg/planta) na parte aérea das culturas fixadoras (A) e controles (B), em função das épocas de coleta.

nodulante apresentou uma tendência crescente no início do experimento vindo a diminuir pronunciadamente no final do ciclo. Isso pode ser explicado pela diminuição da quantidade do N-fertilizante disponível no solo na fase final de crescimento e pela diluição do N com o aumento da massa seca dessa isolinha não nodulante (Tabelas 12 e 5).

Na Tabela 13 são apresentados os dados médios da quantidade de nitrogênio proveniente do solo (QNPPS) expressadas em mg N/planta nas oito épocas de coleta (obtidas por meio da equação 12).

Considerando arroz como controle, percebe-se que houve uma variação crescente nos valores da QNPPS da parte aérea total de caupi e feijão (ramos + folhas + pecíolos + pedúnculos + vagens) até o estágio de 68 DAS. O maior valor obtido para caupi foi aos 68 DAS (49,25 mg N/planta) e o menor aos 17 DAS (16,01 mg/planta). Cada uma dessas médias diferiram pelo teste Tukey-5% de todas as demais. Em termos relativos a QNPPS média obtida aos 17 DAS para ambas leguminosas (17,31 mg N/planta) contribuiu com aproximadamente 35% do N-total naquele período (Tabelas 11 e 13) enquanto que o valor médio da QNPPS aos 78 DAS de 40,16 mg N/planta foi apenas 11% do N-total. Isso confirma o que foi discutido anteriormente de que o N do solo foi a fonte mais importante durante o crescimento vegetativo inicial dessas leguminosas. O decréscimo do N-nativo do solo e o aumento da fixação na fase final de crescimento (fase reprodutiva) explica a baixa contribuição relativa do N do solo para a QNT do caupi e do feijão. Segundo DEKHUIJZEN & VERKERKE (1984) e WERY *et al.* (1986) sempre que o N do solo é abundante, este é assimilado em preferência ao N da fixação, enquanto que o N-fixado é a maior fonte de nitrogênio logo que o N do solo torna-se limitante.

De um modo geral aos 78 DAS o N-nativo do solo pouco contribuiu para o desenvolvimento das vagens de ambas as leguminosas (Tabela 13). Assume-se que a média de 8,02 mg N/planta para vagens do caupi representou menos que 4% do nitrogênio total contido nas sementes, entretanto superior a QNPPF que foi de 1,69 mg N/planta (cerca de 0,77% do N-total) (Tabelas 10 e 13). A média de 13,62% mg N/planta obtida pelas vagens de feijão representou 10,15% do N-total, também superior a QNPPF de 2,86 mg N/planta (cerca de 2,13% do N-total).

Estes valores demonstram que pouco N do fertilizante e nativo do solo foi mobilizado das partes vegetativas para os órgãos reprodutivos, sugerindo que a maior contribuição para o N-total das vagens de ambas leguminosas (caupi e feijão), foi realmente a fixação biológica do nitrogênio. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por ZAPATA *et al.* (1987a) e AWONAIKE *et al.* (1991).

Entre as plantas controles (Tabela 13) não foi observado diferenças na QNPPS nas épocas 58 e 78 DAS, todavia, aos 17 e 31 DAS houve diferenças significativas (Tukey a 5%) entre as médias do arroz e soja não nodulante. Considerando a influência do N dos cotilédones nos resultados de QNPPS para soja não nodulante, como discutido anteriormente pelos valores de %NPPS, e também pelo seu melhor desenvolvimento radicular sugere-se que são as principais causas da superioridade da QNPPS dessa isolinha frente ao arroz nos estádios iniciais de crescimento.

Comparando-se as médias de QNPPF de todos os cultivares (Tabela 12) sem uso da estatística à partir dos 38 DAS, observa-se de um modo geral, que as culturas de arroz e soja não

nodulante absorveram praticamente as mesmas quantidades de N-fertilizante que as fixadoras (caupi e feijão) e portanto, deveriam absorver também quantidades muito próximas de N do solo (como pode ser observado na Tabela 13) o que satisfaria o princípio básico do método da diluição isotópica (McAULIFFE *et al.*, 1958; FRIED & MIDDELBOE, 1977; BROADBENT *et al.*, 1982; RENNIE & RENNIE, 1983; HARDARSON & DANSO, 1990; TRIVELIN & BOARETTO, no prelo) na quantificação da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas, onde plantas fixadoras e controles devem apresentar a mesma proporção de nitrogênio proveniente do solo e fertilizante:

$$(NPPS/NPPF)_{\text{leguminosa fixadora}} = (NPPS/NPPF)_{\text{controle}}$$

Pelo critério de similaridades das médias de QNPPF e QNPPS, as plantas controles soja não nodulante (a partir de 58 DAS) e arroz (a partir de 38 DAS) são adequadas para estimar a quantidade de N₂ fixado em caupi e feijão em condições de vaso. As condições de vaso fizeram com que o sistema radicular dessas plantas explorassem o volume disponível de solo de tal forma que permitiu a absorção do ¹⁵N que estava distribuído uniformemente por todo vaso, não provocando situações como mencionadas por EDMEADES & GOH (1979); VOSE & VICTORIA (1986); Peoples¹ *et al.* (1989) citados por PEOPLES & HERRIDGE (1990); PEOPLES & HERRIDGE (1990); WATANABE (1991), onde em condições de campo, os sistemas radiculares das plantas explorando diferentes volumes de solo ou profundidades, poderiam mostrar a mesma QNPPF, mas com diferentes QNPPS, e por

¹ PEOPLES, M.B.; FAIZAR, A.W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D.F., ed.. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. p.76. Monograph n. 11, ACIAR, 1989.

Tabela 14. Eficiência de utilização do N-fertilizante (EUF) na parte aérea de plantas fixadoras e controles, em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	Dias Após a Semeadura						Média por Cultura
	17	24	31	38	47	78	
FIXADORAS							
Caupi	61,97abA	61,87abA	60,65abA	51,61abA	51,75abA	52,38abA	56,98A
Feijão	66,99a A	57,47abA	49,84 bB	50,36 bA	50,82 bA	45,12 bA	52,89B
	MÉDIA						
64,48a	59,67ab	55,25 bc	50,99 bc	51,29 bc	48,75c	58,37ab	50,67bc
Teste F épocas	= **						
Teste F culturas	= **						
Teste F interação	= NS						
CV	= 8,8%						
VAGENS							

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

²CAUPI

não houve variação significativa com as épocas de amostragens. Aos 68 DAS o caupi e feijão obtiveram as maiores eficiências de utilização do fertilizante, 64,4% e 52,34% respectivamente, indicando que a cultura do caupi foi mais eficiente em utilizar o fertilizante na fase de maturação fisiológica. Todavia, a utilização do N-fertilizante para os órgãos reprodutivos foi maior para o feijoeiro (15,40%) superando o caupi que alcançou apenas 8,33% (veja média por cultura, vagens, Tabela 14). Observa-se que as vagens de feijão na maturidade fisiológica (78 DAS) teve uma EUF de 17,19% acumulando 2,86 mg/planta de N proveniente do fertilizante (2,13% do N-total acumulado pelas vagens), significando que cerca de 34,25% da QNPPF absorvida pela cultura nessa época (8,35 mg N/planta, Tabela 12), foi exportada para as vagens.

Observando a tabela 14 verifica-se que no estágio de crescimento vegetativo (17-24 DAS) houve uma alta utilização do fertilizante nitrogenado (EUF) pelo feijoeiro, discordando dos resultados de campo obtidos por MEIRELLES *et al.* (1980) onde observaram que no primeiro estágio de desenvolvimento da cultura de feijão cv. Mulatinho (até os 20 dias após a germinação) houve uma alta percentagem de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (68,74%), porém com baixo aproveitamento (6,62%) devido ao pequeno porte da cultura. De acordo com a Tabela 12 observa-se que a quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante para o feijão, decresceu da primeira para a terceira época de amostragem, permanecendo constante a partir daí até a colheita final. O mesmo aconteceu com a EUF. O pequeno decréscimo da QNPPF após o período de crescimento vegetativo (17-24 DAS) está relacionado com a diminuição do teor de N-fertilizante contido no volume de terra do vaso e também pelo aumento da absorção do N

proveniente do solo e do sistema simbiótico. Apesar dos pequenos decréscimos da EUF e QNPPF, os valores da EUF continuaram altos (em torno de 50%) até o final do ciclo.

4.1.7. Quantificação da fixação do nitrogênio em leguminosas por diluição isotópica.

4.1.7.1. Percentagem de N nas leguminosas proveniente da fixação ($\%N_{fix}$)

Os resultados de percentagem de nitrogênio fixado ($\%N_{fix}$) nas duas culturas fixadoras caupi e feijão em função das diferentes épocas de coleta são apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Verifica-se pela Tabela 16, que as percentagens de N fixado pelo feijão e caupi nas épocas 31, 58 e 78 DAS não diferiram, quando utilizou-se soja não nodulante e arroz como plantas controles. Destes resultados pode-se afirmar que em condições experimentais de vaso, a determinação da percentagem de N-fixado das culturas fixadoras no período de 31 a 78 DAS, as plantas controles não influenciaram nos resultados, ambas comportando-se como bons controles, independente de apresentarem-se em estágio fisiológico distintos, como já abordado anteriormente. Isto significa que, em termos de aproveitamento, as duas culturas controles absorveram nitrogênio do solo: N-fertilizante + N-nativo do solo em mesma proporção das culturas fixadoras, durante esse período. Isso foi confirmado pelos resultados das Tabelas 8, 10 e 11 onde as culturas controles apresentaram valores similares entre elas na abundância de ^{15}N (átomos %), percentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante e do solo aos 31, 58 e 78 DAS. Esses resultados são

Tabela 15. Percentagem de N proveniente da fixação (%N_{fix}) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

FIXADORAS	CONTROLES	Dias Após a Semeadura						Média por Cultura	
		17	24	31	38	47	58		68
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		44,05cA	41,38cA	76,10bA	84,60abA	91,00a A	92,64aA	91,12aA	93,01aA
		42,02cA	21,78dB	42,21cB	64,89b B	77,53abB	81,23aB	83,45aA	79,59aB
		MÉDIA							
		43,04d	31,58e	59,16c	74,75b	84,27a	86,94a	87,29a	86,30a
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,2%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Soja não nod. ⁵	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							
		VAGENS							
Caupi Feijão	Arroz	% TOTAL							
		-	-	74,58bA	-	-	92,27aA	93,07aA	86,64A
		-	-	38,54bB	-	-	80,29aB	79,76aB	66,20B
		MÉDIA							
		-	-	56,56b	-	-	86,28a	86,42a	-
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 7,7%							

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

²CAUPI

³FEIJÃO

⁴VALORES NEGATIVOS

⁵SOJA NÃO NODULANTE

Tabela 16. Percentagem de N proveniente da fixação (%N_{fix.}) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta, comuns às duas plantas controles. (Média de 3 repetições).

FIXADORAS	CONTROLES	Dias Após a Semeadura			
		17	31	58	78
		%			
Caupi	Arroz	44,05	76,10a	92,64a	93,01a
	Soja não Nodulante	¹ -	74,58a	92,27a	93,07a
Teste F épocas x controles = NS					
CV		= 2,5%			
Feijão	Arroz	42,02	42,21a	81,23a	79,59a
	Soja não Nodulante	-	38,54a	80,29a	79,76a
Teste F épocas x controles = NS					
CV		= 11,5%			

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

¹Valores negativos.

concordantes com os obtidos por BASANTES MORALES (1990) em seu estudo sobre densidade de plantas, onde observou que em geral os dados de $\%N_{fix}$ nas culturas fixadoras (caupi e feijão), indicaram que a soja não nodulante, o arroz e o trigo comportaram-se como bons controles e que a densidade das plantas controles por vaso e o estágio fisiológico das mesmas, não influenciaram nos resultados obtidos no final do experimento (76 dias após a emergência).

Os resultados acima também reforçam as afirmações de TRIVELIN (1982); VOSE & VICTORIA (1986); MURAOKA (1991) de que os experimentos em que plantas fixadoras e não fixadoras são crescidas em vasos, podem haver boas estimativas da fixação de N_2 pelo método da diluição isotópica. Entretanto os valores de N_2 fixado nas plantas simbióticas obtidos quando se usou soja não nodulante foram reduzidos consideravelmente aos 17 DAS culminando em valores negativos de fixação (Tabela 15).

RENNIE (1982) relatou que isolinha de soja não nodulante não foi uma adequada cultura referência para medição do N_2 fixado na soja simbiótica, e recomendou em vez da não nodulante, a soja não inoculada. DANSO & KUMARASINGHE (1990) verificaram aos 36 DAS que estimativas de $\%N_{fix}$ em plantas de soja foram significativamente influenciada por uso de qualquer das isolinhas de soja não nodulante ou não inoculada como controles. Evidenciaram que o ^{15}N na soja não inoculada foi significativamente maior, desse modo avaliando maior fixação de N_2 nas plantas simbióticas do que quando a isolinha não nodulante foi usada. Verificaram também na colheita final (70 DAS) poucos nódulos na planta controle não inoculada (provavelmente de contaminação cruzada) obtendo 18,7% do seu N-total da fixação do N_2 .

Os mesmos autores assinalaram que a medição do N_2 fixado nas plantas simbióticas foram reduzidas aproximadamente quatro vezes por usar a isolinha não nodulante, resultando em alguns valores negativos de fixação de N_2 aos 36 DAS. Nas demais épocas (52 e 70 DAS) as $\%N_{\text{fixado}}$ foram iguais quando usou-se ambas controles.

No presente estudo, entretanto, a única discrepância ocorreu na colheita inicial aos 17 DAS e a cultura referência (soja não nodulante) apresenta-se ser apropriada para medição da QN_{fix} em condições de vaso à partir dos 31 DAS.

Discrepâncias no N_2 fixado em uma determinada leguminosa no campo usando diferentes plantas controles, muitas vezes resultam de diferenças de absorção do $^{15}N/^{14}N$ do solo no qual a proporção $^{15}N/^{14}N$ é rapidamente declinante, como é o caso quando ^{15}N -fertilizante solúveis (tal como uréia e sulfato de amônio) são incorporados ao solo (FRIED *et al.*, 1983; WITTY, 1983). Também, erros atribuíveis às culturas referências tem maior efeito em taxas menores do que em taxas maiores de fixação de N_2 (DANSO, 1988; HARDARSON *et al.*, 1988). Assim, os resultados de $\%N_{\text{fix}}$ (Tabela 15) obtidos por caupi e feijão no período vegetativo de 17 DAS (usando soja não nodulante como controle) enfatizam a importância de que, quando há um baixo nível de fixação de N_2 , os erros estão mais sujeitos a ocorrer. Esses resultados também indicam como é difícil a escolha de uma cultura referência nas colheitas iniciais ou quando o N_2 fixado é baixo.

Um outro fator importante que deve ter contribuído para as discrepâncias no N_2 fixado estimado pelo uso da soja não nodulante na primeira colheita (17 DAS), é o N contido nas sementes. O N da

semente (indistinguível do N_2 fixado nas plantas e do N do solo) também constituiria uma proporção muito mais significativa de N total das plantas nos estádios iniciais de crescimento (e assim causando maiores erros) do que quando o N da semente torna-se crescentemente insignificante nos estádios finais de crescimento das culturas. Isso também é válido para as plantas controles, e que será abordado posteriormente.

Analizando as médias da percentagem de N proveniente da fixação por cultura fixadora, em relação as 8 épocas de crescimento e desenvolvimento apresentadas na Tabela 15, observa-se que o caupi superou o feijão quando o arroz foi a planta controle (76,74% para caupi e 61,59% para feijão), assim como quando a controle foi a soja não nodulante (86,64% para caupi e 66,20% para feijão). É sabido que *Vigna unguiculata* (L.) Walp. apresenta uma nodulação muito superior a de *Phaseolus vulgaris* L., e, correspondentemente, apresenta maior fixação do nitrogênio e níveis mais altos de atividade da nitrogenase (NEVES *et al.*, 1982). Esta afirmação também está respaldada pelos resultados obtidos na Tabela 4 referente ao potencial da atividade da nitrogenase nas duas leguminosas.

Analizando as médias da $\%N_{fix}$ da parte aérea durante as oito épocas estudadas, apresentadas na Tabela 15, observa-se para as duas leguminosas que as médias de $\%N_{fix}$ variaram significativamente em função do tempo (Teste $F \leq 0,01$) quando utilizou-se arroz e soja não nodulante como controles. Para a primeira planta controle (arroz) o caupi e feijão mostraram aumentos com o decorrer dos estádios de crescimento e os maiores valores de $\%N_{fix}$ corresponderam aos 78 DAS e 68 DAS (93,01% e 83,45% para caupi e feijão, respectivamente). Entretanto, estatisticamente essa média do caupi não diferiu das quatro médias

anteriores (38, 47, 58 e 78 DAS) e a do feijão também não diferiu das duas épocas anteriores (47 e 58 DAS) e da posterior (78 DAS). Para a segunda planta controle (soja não nodulante) esses aumentos também ocorreram com o decorrer do tempo.

Os valores máximos de $\%N_{\text{fix}}$ neste experimento para feijoeiro superam os obtidos por FONSECA (1985) e BASANTES MORALES (1990) em cv. Carioca, que encontraram valores aproximadamente de 74% e 67%, respectivamente.

De um modo geral para ambas as leguminosas (caupi e feijão) as percentagens da QN_{fix} foram mais baixas durante o crescimento vegetativo e mais altas entre o início do período reprodutivo (principalmente no enchimento das vagens) e maturidade fisiológica das plantas. Assim, o período de mais alta fixação de N_2 coincidiu com o maior crescimento da planta e demanda de nitrogênio para atender a produção de vagens, sendo os drenos metabólicos preferenciais após seu aparecimento. Aproximadamente 95% do nitrogênio das vagens de caupi foi proveniente da fixação. Valor este superior ao encontrado para feijão que foi de aproximadamente 89% (Tabela 15). Esses dados enfatizam a importância da atividade da fixação durante os processos de desenvolvimento e enchimento das vagens sobre as concentrações de proteínas e aminoácidos das sementes dessas duas leguminosas alimentícias, que é sabido ser alto (FERY, 1981; LANGER & HILL, 1982; LEÓN, 1987), como está demonstrado na Tabela 1 da revisão de literatura.

É importante notar que, a alta percentagem de nitrogênio proveniente da atmosfera medida durante a última fase de crescimento de caupi e feijão, é um reflexo da redução do conteúdo de

N-nativo do solo + N-fertilizante neste período, como abordado anteriormente. Além do mais, serão esperados nódulos mais desenvolvidos e mais funcionais nos estádios reprodutivos do que nos estádios de crescimento vegetativo.

A $\%N_{\text{fix}}$ de 93%, para caupi cv. CNC x 284-4E usado neste experimento (Tabela 15) é tão alto quanto os valores encontrados em outros cultivares (EAGLESHAM *et al.*, 1977; HUXLEY, 1980; LUYINDULA & WEAVER, 1989; AWONAIKE *et al.*, 1991). Portanto, isso demonstra o quanto é extraordinária a capacidade da cv. CNC x 284-4E em fixar o N_2 atmosférico, tornando-a promissora para uso no campo. Em experimento de casa de vegetação utilizando a técnica de diluição isotópica- ^{15}N , ELHASSAN & FOCHT (1986) observaram que plantas de caupi tem uma capacidade de obter 60 a 98% do seu N da fixação simbiótica do N_2 .

4.1.7.2. Quantidade de N na planta proveniente da fixação (QN_{fix}).

As estimativas da quantidade de nitrogênio proveniente da fixação biológica do nitrogênio (QN_{fix}), em mg/planta, nos dois cultivares de leguminosas (caupi e feijão) durante as épocas de coleta estão apresentadas nas Tabelas 17 e 18 e foi calculada utilizando-se a equação 10.

Verifica-se pela Tabela 17, que os resultados da quantidade de nitrogênio proveniente da fixação na parte aérea de caupi e feijão usando arroz e soja não nodulante como controles, variaram estatisticamente com relação às épocas de coleta. O mesmo foi observado para as médias de $\%N_{\text{fix}}$ (Tabela 15).

Tabela 17. Quantidade de N proveniente da fixação (QN_{fix}) (mg/planta) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta (Média de 3 repetições).

FIXADORAS	CONTROLES	Dias Após a Semeadura							Média por Cultura	
		17	24	31	38	47	58	68		78
		mg N/planta								
		TOTAL								
Caupi	Arroz	20,60eA	28,68deA	148,28cdA	234,87cA	A 460,20b	A 609,47a	A 629,36aA	657,21a A	348,58A
		20,64cA	11,07cA	28,97cA	B 84,25bcd	B 152,93abb	B 184,94abb	B 249,36aB	190,87abb	115,38B
		20,62d	19,88d	88,63cd	159,56c	306,57b	397,21a	439,36a	424,04a	
		MÉDIA								
		TESTES								
		Teste F épocas = **								
		Teste F culturas = **								
		Teste F interação = **								
		CV = 19,8%								
		VAGENS								
		² C 36,18bA 231,28aA 210,37aA 159,28A								
		³ F 108,02aA 140,65aA 120,98aA 123,22A								
		Teste F culturas = NS								
		Teste F épocas x culturas = **								
		CV = 37,7%								
		TOTAL								
Caupi	Soja não nod. ⁵	-	-	145,37bA	-	-	607,06aA	657,65aA	470,03A	
		-	-	26,58bB	-	-	182,87aB	191,29aB	133,58B	
		MÉDIA								
		TESTES								
		Teste F épocas = **								
		Teste F culturas = **								
		Teste F interação = **								
		CV = 16,7%								
		VAGENS								
		C 36,11bB 210,45aA 123,28A								
		F 107,42aA 121,13aB 114,28A								
		Teste F culturas = NS								
		Teste F épocas x culturas = **								
		CV = 26,6%								

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

²CAUPI

³FEIJÃO

⁴VALORES NEGATIVOS

⁵SOJA NÃO NODULANTE

Quando usou-se arroz as quantidades de N-fixado no caupi aumentaram com o decorrer do tempo, a semelhança do ocorrido com a quantidade de nitrogênio total (QNT) (Tabela 6) mostrando que o caupi acumulou maior quantidade de N proveniente da fixação (valor médio por cultura de 348,58 mg/planta) seguida pelo feijão (115,38 mg/planta).

A máxima acumulação de N fixado por estas culturas foi no período compreendido entre a floração (47 DAS para caupi; 38 DAS para feijão) até o período mais intenso de enchimento das vagens (58 DAS para caupi; 47 DAS para feijão).

Dos resultados contidos nas Tabelas 17, 13 e 12 verifica-se também, que as culturas fixadoras (caupi e feijão) obtiveram maiores quantidades de N proveniente da fixação que do N-nativo do solo e fertilizante, onde o N derivado do fertilizante representou a menor fração do N-total na planta. O caupi acumulou as maiores quantidades de nitrogênio fixado aos 78 DAS (657,21 e 657,65 mg/planta) quando comparado aos maiores valores médios de fixação acumulados para o feijão aos 68 DAS e 78 DAS (249,36 e 191,29 mg/planta), tendo sido usadas arroz e soja não nodulante como plantas controles, respectivamente para as médias entre parênteses (tabelas 17 e 18).

Os resultados obtidos reforçarão os dados disponíveis de outros estudos de casa-de-vegetação nos quais indicaram que caupi tem uma boa capacidade de fixação de N_2 (EAGLESHAM *et al.*, 1977; PEOPLES *et al.*, 1983; ELHASSAN & FOCHT, 1986; ELOWAD *et al.*, 1987). Isto também foi confirmado a nível de campo (PIHA & MUNNS, 1987; AWONAIKE *et al.*, 1990; AWONAIKE *et al.*, 1991). AWONAIKE *et al.* (1991) observaram na maturidade fisiológica que o

Tabela 18. Quantidade de N proveniente da fixação (QN_{fix}) (mg/planta) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta, comuns às duas controles. (Média de 3 repetições).

FIXADORAS	CONTROLES	DIAS APÓS A SEMEADURA			
		17	31	58	78
		----- mg N/planta -----			
Caupi	Arroz	20,60	148,28a	609,47a	657,21a
	Soja não Nodulante	¹ -	145,37a	607,06a	657,65a
Teste F épocas x controles = NS					
CV		= 12,4%			
Feijão	Arroz	20,64	28,97a	184,94a	190,87a
	Soja não Nodulante	-	26,58a	182,87a	191,29a
Teste F épocas x controles = NS					
CV		= 25,6%			

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

¹Valores negativos.

N total da planta de caupi constituiu de 100, 50 e 5 kg N.ha⁻¹ como QN_{fix}, QNPPS e QNPPF, respectivamente. Na presente pesquisa os valores estimados de QN_{fix} para caupi e feijão nessa fase foram aproximadamente de 197 e 57 kg N.ha⁻¹, respectivamente (Tabela 19).

A utilização do N₂ atmosférico como fonte de N do caupi cv. CNC x 284-4E, fornecido pela associação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (CM 1528 31-3) em condições de casa-de-vegetação, mostrou para este genótipo grande potencialidade de substituir parcial ou totalmente a adubação nitrogenada. São porém, necessários testá-los em condições de campo, com e sem adubação de arranque, antes de recomendar-se sua utilização a nível de agricultura comercial.

Na Figura 9B (quantidades de N-fixado das duas culturas fixadoras, usando arroz como controle, em função das épocas de coleta) observa-se que o feijoeiro mostra uma variação de ordem quadrática pouco apreciável, o contrário do caupi, onde a variação foi bem mais significativa, como ocorreu com a massa seca e quantidade de N-total (Figuras 6 e 7). Houve poucas diferenças na variação quadrática de %N_{fix} (Figura 9A), todavia, nesse parâmetro, o caupi também superou o feijão.

Em geral (Figuras 9A e B), a fixação aumentou durante o período vegetativo (17-38 DAS para caupi; 17-31 DAS para feijão), frequentemente se estendendo até o início do período reprodutivo (58 DAS para caupi; 47 DAS para feijão), ocorrendo depois uma estabilização a partir do estágio que coincide com o final de enchimento dos grãos e maturação das vagens.

Tabela 19. Quantidade de N proveniente da fixação (QN_{fix}) (Kg/ha) na parte aérea de caupi e feijão em função dos dias de coleta. (Média de 3 repetições).

FIXADORAS	CONTROLES	Dias Após a Semeadura							Média por Cultura
		17	24	31	38	47	58	68	
		kg N/ha							
		TOTAL							
Caupi Feijão	Arroz	6,2eA	8,6deA	44,5odA	70,4c A	138,0b A	182,8a A	188,9aA	197,1a A
		6,2cA	3,3c A	8,7c B	25,3bcB	45,9abb	55,5abb	74,8aB	57,2abB
		MÉDIA							
		6,2d	6,0d	26,6cd	47,9c	92,0b	119,2a	131,9a	127,2a
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 19,8%							
		TOTAL							
Caupi Feijão	Soja não nod. ¹	-	-	43,6bA	-	-	182,1aA	-	197,3aA
		-	-	8,0bB	-	-	54,8aB	-	57,4aB
		MÉDIA							
		-	-	25,8b	-	-	118,5a	-	127,4a
		Teste F épocas = **							
		Teste F culturas = **							
		Teste F interação = **							
		CV = 16,7%							

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às linhas e as maiúsculas às colunas

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

²Valores negativos ³Soja não nodulante

Figura 9. Percentagem (A) (%N_{fix}) e quantidade (B) de nitrogênio proveniente da fixação (QN_{fix}) (mg/planta) na parte aérea das culturas fixadoras em função das épocas de coleta.

As maiores acumulações de QN_{fix} por dia no caupi (25,4 mg/planta) e feijão (7,9 mg/planta) ocorreram durante o intervalo de 38-47 DAS e 31-38 DAS, respectivamente, correspondentes aos períodos de pré-floração de ambas as culturas.

Na colheita inicial (17 DAS), as quantidades de nitrogênio proveniente da atmosfera das culturas fixadoras quando se usou soja não nodulante, resultou em valores negativos de QN_{fix} . (Tabela 17), provavelmente pela influência da contribuição do N não marcado da semente sobre o enriquecimento da plantula controle.

De acordo com a Tabela 7, nota-se que a soja não nodulante possui a maior quantidade de nitrogênio por semente (7,34 mg) embora não havendo diferenças estatísticas com o N da semente de caupi (7,04 mg) e feijão (7,15 mg). Assim, pode ter havido uma maior contribuição do N da semente na soja não nodulante em relação as plantulas de caupi e feijão, diluindo o ^{15}N absorvido do fertilizante (Tabela 8), causando os valores negativos de $\%N_{fix}$ e QN_{fix} aos 17 DAS (Tabelas 15 e 17).

WITTY & GILLER (1991) afirmam que se o N não marcado da semente (da planta controle ou leguminosa) representa uma grande fração do N total no início do experimento, reduzindo o enriquecimento de ^{15}N das plantas.

A contribuição do N da semente para o N-total da planta no final do ciclo tem sido considerado pequena, e por essa razão ignorada quando se estima a fixação de N_2 . Segundo WITTY & GILLER (1991) e HAMILTON *et al.* (1992) a magnitude do erro é maior quando a fixação de N_2 é pequena mas a superestimação do N_2 fixado torna-se menos importante quando a acumulação de N da fixação e do N do solo

excedem grandemente a quantidade proveniente da semente. De acordo com HAMILTON *et al.* (1992) geralmente o N da semente representa menos do que 1% do N-total da parte aérea das plantas nas colheitas finais.

JENSEN *et al.* (1985) sugeriram que a não correção do N da semente nos estádios iniciais pode conduzir a uma superestimação de 10-15% da fixação em plantas de ervilha.

Acredita-se, portanto, que os valores de QNT e %N_{fix} obtidas para caupi e feijão aos 17 e 24 DAS (controle arroz) (Tabelas 15 e 17) podem ter sido superestimados pelas razões citadas acima. No trabalho de HAMILTON *et al.* (1992) os erros de superestimação foram minimizadas quando o N da semente foi similar entre as isolinhas fixadoras e não fixadoras de soja, e teve maior efeito quando o centeio foi usado como planta controle.

4.1.8. Método da diluição isotópica (DI) x Método da diferença (MD)

4.1.8.1. Percentagem e quantidade de N fixado no feijão e caupi obtidas pelo método da diluição isotópica e método da diferença

Os resultados obtidos da percentagem de nitrogênio proveniente da fixação obtidos utilizando a metodologia da diluição isotópica (DI) e método da diferença do N total (MD), usando como controles arroz e soja não nodulante, podem ser vistos na Tabela 20. A percentagem de N fixado pelo feijão e caupi variaram estatisticamente ($F \leq 0,01$) ao longo das épocas estudadas.

Tabela 20. Percentagem de N na planta proveniente da fixação (%N_{fix.}) em caupi e feijão determinada pela diluição isotópica e método da diferença em função dos dias de coleta usando como plantas controles arroz e soja não nodulante. (Média de 3 repetições).

FABRICAS	Dias Após a Semeadura										1 ^o Teste F	CV %						
	17	24	31	38	47	58	68	78										
	PLANTA CONTROLE ARROZ																	
	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD								
Caupi	44,05b	94,06a	41,38b	84,62a	76,10b	89,04a	84,60a	85,34a	91,00a	91,35a	92,64a	92,97a	91,12a	92,47a	93,01a	92,64a	**	2,2
Feijão	42,02b	94,33a	21,78b	77,93a	42,21b	67,96a	64,89a	64,07a	77,53a	77,92a	81,23a	79,05a	83,45a	82,62a	79,59a	78,10a	**	9,1
	PLANTA CONTROLE SOJA NÃO NODULANTE																	
	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD								
Caupi	2 -	44,76	74,58a	72,64a	92,27a	92,37a	93,07a	93,33a	NS	2,7								
Feijão	-	47,21	38,54a	20,01b	80,29a	77,76a	79,76a	76,80a	NS	13,53								

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

¹ Teste F (Métodos x épocas)

² Valores negativos

As percentagens médias de N-fixado por ambas leguminosas, obtidas com os métodos citados acima foram estatisticamente diferentes aos 17, 24 e 31 DAS quando a cultura referência foi o arroz. Tanto para caupi como para feijão, os maiores valores de $\%N_{fix}$ aos 17, 24 e 31 DAS foram obtidos pelo método da diferença e os menores valores pela diluição isotópica. Devido a diferença estatística dos valores calculados pelos dois métodos surge a dúvida de qual dos valores de $\%N_{fix}$ seria o mais exato, e se os valores obtidos pelo método da diluição isotópica estão subestimados ou se os obtidos pelo método da diferença estão superestimados.

De início pode-se afirmar que os valores obtidos aos 17 DAS (94,06%) e 24 DAS (84,62%) pelo método da diferença estão superestimados, pois é sabido que nos estádios iniciais de crescimento os sistemas fixadores de ambas leguminosas não são ativos como indicado por esses valores.

Quanto maior a quantidade de N-total absorvida pela fixadora em relação a não fixadora (ou mesmo que ambas aumentem na mesma proporção o N absorvido) maior será a quantidade de N fixado, assim superestimando os valores. Por exemplo: de acordo com a Tabela 6, percebe-se que aos 17 DAS os valores de QNT das fixadoras (caupi e feijão) foi aproximadamente 17 vezes maior que o nitrogênio absorvido pela cultura não fixadora (arroz), isso devido ao N proveniente da semente, do solo e do fertilizante ser muito maior nas leguminosas do que na gramínea, causando grandes discrepâncias nos valores de $\%N_{fix}$ obtidos pela equação 9.

Os resultados obtidos mostram que o método da diferença é altamente "dependente da produção" da cultura fixadora e não

fixadora nos estádios iniciais de crescimento, podendo-se sugerir que de 17-24 DAS o arroz não é um bom controle para estudos com o citado método em condições de vaso e até mesmo em condições de campo.

As $\%N_{\text{fix.}}$ apresentados pelo feijão e caupi aos 38, 47, 58, 68 e 78 DAS (controle = arroz) e 31, 58 e 78 DAS (controle = soja não nodulante), pode-se observar que não houve diferenças entre as médias pelos dois métodos em estudo. A média de $\%N_{\text{fix.}}$ adquirida pelo feijão aos 31 DAS (20,01%; Tabela 20) pode ser explicada pelo erro experimental, onde as três repetições que deram origem a média foram 10,71; 34,59 e 10,74% (dados não apresentados).

As boas concordâncias obtidas entre os dois métodos no presente estudo, diferem daqueles resultados obtidos por RENNIE (1979) com feijão em experimentos de vaso. Entretanto, RUSCHEL *et al.* (1979) utilizando duas isolinhas de soja, nodulante e não nodulante, em vasos com três diferentes doses de N na forma de sulfato de amônio observaram que os dois métodos, MD e DI, foram similares aos 75 dias mas nas primeiras colheitas, particularmente aos 35 dias, o método da diferença do N-total foi inadequado e o método isotópico apresentou-se com maior sensibilidade. Constataram também que a isolinha nodulante absorveu mais N do que a planta não nodulante. TRIVELIN (1982) concluiu que as medidas simultâneas da fixação simbiótica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, variação natural das razões $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e por diferença do N-total, usando como planta controle a isolinha não nodulante de soja, evidenciaram os mesmos resultados para as condições de experimentação em vasos no final do ciclo das plantas.

URQUIAGA & BODDEY (1987) concluíram que os dois métodos teoricamente produzirão idênticas estimativas da fixação de

N_2 quando a cultura fixadora e não fixadora recuperam idênticas quantidades de N-fertilizante (% EUF). A menos que, a proporção do N derivado do fertilizante para o N derivado do solo não seja a mesma para ambas culturas, diferenças na recuperação do N-fertilizante conduzirá a estimativas desiguais de fixação de N_2 pelos dois métodos.

De acordo com a Tabela 14 as EUF a partir dos 38 DAS foram similares para as culturas fixadoras e referências justificando, portanto, as concordâncias dos valores de $\%N_{fix}$ obtidos durante esse período pelos dois métodos em estudo (Tabela 20). Isso confirma as observações de WITTY & RITZ (1984); CHALK (1985); URQUIAGA & BODDEY (1987) de que as duas técnicas não são totalmente independentes. Segundo BODDEY (1987) e URQUIAGA & BODDEY (1987) a concordância das estimativas da fixação biológica do nitrogênio de quaisquer técnicas de ^{15}N com a técnica da diferença do N-total (como observado no presente estudo) não contribui em nenhuma evidência adicional que as estimativas são exatas. Então, como avaliar se as estimativas são exatas ou não?. WAGNER & ZAPATA (1982) e LEDGAR *et al.* (1985) testaram o princípio fundamental do método da diluição isotópica, entretanto não obtiveram muito sucesso.

Os resultados obtidos da quantidade de nitrogênio proveniente da fixação (QN_{fix}) obtidos mediante o emprego da diluição isotópica (DI) e método da diferença (MD), usando como controles arroz e soja não nodulante, podem ser vistos na Tabela 21, expressos em mg/planta.

As QN_{fix} aos 17, 24, 31 DAS para caupi e feijão, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, percebe-se que o MD forneceu valores maiores do que por DI conforme foi também verificado

Tabela 21. Quantidade de N na planta proveniente da fixação ($QN_{fix.}$) (mg/planta) em caupi e feijão, determinada pela diluição isotópica e método da diferença em função dos dias de coleta, usando como plantas controles arroz e soja não nodulante. (Média de 3 repetições).

FIDUCIARIAS	DIAS APÓS A SEMEADURA										P	CV						
	17	24	31	38	47	58	68	78										
----- PLANTA CONTROLE : ARROZ -----																		
	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD						
	mg N/planta																	
Caupi	20,60a	44,16a	28,68a	58,53a	148,28a	173,03a	234,87a	237,19a	460,20a	461,78a	609,47a	611,69a	629,36a	638,22a	657,21a	654,67a	NS	15,8
Feijão	20,64a	46,33a	11,07a	38,04a	28,97a	45,58a	84,25a	85,26a	152,93a	153,67a	184,94a	180,47a	249,36a	246,99a	190,87a	187,33a	NS	26,6
----- PLANTA CONTROLE: SOJA NÃO NODULANTE -----																		
	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD	DI	MD						
	mg N/planta																	
Caupi	2 -	21,07			145,37a	141,74a			607,06a	607,70a			657,65a	659,50a	NS	12,5		
Feijão	-	23,24			26,58a	14,29a			182,87a	177,64a			191,29a	184,36a	NS	28,1		

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

¹teste F (Métodos x épocas)

²Valores negativos

no comportamento da $\%N_{fix}$ (Tabela 20). Pela Tabela 12 vê-se que, de um modo geral, a absorção do N marcado pelas plantas fixadoras (caupi e feijão) nesse período, foi marcadamente maior do que a absorção pelas plantas não fixadoras (arroz e soja não nodulante). Assumindo que isso foi também constatado para a QNPPS (Tabela 13), explica-se porque as estimativas da QN_{fix} foram maiores pelo MD do que pelo método da DI. As plantas fixadoras não somente acumularam pouco N da fixação, mas também absorveram mais N do solo e da semente, os quais o MD erroneamente incluiu como um ganho proveniente da fixação, e assim superestimou os valores obtidos. Isso foi constatado em soja por RUSCHEL *et al.* (1979) em experimento de vaso, como citado anteriormente, e por WAGNER & ZAPATA (1982) em experimento de campo. Portanto concordando com as afirmações de VOSE *et al.* (1981) e HERRIDGE (1982), de que se a absorção do N do solo pelas plantas noduladas for maior, a fixação do N_2 será superestimada pelo MD.

Segundo BODDEY *et al.* (1984), parece que em algumas circunstâncias no campo, plantas noduladas de soja exploram as reservas de N do solo mais eficientemente do que a isolinha não nodulada, presumivelmente por causa de um mais intensivo sistema radicular. Todavia, segundo BODDEY *et al.* (1984); CHALK (1985); WATANABE (1991) isso dependerá dos fatores do solo, fatores ambientais e práticos de adubação.

Dos resultados de QN_{fix} apresentados pelo feijão e caupi aos 38, 47, 58 e 68 DAS (controle: arroz) e 31, 58 e 78 DAS (controle: soja não nodulante) (Tabela 21) pode-se observar que de um modo geral houve boas concordâncias entre as médias pelos dois métodos em estudo, assim como foi observado pelos dados de $\%N_{fix}$ (Tabela 20). Isso sugere

que arroz e a isolinha de soja não nodulante foram válidas controles para feijão e caupi nas condições experimentais de vaso, durante os períodos citados acima.

O método da diferença, embora que menos dispendioso que o método da diluição isotópica, e também menos sensível (VASILAS *et al.*, 1990), pode ser usado em condições de vaso nos locais onde somente as análises de N-total estão disponíveis. Sugere-se, portanto, que a avaliação pelo MD em condições de vaso seja realizada apenas no final do ciclo das culturas e que todos os princípios inerentes ao método (VASILAS & HAM, 1984; BODDEY, 1987; PEOPLES *et al.*, 1988) sejam cumpridos.

O método da diluição isotópica continuará a ser o mais indicado em pesquisas com fixação biológica apesar das exigências de equipamentos especiais (espectrômetros de massa) e elevados custos do isótopo ^{15}N e das análises, pois é uma técnica que permite distinguir o N proveniente do solo, do fertilizante e da atmosfera.

4.2. Experimento II

4.2.1. Produção de matéria seca (MS)

Os dados de massa seca (g/planta), nas diferentes épocas de desenvolvimento do caupi, feijão e soja não nodulante em função das diferentes doses de nitrogênio são apresentados na Tabela 22.

Os resultados indicam um aumento acentuado no decorrer do tempo, tendo alcançado o pico máximo aos 76 DAS em todos os tratamentos. A diferença na produção de massa seca nas três épocas estudadas apresentou-se significativa ao nível de 5% de

probabilidade.

A queda das folhas nas duas leguminosas em estudo, embora não acentuado (principalmente para caupi) foi associado com a fase reprodutiva, promovendo assim a senescência e consequentemente abscisão das folhas.

Comparando os dados médios de matéria seca do experimento I (experimento do verão) com os dados do experimento II (experimento do inverno), percebe-se que o metabolismo das duas leguminosas foi severamente afetado pelas condições de baixas temperaturas (principalmente pelas temperaturas mínimas do período noturno) (Figura 4) apresentando crescimentos mais reduzidos. O feijão iniciou a emissão de pequenos botões florais aos 40 DAS, atingindo a plena floração aos 50 DAS, em contraste com o experimento I, onde o feijoeiro iniciou sua floração aos 38 DAS em condições de temperaturas mais elevadas. Aos 76 DAS as vagens apresentavam-se bem formadas e a planta em final de ciclo vegetativo, o que forçou a coleta das demais culturas (caupi e soja não nodulante) na mesma data, pois é uma das exigências do método da diluição isotópica (BODDEY *et al.*, 1983; BODDEY, 1987; DANSO, 1988; HARDARSON & DANSO, 1990).

O caupi, aos 76 DAS, encontrava-se em fase de enchimento das vagens, com sementes mal formadas, evidenciando mais uma vez o efeito das baixas temperaturas do inverno (ocorrido nos meses de junho a setembro de 1990) no metabolismo de formação dos órgãos reprodutivos do cultivar em estudo. Segundo ARAÚJO *et al.* (1984) as temperaturas inferiores a 18°C afetam diretamente o desenvolvimento vegetativo e desestimulam o início da floração (como ocorreu no presente estudo), aumentando consideravelmente o ciclo da planta. Esses autores

Tabela 22. Massa seca (g/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA				MÉDIA
		23			76	
		40				
		g/planta				
	ppm	TOTAL				
C A U P I	2	0,42aC	1,48aB	8,03abA	3,31ab	
	15	0,44aC	1,74aB	6,31 cA	2,83 b	
	30	0,40aC	1,63aB	7,41bcA	3,15ab	
	45	0,37aC	1,69aB	7,86aba	3,31ab	
	60	0,42aC	1,79aB	8,65a A	3,62a	
Teste F adubação	= *					
Teste F adubação x períodos=	*					
CV	= 16,0%					
F E I J Ã O	2	0,58aB	1,78aB	6,59 cA	2,98 c	
	15	0,62aB	1,97aB	9,05aba	3,88abc	
	30	0,63aC	2,47aB	7,54bcA	3,55 bc	
	45	0,61aC	2,94aB	8,79aba	4,11ab	
	60	0,71aC	3,28aB	10,09a A	4,69a	
Teste F adubação	= **					
Teste F adubação x períodos=	**					
CV	= 18,1%					
F E I J Ã O (VAGENS)	2			3,03		
	15			4,67		
	30			3,90		
	45			4,65		
	60			3,89		
SOJA NÃO NODULANTE	2	0,24aC	1,07aB	5,87 cA	2,39 bc	
	15	0,27aC	1,08aB	6,72 b A	2,69ab	
	30	0,23aC	0,78aB	7,16ab A	2,72a	
	45	0,21aC	0,77aB	7,60a A	2,86a	
	60	0,19aB	0,64aB	6,11 cA	2,31 c	
Teste F adubação	= **					
Teste F adubação x períodos=	**					
CV	= 8,8%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

consideram a faixa de 20 a 35°C como a ideal para o desenvolvimento dessa leguminosa.

Estudos realizados por CASTRO *et al.* (1984) com três cultivares de caupi (Epace-1, Epace-6 e Epace-8) crescidas em vaso sob condições naturais, evidenciaram que as três cultivares apresentaram um crescimento reduzido, principalmente nos primeiros períodos. Segundo esses autores o comportamento deve ter sido provocado pela baixa temperatura do ar, principalmente nos meses de agosto e setembro, mais especificamente pela temperatura noturna, representada pela média dos valores da temperatura mínima.

De um modo geral, observando-se os valores da Tabela 22, não houve diferenças significativas entre tratamentos (doses de N) nas épocas 23 e 40 DAS tanto para culturas fixadoras (caupi e feijão) como para controle (soja não nodulante). Todavia, aos 76 DAS a dose de 60 ppm de N produziu maiores valores de massa seca no caupi cv. CNC x 284-4E, diferindo apenas dos tratamentos 15 e 30 ppm de N.

Segundo AGBENIN *et al.* (1991) as doses de N aplicadas em caupi (60 e 120 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) aumentaram significativamente os componentes de crescimento, produção de matéria seca e absorção de nutriente em relação a controle, mas o incremento do N à 240 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo, não teve efeito nos parâmetros de crescimento da cultura em estudo.

A maior produção de massa seca na parte aérea do feijão cv. Carioca também ocorreu para o tratamento 60 ppm de N aos 76 DAS e diferiu estatisticamente (Tukey-5%) dos tratamentos 2 e 30 ppm. Nessa mesma época, os valores médios dos tratamentos 15, 45 e 60 ppm de N não mostraram diferenças significativas entre si, embora a

média encontrada no tratamento 60 ppm de N tenha sido maior do que as outras duas. Isso indica que a concentração de 60 ppm de N foi mais efetiva na produção de massa seca do que as demais.

4.2.2. Quantidade de nitrogênio total (QNT)

Os resultados de quantidade de nitrogênio total (QNT) por planta (mg/planta) da parte aérea das culturas caupi, feijão e soja não nodulante, nas diferentes épocas de coleta, em função das doses de N são apresentadas na Tabela 23.

Os valores médios de QNT das duas plantas fixadoras em estudo, mostram um aumento acentuado no decorrer do tempo, tendo alcançado o máximo na coleta de 76 DAS em todos os tratamentos e tendeu a acompanhar os valores de massa seca (Tabela 22).

Não houve efeito das diferentes doses de N sobre a QNT na parte aérea de caupi aos 23 e 40 DAS, pois as médias dos tratamentos não mostraram diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade. Entretanto, observa-se que na coleta de 40 DAS os valores de QNT aumentaram com as doses crescentes de N. Na época posterior (76 DAS) percebe-se que houve um ganho líquido significativo na QNT, com o N estando aproximadamente 3,5 vezes maior que a época anterior (40 DAS). Esse aumento provavelmente se deve a maior atividade simbiótica, ocasionada pelo aumento da temperatura no final do experimento.

Aos 76 DAS, o caupi e feijão foram sempre superiores à soja não nodulante quanto a QNT na parte aérea, em todos os tratamentos, sugerindo efeitos sinérgicos entre o N fixado, N do solo e

Tabela 23. Quantidade de nitrogênio total (QNT) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		23	40	76	
	ppm			mg N/planta	
C A U P I	2	18,19aB	45,59aB	TOTAL	253,65a A
	15	21,37aB	59,61aB		105,81a
	30	19,04aC	66,89aB		92,31a
	45	18,50aC	70,86aB		107,58a
	60	21,27aC	76,40aB		108,26a
Teste F adubação = NS					110,73a
Teste F adubação x períodos = NS					
CV = 19,2%					
F E I J Ã O	2	25,53aB	50,72 bB	TOTAL	171,37 cA
	15	26,72aB	56,22 bB		82,35 C
	30	28,21aC	70,24aB		236,24ab A
	45	29,14aC	86,70aB		196,62 bcA
	60	36,59aC	104,62a B		98,36 bc
Teste F adubação = **					115,35ab
Teste F adubação x períodos = **					135,49a
CV = 17,0%					
S O J A N Ã O N O D U L A N T E	2	10,95aC	37,31a B	TOTAL	46,54 eA
	15	13,25aC	39,36a B		31,60 c
	30	12,27aC	30,63 b B		64,05 d A
	45	11,15aC	28,22 bcB		75,38 c A
	60	10,30aC	22,50 cB		104,22 b A
Teste F adubação = **					112,60a A
Teste F adubação x períodos = **					48,47a
CV = 6,4%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

¹Parte aérea (caule + ramos + pedúnculos e vagens quando presentes)

N fertilizante, concordando com as mesmas observações feitas para soja por RUSCHEL *et al.* (1979); RUSCHEL *et al.* (1980) e para caupi e soja por EAGLESHAM *et al.* (1983). Observa-se pela Tabela 23 aos 76 DAS que a medida que aumentam as doses de nitrogênio aumentam também as QNT de soja não nodulante, obtendo-se a máxima acumulação (112,60 mg N/planta) com a dose de 60 ppm de N.

Observando-se o valor médio de QNT obtida aos 76 DAS pelo feijoeiro (236,24 mg N/planta) no tratamento 15 ppm de N (tabela 23), percebe-se que está bem próximo da QNT máxima obtida pela mesma cultura no Experimento I (238,96 mg N/planta, tabela 6) que recebeu 10 ppm de N, sugerindo que as baixas temperaturas ocorridas durante o ciclo da cultura não influenciou os resultados do citado parâmetro. Entretanto, a cultura do caupi obteve 706,32 mg N/planta (Experimento I) contra 195,96 mg N/planta (Experimento II), correspondendo a um valor de QNT 3,6 vezes maior. Depreende-se, portanto, que a principal fonte de N do caupi cv. CNC x 284-4E, a fixação biológica do N₂, foi afetada pelas baixas temperaturas (Figura 4) ocorridas durante o inverno de 1990. A consequência disso, foi uma produção de massa seca (7,65 mg/planta, em média) aproximadamente 3,6 vezes menor que no experimento I do verão (27,54 mg N/planta). NESHEIM & BOLLER (1991) observaram que o crescimento de trevo branco foi muito mais lento em menor temperatura (7,5/5°C, proporção de temperatura dia/noite); em 15/10°C a produção total de massa seca por vaso, colhida após 12 semanas, foi até 16 vezes maior do que em 7,5/5°C.

THOMAS & SPRENT (1984) estudaram os efeitos da baixa temperatura no crescimento, acumulação e distribuição da matéria seca e N em duas linhagens de feijão, uma sensível (seafarer) e outra

tolerante ao frio (accession 194), e concluíram que em baixas temperaturas o crescimento de ambas linhagens foi limitado pelo N.

4.2.3. Percentagem de nitrogênio na planta proveniente fertilizante e do solo (átomos % ^{15}N , %NPPF e %NPPS)

As abundâncias de ^{15}N (átomos %), nas diferentes épocas de coleta do caupi, feijão e soja não nodulante em função das diferentes doses de N são apresentados na tabela 24.

Pela Tabela 24, vê-se que as abundâncias de ^{15}N das culturas fixadoras (caupi e feijão) nos cinco tratamentos (aos 23 e 40 DAS) foram maiores que da controle soja não nodulante, causando valores discrepantes de fixação de N_2 , como veremos posteriormente.

Com base nos resultados acima descritos pode-se afirmar que nas condições do presente experimento a base do método de diluição isotópica para quantificação do N_2 derivado da atmosfera (McAULIFFE *et al.*, 1958; FRIED & MIDDELBOE, 1977; BROADBENT *et al.*, 1982; RENNIE & RENNIE, 1983; HARDARSON & DANSO, 1990; TRIVELIN & BOARETTO, no prelo) não foi cumprido. As baixas temperaturas da casa de vegetação ocorridas até 23 DAS (média mínima = 11,8°C; média máxima = 28,5°C) e de 23-40 DAS (média mínima = 12,5°C, média máxima = 26,2°C) (veja também Figura 4), reduziram consideravelmente a atividade simbiótica das duas leguminosas, condição esta necessária para que o princípio básico do método isotópico fosse satisfeito.

Tabela 24. Abundância de ^{15}N na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após o plantio. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		23	40	76	
	ppm	Átomos % ¹⁵ N			
		TOTAL			
CAUPI	2	1,188 cB	1,637 dC	0,571 cC	1,132 d
	15	2,386a B	3,181a A	1,085 b C	2,217a
	30	1,843 b B	2,411 c A	0,981 b C	1,745 c
	45	2,056 b B	2,793 b A	1,231ab C	2,027 b
	60	2,142ab B	3,123a A	1,459a C	2,241a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 6,9%					
FEIJÃO	2	1,837 cA	1,579 dA	0,857 cB	1,424 d
	15	2,819a B	3,103ab A	1,407 b C	2,443ab
	30	2,035 bcB	2,486 c A	1,461ab C	1,994 c
	45	2,274 b B	2,992 b A	1,775a C	2,347 b
	60	2,777a B	3,329a A	1,791a C	2,632a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 6,4%					
FEIJÃO (VAGENS)	2			0,562 c	
	15			0,821 b	
	30			0,852 b	
	45			1,031a	
	60			1,158a	
Teste F = **					
CV = 6,9%					
SOJA NÃO NODULANTE	2	0,952 cB	1,481 bA	1,470 cA	1,301 c
	15	1,179abC	2,229a B	2,725a A	2,044a
	30	1,058 bcC	1,517 bB	2,092 b A	1,556 b
	45	1,339ab C	1,959a B	2,517a A	1,938a
	60	1,503a C	1,927a B	2,827a A	2,086a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 8,7%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes).

Aos 76 DAS, as culturas fixadoras apresentaram, de um modo geral, menores valores de átomos % ^{15}N que a planta controle. De acordo com a Figura 4, percebe-se que as temperaturas a partir do mês de agosto foram maiores, contribuindo para o aumento do N proveniente da fixação biológica e consequentemente reduzindo o enriquecimento do ^{15}N das plantas fixadoras.

De acordo com a Tabela 24, nota-se que os enriquecimentos de ^{15}N das vagens de feijão aos 76 DAS, em todos os tratamentos, foram menores do que a parte aérea, concordando mais uma vez com os resultados obtidos por JENSEN (1986); ZAPATA *et al.* (1987a); DANSO & KUMARASINGUE (1990) descritos no subitem 4.1.4. do Experimento I. TRIVELIN (1982) também constatou que as folhas + ramos do feijoeiro apresentou maior concentração isotópica do que as vagens.

Na Tabela 25 são apresentados os dados médios das percentagens de nitrogênio nas plantas de caupi, feijão e soja não nodulante proveniente do fertilizante, nas diferentes épocas de coleta, em função dos dados de nitrogênio.

De um modo geral, em todos os tratamentos, verifica-se um aumento significativo das médias de %NPPF quando aumentou-se as doses de nitrogênio. Isso indica que nestas condições experimentais, existe uma resposta positiva à fertilização nitrogenada devido principalmente a uma baixa atividade dos sistemas simbióticos provocado pelas baixas temperaturas.

Aos 76 DAS, as maiores %NPPF da parte aérea de caupi e feijão, foram apresentadas pelas plantas submetidas aos tratamentos 45 e 60 ppm de N, sendo acompanhados de forma decrescente

Tabela 25. Percentagem de nitrogênio proveniente do fertilizante (%NPPF) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N, Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSIS DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		23	40	76	
CAUPI					
	ppm				
	2	2,78	4,28	0,69	2,58 e
	15	20,96 c B	29,22 d A	7,46 c C	19,21 d
	30	31,95 b B	44,23 c A	13,30 b C	29,83 c
	45	36,55ab B	52,49 b A	18,69a C	35,91 b
	60	38,40a B	59,61a A	23,64a C	40,55a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 8,3%					
FEIJÃO					
	ppm				
	2	4,96	4,09	1,06	3,37 e
	15	25,46 d A	28,41 d A	6,88 c B	20,25 d
	30	36,09 c B	45,85 c A	15,51 b C	32,49 c
	45	41,26 b B	56,79 b A	20,28a C	39,44 b
	60	52,14a B	64,08a A	23,92a C	46,71a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 6,3%					
FEIJÃO (VAGENS)					
	ppm				
	2			0,66	d
	15			4,72	c
	30			10,50	b
	45			14,37a	
	60			17,12a	
Teste F = **					
CV = 11,3%					
SOJA NÃO NODULANTE					
	ppm				
	2	1,98	3,76	3,73	ea
	15	8,44 c B	19,34 b A	24,48 d A	17,42 c
	30	14,96 b C	24,90 b B	37,32 c A	25,73 b
	45	21,04ab C	34,45a B	46,51 b A	34,00a
	60	24,58a C	33,75a B	53,23a A	37,19a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 11,6%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

1 Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

pelos tratamentos 30, 15 e 2 ppm de N. Deve-se ressaltar, contudo, que as plantas que receberam as duas maiores doses de N não mostraram diferenças estatísticas nos valores de %NPPF tanto na parte aérea (caupi e feijão), como nas vagens em separado (feijão), de modo semelhante ao ocorrido com os resultados de abundância de ^{15}N (Tabela 24).

Entre as épocas, a máxima %NPPF ocorreu aos 40 DAS para os cinco tratamentos de ambas as culturas em estudo, sendo que o maior e menor valor médio foram obtidos nos tratamentos 60 e 2 ppm de N, respectivamente. Na época subsequente (76 DAS) houve uma queda significativa nos valores de %NPPF da parte aérea, período em que as plantas já em final de ciclo, apresentaram uma maior utilização do N proveniente da fixação.

RENNIE & KEMP (1984) observaram que as %NP_{fix} de plantas de feijão (cvs. Kentwood e Aurora), em geral, aumentaram linearmente do estágio V₃ de crescimento (40 DAS) para R₆ (80 DAS) ou R₈ (100 DAS) enquanto as %NPPF e %NPPS decresceram inversamente. Os autores relacionaram esses resultados aos aumentos das temperaturas com a chegada da primavera, favorecendo rápida nodulação e fixação do N₂.

As percentagens de N proveniente do solo (%NPPS) da parte aérea das culturas em estudo, nas diferentes épocas de coleta, em função das doses de N são apresentados na Tabela 26. Percebe-se que aos 76 DAS a cultura do caupi do tratamento 2 ppm de N apresentou a menor média de %NPPS (17,82%), embora não tivesse mostrado diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, dos demais tratamentos. Isso se deve a maior atividade da fixação obtida por essa cultura no citado tratamento, como veremos posteriormente. Na mesma

Tabela 26. Percentagem de N proveniente do solo (%NPPS) na parte aérea das plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		¹ 23	¹ 40	76	
	ppm	%			
		² TOTAL			
C A U P I	2			17,82a	
	15			23,02a	
	30			22,35a	
	45			21,50a	
	60			20,77a	
Teste F = NS					
CV = 12,5%					
		TOTAL			
F E I J Ã O	2			27,33a	
	15			21,23 b	
	30			20,86 b	
	45			20,87 b	
	60			21,02 b	
Teste F = *					
CV = 9,1%					
		TOTAL			
F E I J Ã O (VAGENS)	2			17,06a	
	15			14,55ab	
	30			9,22 b	
	45			12,62ab	
	60			15,05a	
Teste F = **					
CV = 14,2%					
		TOTAL			
SOJA NÃO NODU- LANTE	2	98,02a A	96,24a A	96,27a A	96,84a
	15	91,56a A	80,66 b B	75,52 b B	82,58 b
	30	85,04 b A	75,10 b B	62,68 c C	74,27 c
	45	78,96 bcA	65,55 cB	53,49 d C	66,00 d
	60	75,42 cA	66,25 cB	46,77 eC	62,81 d
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 3,6%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

²Valores não calculados

época de coleta, verifica-se que a planta de feijão submetida a dose de 2 ppm de N apresentou a maior média (27,33%) diferindo significativamente, pelo teste Tukey-5% dos demais tratamentos.

As maiores %NPPS na parte aérea de soja não nodulante nos tratamentos 15, 30, 45 e 60 ppm de N, ocorreram no

período vegetativo de 23 DAS, diminuindo nas épocas posteriores (40 e 76 DAS). Aos 23 DAS os valores de %NPPS foram influenciados pela contribuição do N da semente e os decréscimos observados aos 40 e 76 DAS estão relacionados com a redução na quantidade do N-nativo disponível do solo e aumento da utilização do N-fertilizante (tabelas 25 e 26).

4.2.4. Quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e do solo (QNPPF e QNPPS)

Na Tabela 27 são apresentados os dados médios da quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) expressas em mg N/planta nas diferentes épocas de coleta, em função das doses de nitrogênio.

As doses de N aplicadas, como se esperava, determinaram as concentrações deste elemento na parte aérea de caupi e feijão. A Tabela 27 mostra em ordem crescente os valores médios obtidos nos cinco tratamentos em estudo.

Os resultados obtidos pelo feijão para a QNPPF indicam, de um modo geral, um aumento da época 23 DAS para época 40 DAS permanecendo constante até a maturidade fisiológica.

Aos 40 DAS observa-se que as maiores QNPPF foram obtidas com a dose mais alta de nitrogênio (60 ppm) sendo de 45,58 mg N/planta para a cultura do caupi e 67,05 mg N/planta para a cultura do feijoeiro, correspondendo a participação da ordem de 59,61% e 64,08% do N-total, respectivamente.

Tabela 27. Quantidade de nitrogênio proveniente do fertilizante (QNPPF) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N, coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSE DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		23	40	76	
		mg N/planta			
CAUPI	ppm	TOTAL			
	2	0,52 ba	1,96 ea	1,72 ea	1,40 e
	15	4,45abb	17,42 d A	14,54 d A	12,14 d
	30	6,12abb	29,56 c A	31,22 c A	22,30 c
	45	6,81a C	37,24 b A	43,34 b A	29,13 b
	60	8,20a C	45,58a B	55,38a A	36,39a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 12,3%					
FEIJÃO	2	1,26 da	2,05 ea	1,77 ea	1,70 e
	15	6,82 c B	15,92 d A	16,06 d A	12,94 d
	30	10,19 bc B	32,19 c A	30,15 c A	24,17 c
	45	12,15 b B	49,19 b A	46,45 b A	35,93 b
	60	19,12a B	67,05a A	63,38a A	49,85a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 8,3%					
FEIJÃO (VAGENS)	2			0,64 d	
	15			6,94 c	
	30			12,41 b	
	45			20,63a	
	60			22,88a	
Teste F = **					
CV = 11,1%					
SOJA NÃO NODULANTE	2	0,21aa	1,40 ba	1,73 ea	1,11 e
	15	1,12ac	7,65a B	15,68 d A	8,15 d
	30	1,84ac	7,73a B	28,12 c A	12,56 c
	45	2,35ac	9,55a B	48,45 b A	20,12 b
	60	2,47ac	7,82a B	59,93a A	23,41a
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 9,2%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

RENNIE & KEMP (1984) notaram que a adição de 10 kg N/ha contribuiu pouco para a produção de N total das plantas de feijão (cvs. Kentowood e Aurora). A média de %NPPF para ambas cultivares foi 14% em 1981 e 12,3% em 1982 no estágio V₃ (40 DAS) e decresceu depois disso. Observaram ainda que a maior utilização do N-fertilizante ocorreu com a dose de 40 kg N/ha (em média de 30,3% em 1981 e 27,4% em 1982), em ambos cultivares aos 40 DAS. Esses dados estão bem próximos ao encontrado no presente estudo, aos 40 DAS, onde as doses de 2 ppm de N (5,3 kg N/ha) e 15 ppm de N (40 kg N/ha) contribuíram com 4,09% (2,05 mg N/planta) e 28,41% (15,92 mg N/planta), respectivamente, do N-total da parte aérea do feijoeiro cv. Carioca (Tabelas 25 e 27). Nesse estágio de crescimento o N-fertilizante foi um importante fator na produção de fotossintatos para atender a fase reprodutiva da planta.

Na Tabela 28 são apresentados os valores da quantidade de nitrogênio proveniente do solo (QNPPS) expressadas em mg N/planta nas diferentes épocas de coleta, em função das doses de nitrogênio.

Percebe-se que houve uma variação crescente nos valores da QNPPS da parte aérea de soja não nodulante até o final do ciclo da cultura (76 DAS). O maior valor obtido foi 55,76 mg N/planta no tratamento 45 ppm de N, não diferindo pelo teste Tukey-5% da média do tratamento 60 ppm de N (52,67 mg N/planta) que contribuiu com cerca de 53,23% do nitrogênio total da soja não nodulante naquele período.

Nota-se que a QNPPS aos 76 DAS para caupi e feijão se manteve mais ou menos constante, não sofrendo influências das cinco doses de fertilização nitrogenada.

Tabela 28. Quantidade de nitrogênio proveniente do solo (QNPPS) (mg/planta) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante), que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		¹ 23	¹ 40	76	
		mg N/planta			
	ppm	² TOTAL			
CAUPI	2			44,40a	
	15			44,86a	
	30			52,44a	
	45			49,85a	
	60			48,67a	
Teste F = NS					
CV = 8,6%			TOTAL		
FEIJÃO	2			45,86ab	
	15			49,55ab	
	30			40,70 b	
	45			47,82ab	
	60			55,70a	
Teste F = *					
CV = 8,1%					
FEIJÃO (VAGENS)	2			16,53ab	
	15			21,41a	
	30			10,90 b	
	45			18,13ab	
	60			20,10a	
Teste F = *					
CV = 16,0%			TOTAL		
SOJA NÃO NODULANTE	2	10,74ac	35,91a B	44,81 c	30,49ab
	15	12,13ac	31,71a B	48,37 bc	30,74a
	30	10,44ac	22,91 b B	47,26 c	26,87 c
	45	8,80ac	18,67 bcB	55,76a	27,74 bc
	60	7,82ac	14,68 cB	52,67ab	25,06 c
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 7,2%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

¹Valores não calculados

²Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

Pelos altos valores de %NPPF (Tabela 25) aos 23 e 40 DAS, sugere-se que as plantas de caupi e feijão foram capazes de se ajustarem às fontes de N para compensar a baixa atividade fixadora de N₂. Nessa fase não foi possível obter valores percentuais ou quantitativos do nitrogênio proveniente do solo devido a problemas relacionados com

a planta controle (soja não nodulante) e baixa fixação do N_2 pelas plantas de caupi e feijão como já citados anteriormente.

4.2.5. Eficiência de utilização do N-fertilizante (EUF)

Na Tabela 29, encontram-se os valores da taxa de utilização do fertilizante nitrogenado (EUF) para as plantas de caupi, feijão e soja não nodulante nas diferentes épocas de coleta, em função das doses de nitrogênio.

A comparação das médias dos tratamentos, para a EUF na parte aérea aos 23 DAS, revelou que a medida que se elevou as doses de N, ocorreu um decréscimo na sua concentração na parte aérea do caupi, embora as diferenças entre as médias não se apresentaram significativas. A mesma tendência aconteceu para as médias de EUF do feijoeiro, todavia, o tratamento 2 ppm de N diferiu significativamente dos demais ao nível de 5% de probabilidade.

Em geral, para feijão, as doses crescentes de nitrogênio não tiveram efeito significativo na eficiência de utilização do fertilizante (observe média das 3 épocas, Tabela 29). Entretanto, aos 40 DAS, apesar dos valores de EUF não apresentarem diferenças significativas entre os tratamentos, observa-se uma variação crescente com o aumento das doses de nitrogênio.

A análise da comparação das médias dos cinco tratamentos entre as duas primeiras coletas, para as quais se realizou a determinação da EUF, mostrou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, tendo a coleta de 40 DAS apresentado maiores valores

Tabela 29. Eficiência de utilização do fertilizante (EUF) na parte aérea de plantas fixadoras (caupi e feijão) e controle (soja não nodulante) que receberam doses crescentes de N, Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA			MÉDIA
		23	40	76	
CAUPI	Ppm	TOTAL			
	2	15,55aB	58,67 b A	51,54 aA	41,92 bc
	15	17,79aC	69,68a A	58,17abB	48,55a
	30	12,25aB	59,12 b A	62,43a A	44,60ab
	45	9,08aB	49,65 bcA	57,79abA	38,84 c
	60	8,20aC	45,58 cB	55,38abA	36,39 c
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 9,8%					
FEIJÃO	Ppm	TOTAL			
	2	37,79a C	61,69a A	53,24 bB	50,91a
	15	27,30 b B	63,69a A	64,24a A	51,74a
	30	20,38 bcB	64,37a A	60,29abA	48,35a
	45	16,20 cB	65,58a A	61,93abA	47,90a
	60	19,12 bcB	67,05a A	63,38a A	49,85a
Teste F adubação = NS					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 8,1%					
SOJA NÃO NODULANTE	Ppm	TOTAL			
	2	6,40aC	42,07a	51,93 c	33,47a
	15	4,48aC	30,61 b	62,09ab	32,39a
	30	3,67aC	15,45 c	56,23 bc	25,11 b
	45	3,13aC	12,74 cd	64,61a	26,83 b
	60	2,47aC	7,82 d	59,93ab	23,41 b
Teste F = NS					
CV = 14,1%					
Teste F adubação = **					
Teste F adubação x períodos = **					
CV = 9,3%					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas se referem às colunas e as maiúsculas às linhas.

¹Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes).

médios do que a coleta de 23 DAS, e praticamente não diferiu da última coleta realizada aos 76 DAS, permanecendo em torno de 61%.

Os altos valores da EUF observados para as duas fixadoras (caupi e feijão) (Tabela 29) estão relacionados com as condições limitadas de vaso (como foi relatado no item 4.1.6. do Experimento I) e também devido as baixas temperaturas ocorridas durante o ciclo das culturas.

Depreende-se pelos resultados acima descritos que os fatores tais como dose de fertilizante, cultura e temperatura, podem influenciar consideravelmente na eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado de caupi e feijão.

4.2.6. Quantificação da fixação do nitrogênio por diluição isotópica

Os resultados de percentagem ($\%N_{fix}$) e quantidade de nitrogênio proveniente da fixação biológica do nitrogênio (QN_{fix} em mg/planta) nas plantas de caupi e feijão nas diferentes épocas de coleta em função das doses de N são apresentados nas Tabelas 30 e 31, respectivamente.

Para os valores de QN_{fix} do caupi cv. CNC x 284-4E aos 76 DAS (Tabela 31) verifica-se que, embora a diferença entre os tratamentos não se mostrasse significativa, o tratamento quase omissa (2 ppm de N) exibiu a maior média (207,53 mg N/planta) correspondendo a 81,49% do nitrogênio total. Apesar desse valor ter sido o mais elevado nesse experimento, foi 3,2 vezes menor que a QN_{fix} obtida pela mesma cultivar no experimento I (657,21 mg N/planta), sugerindo grande influência

Tabela 30. Percentagem de N proveniente da fixação (%N_{fix.}) na parte aérea de caupi e feijão, que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS SEMEADURA		
		¹ 23	¹ 40	76
	ppm	%		
		² TOTAL		
CAUPI	2			81,49a
	15			69,53 b
	30			64,55 bc
	45			59,80 bc
	60			55,59 c
Teste F = **				
CV = 6,1				
		TOTAL		
FEIJÃO	2			71,62a
	15			71,89a
	30			63,63 b
	45			58,85 bc
	60			55,06 c
Teste F = **				
CV = 4,4%				
FEIJÃO (VAGENS)	2			82,28a
	15			80,73ab
	30			80,28ab
	45			73,01 bc
	60			67,83 c
Teste F = **				
CV = 3,6%				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

¹Valores negativos

²Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculo e vagens quando presentes)

Tabela 31. Quantidade de N proveniente da fixação (QN_{fix}) na parte aérea de caupi e feijão, que receberam doses crescentes de N. Coletadas aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura. (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA		
		¹ 23	¹ 40	76
	ppm	mg N/planta		
		² TOTAL		
CAUPI	2			207,53a
	15			136,56a
	30			153,16a
	45			142,22a
	60			130,46a
Teste F = NS				
CV = 21,4%				
		TOTAL		
FEIJÃO	2			123,73a
	15			170,64a
	30			125,78a
	45			135,94a
	60			146,18a
Teste F = NS				
CV = 16,9%				
FEIJÃO (VAGENS)	2			79,55 b
	15			119,70a
	30			95,87ab
	45			105,25ab
	60			90,55 b
Teste F = *				
CV = 10,4%				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

¹Valores negativos

²Parte aérea (caule + ramos + folhas + pedúnculos e vagens quando presentes)

das baixas temperaturas ocorridas durante os meses de junho e agosto (veja Figura 4). Segundo TRIVELIN (1982) a fixação simbiótica no feijoeiro, determinada com técnica usando ^{15}N (atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ e adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo), mostrou-se 3 vezes maior para a época de cultivo de outubro a dezembro (230 mg de N/planta) do que de abril a junho (60 a 80 mg de N/planta), para condições de experimentação em vasos.

A maior quantidade de N fixado no feijão e caupi cultivado nos meses de janeiro, fevereiro e março (experimento I), parece ter relação com a atividade fotossintética das plantas em condições de dias longos aliadas a temperaturas ambientais mais elevadas (Figura 3). Os resultados da produção total máxima de massa seca da parte aérea do caupi e feijão (Tabela 5) no experimento considerado, vem reforçar essa justificativa.

As plantas de feijão submetidas as doses de 2 e 15 ppm de N apresentaram as maiores médias de $\%N_{\text{fix}}$ (71,62 e 71,89%, respectivamente) (Tabela 30) não diferindo entre si pelo teste Tukey-5%. Todavia, esses valores foram superiores estatisticamente às médias obtidas nos tratamentos 30, 45 e 60 ppm de N.

O maior valor de QN_{fix} (170,64 mg N/planta) obtido pela combinação feijão cv. Carioca/CM 01 31-3 no tratamento 15 ppm de N, evidencia novamente que a colocação de pequenas doses de N mineral no início do desenvolvimento do feijoeiro, pode nesse caso ser favorável a planta hospedeira, o que corresponderá a um maior envio de fotossintatos aos nódulos, resultando num maior desenvolvimento do sistema simbiótico, aumentando o N_2 fixado.

A planta de caupi submetida a dose de 2 ppm de N

apresentou a maior média de %N_{fix}, diferindo significativamente, pelo teste Tukey, dos demais tratamentos. A medida que se elevou a concentração de N no vaso, obteve-se valores decrescentes de %N_{fix}.

Com base nos resultados acima descritos confirmam-se as observações de diversos autores (DART & WILDON, 1970; SUMMERFIELD *et al.*, 1976; MILLER *et al.*, 1982; BERVELY & JARREL, 1984; ELOWAD *et al.*, 1987; GRAHAM & SCOTT, 1984; AGBENIN *et al.*, 1990) de que altas doses de nitrogênio afetam a fixação de caupi.

EAGLESHAM *et al.* (1982a) concluíram que embora as taxas de utilização do N-fertilizante em plantas de caupi foram baixas, 12% e 28% em 25 e 100 kg N/ha, respectivamente, a menor aplicação teve um passageiro efeito adverso sobre o desenvolvimento dos nódulos e a maior aplicação teve um prolongado efeito adverso na formação e desenvolvimento dos nódulos e atividade de redução do acetileno.

Os baixíssimos resultados referentes à estimativa da atividade da enzima nitrogenase (Tabela 32), do início até a metade do ciclo das plantas de caupi e feijão (23 e 40 DAS) evidenciaram mais uma vez que as baixas temperaturas influenciaram negativamente a fixação biológica do N₂. Os valores obtidos confirmaram maior sensibilidade do caupi às temperaturas adversas. Segundo ARAÚJO *et al.* (1984) a temperatura, além de outros fatores, influencia o desenvolvimento vegetativo, a atividade do *Bradyrhizobium* e a nodulação, sendo considerada mais importante que a adubação nitrogenada e a intensidade de luz.

De acordo com BARRIOS *et al.* (1963), a nodulação em feijão foi reduzida em 70% a temperatura abaixo de 17°C, enquanto que

Tabela 32. Efeitos da aplicação de 5 doses de N na atividade da nitrogenase (μ mol C_2H_4) em plantas de caupi e feijão em determinado estágio de desenvolvimento (aos 23, 40 e 76 dias após a semeadura). (Média de 3 repetições).

CULTURAS	DOSES DE N	DIAS APÓS A SEMEADURA		
		23	40	76
	ppm	μ mol C_2H_4 /planta/hora		
CAUPI	2	0,00	0,01aB	11,23abA
	15	0,00	0,01aB	8,61abA
	30	0,00	0,01aB	11,37abA
	45	0,00	0,01aB	5,29 bA
	60	0,00	0,01aB	15,54a A
Teste F adubação x períodos= NS				
CV = 62,4%				
FEIJÃO	2	0,11	5,67aB	11,53aA
	15	0,01	4,15aB	25,57aA
	30	0,00	1,06aA	14,27aA
	45	0,00	1,19aA	13,62aA
	60	0,00	0,24aB	23,30aA
Teste F adubação x períodos= NS				
CV = 84,3%				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

SPRENT & THOMAS (1984) observaram que plantas de feijoeiro fixaram N_2 razoavelmente bem quando crescidas em temperatura média diária de 12,9°C (tratamento 15/10°C, dia/noite), concordando com RENNIE & KEMP (1981a, 1981b) que encontraram nodulação a 12°C e atividade da redução do acetileno a 13°C. No presente estudo o feijoeiro cv. Carioca conseguiu fixar em temperatura média máxima de 27,8°C e média mínima de 12,3°C, em condições de casa de vegetação.

Como aconteceu no experimento I (17 DAS) (item

4.1.7), houve também problema neste experimento, aos 23 e 40 DAS (Tabelas 30 e 31 respectivamente) na estimativa de $\%N_{fix}$.

As reduções no crescimento de plantas dependentes de N_2 ocorrem, principalmente, em virtude da baixa disponibilidade de N nas etapas prévias ao início da fixação de N_2 , podendo ser diminuídas ou evitadas, com a aplicação de doses de N como adubação de arranque ao momento do plantio. Essa prática, recomendada por vários pesquisadores (SUMMERFIELD *et al.*, 1977; HUXLEY, 1980; MURAOKA, 1984; WESTERMANN *et al.*, 1985; TSAI, 1990), estimula o crescimento da planta, e evita que passe por um estado de carência de N, antes do início da fixação, possibilitando uma boa nodulação. No presente estudo, os resultados obtidos pelo caupi nos parâmetros de $\%N_{fix}$, QN_{fix} , QNT e massa seca no tratamento quase omissa (2 ppm de N) (Tabelas 30, 31, 23 e 22, respectivamente), confirmaram a potencialidade que a associação da cv. CNC x 284-4E com a estirpe CM1528 31-3 tem, de substituir totalmente a adubação nitrogenada. Havendo condições de solo e da planta para uma plena simbiose é dispensável inclusive a adubação nitrogenada de arranque.

Em feijão, busca-se substituir, parcial ou totalmente, a aplicação de adubação nitrogenada, por meio da fixação simbiótica. Todavia, de acordo com os valores de massa seca da parte aérea e vagens de feijão associados aos valores médios de $\%N_{fix}$, QN_{fix} e QNT do tratamento 15 ppm de N (Tabelas 22, 30, 31 e 23, respectivamente) sugere-se que a combinação do cv. Carioca com a estirpe CM01 31-3 necessita dessa dose de arranque para obtenção de produções econômicas aceitáveis.

5. CONCLUSÕES

Sob as condições em que o experimento foi conduzido, conclui-se que:

- No experimento de verão, o acúmulo de matéria seca e de nitrogênio absorvido (QNT) aumentou significativamente em cada época de desenvolvimento das culturas de feijão e caupi, sendo este acúmulo sensivelmente maior no período de enchimento das vagens e maturação fisiológica (58-78 DAS para caupi e 47-78 DAS para feijão).
- Na coleta da maturidade fisiológica (78 DAS) o caupi acumulou 706,32 mg N/planta, 93% do qual derivado da fixação ($\%N_{fix}$), 5,8% vindo do solo ($\%NPPS$) e 1,2% do fertilizante ($\%NPPF$). Da máxima QNT acumulada pelo feijão aos 68 DAS (298,12 mg N/planta), esses valores foram de 83%, 13,6% e 3%, respectivamente.
- As baixas contribuições relativas do nitrogênio do solo e do fertilizante para o N das vagens evidenciaram que a maior fonte de N para formação desses órgãos foi o N da fixação (95 e 89% para caupi e feijão, respectivamente).
- Os resultados de $\%N_{fix}$ e QN_{fix} apresentados pelo feijão e caupi aos 31, 38, 47, 58, 68 e 78 DAS (controle = arroz) e 31, 58 e 78 DAS (controle = soja não nodulante), indicaram de um modo geral boas concordâncias entre os dois métodos (isotópico- ^{15}N e diferença do N-total).
- As plantas de arroz e soja não nodulante foram adequadas controles para feijão e caupi nas condições experimentais de vasos, durante os períodos citados acima. Isso não foi válido para as épocas 17 e 24 DAS devido: as baixas quantidades fixadas e influência do N da semente, principalmente para o controle soja não nodulante.

- No experimento de inverno a quantidade de nitrogênio proveniente da atmosfera variou de 130,46 a 207,53 mg N/planta (55,59 a 81,49%) para caupi e de 123,73 a 170,64 mg N/planta (55,06 a 71,89%) para feijão, dependendo da quantidade de N aplicado. As baixas temperaturas influenciaram nos resultados de N-fixado.
- A aplicação de 45 e 60 ppm de N tiveram pouco efeito adverso na %N fixado de caupi e feijão.
- Os experimentos confirmaram a potencialidade que a associação da cv. CNC x 284-4E com a estirpe CM 1528 31-3 tem, de substituir totalmente a adubação nitrogenada, quando condições de solo e da planta permitem uma plena simbiose, dispensando inclusive a adubação nitrogenada de arranque. Todavia, a associação cv. Carioca/CM01 31-3 necessita de uma dose de arranque (15 ppm de N) para obtenção de produções econômicas aceitáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-GHAFFAR, A.S.; EL-ATTAR, H.A.; EL-HALFAWI, M.H.; ABDEL-SALAM, A.A. Effects of inoculation, nitrogen fertilizer, salinity, and water stress on symbiotic N₂ fixation by *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris*. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C., ed. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, CIAT. 1982. p.153-159.
- ADAMS, 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, The Hague, 22(2):71-78, 1990.
- AGBENIN, J.O.; LOMBIN, G.; OWONUBI, J.J. Direct and interactive effect of boron and nitrogen on selected agronomic parameters and nutrient uptake by cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) under glasshouse conditions. Tropical Agriculture, Trinidad, 68(4):356-362, 1991.
- AGBOOLA, A.A. Influence of soil organic matter on cowpea's response to N fertilizer. Agronomy Journal, Madison, 70:25-28, 1978.
- AHMAD, M.H.; EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEAMAN, B.; AYANABA, A.; MULONGOY, K.; PULVER, E.L. Examining the potential for inoculant use with cowpeas in West Africa soils. Tropical Agriculture, Trinidad, 58:325-335, 1981.
- AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; DURR, J.C.; BOURGUIGNON, C.; LAGACHERIE, B. Estimate of simbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in ¹⁵N natural abundance. Plant and Soil, The Hague, 52:269-280, 1979.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1991, Rio de Janeiro, 512-513, 1991.

- ARAÚJO, J.P.P. de; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P. das; FAGÉRIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P. de; GUIMARÃES, C.M.; SILVEIRA FILHO, A. Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.; descrição e recomendações técnicas de cultivo, Goiânia, EMBRAPA-CNPAF, 1984. 82p. (Circular técnica, 18).
- ARAÚJO, R.S. & HENSON, R.A. Fixação biológica de nitrogênio. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do feijoeiro-fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.213-227.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS E CORRETIVOS AGRÍCOLAS. Acidez do solo e calagem. São Paulo, 1986. 16p. (Boletim técnico, 1).
- ATKINS, C.A.; SHELP, B.J.; STORER, P.J.; PATE, J.S. Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. Planta, Berlin, **162**:327-333, 1984.
- 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 Physiology, Bethesda, **90**(4):1644-1649, 1989.
- AWONAIKE, K.O. Soil N balance studies of cowpea in symbiosis with *Bradyrhizobium* in southwest Nigeria as influenced by host cultivar, inoculum strain and growth stage, using the ^{15}N dilution technique. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna, 1991. p.235-237 (Proceedings series).
- AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGHE, K.S.; DANSO, S.K.A. Inorganic N x *Bradyrhizobium* strain interaction on cowpea (*Vigna unguiculata*) varietal performance in the field, using the ^{15}N isotope dilution technique. In: INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM, 11, Wageningen, 1989. Proceedings. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1990. p.675-682.

- AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGHE, K.S.; DANSO, S.K.A. Nitrogen fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strain. Field Crops Research, Amsterdam, **24**(3-4):163-172, 1990.
- AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGHE, K.S.; DANSO, S.K.A. Nitrogen assimilation and distribution in field-grown cowpea at various growth stages. Soil Science Society of America Journal, Madison, **55**:81-85, 1991.
- AWONAIKE, K.O.; LEA, P.J.; DAY, J.M.; ROUGHLEY, R.J.; MIFLIN, B.J. Effects of combined nitrogen on nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris*. Experimental Agriculture, London, **16**:303-311, 1980.
- AXMANN, H. Methods for ^{15}N determination. In: HARDARSON, G., ed. Use of Nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Vienna, IAEA, 1990. p.55-59. (Training Course series, 2).
- AXMANN, H. & ZAPATA, F. Stable and radioactive isotopes. In: HARDARSON, G., ed. Use of Nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Vienna, IAEA, 1990. p.9-34 (Training Course series, 2).
- BARRAQUIO, W.L.; DAROY, M.L.G.; TIROL, A.C.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Laboratory acetylene reduction assay for relative measurement of N_2 -fixing activities associated with field-grown Wetland rice plant. Plant and Soil, Dordrecht, **90**:359-372, 1986.
- BARRIE, A. New methodologies in stable isotope analysis. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna, 1991. p.3-25 (Proceedings series).
- BARRIOS, S.; RAGGIO, N.; RAGGIO, M. Effect of temperature on infection of isolated bean roots by *Rhizobia*. Plant Physiology, Bethesda, **38**:171-174, 1963.

- BARTOLOMEW, W.V.; NELSON, L.B.; WERKMAN, C.H. The use of nitrogen isotope ^{15}N in field studies with oats. Agronomy Journal, Madison, 42:100-103, 1950.
- BASANTES MORALES, E.R. Avaliação do método da diluição isotópica com adição de fertilizante ^{15}N ao solo, na quantificação da FBN de leguminosas. Piracicaba, 1990. 115p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BENDASSOLLI, J.A.; MORTATTI, J.; TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L. Síntese de fertilizantes nitrogenados enriquecidos em ^{15}N . Parte I - Produção de amônia anidra enriquecida em ^{15}N . Energia Nuclear & Agricultura, Piracicaba, 9(2):66-93, 1988a.
- BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O.; MORTATTI, J.; VICTORIA, R.L. Síntese de fertilizantes nitrogenados enriquecidos em ^{15}N . Parte II. Síntese de uréia enriquecida em ^{15}N . Energia Nuclear & Agricultura, Piracicaba, 9(2):94-116, 1988b.
- BERGERSEN, F.J. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: BERGERSEN, F.J., ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation, Chichester, John Wiley & Sons, 1980. p.65-110.
- BERVERLY, R.R. & JARRELL, W.M. Cowpea response to N form, rate and liming of application. Agronomy Journal, Madison, 76:663-668, 1984.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification associated with gramineae. CRC Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton, 6:209-266, 1987.
- BODDEY, R.M.; BODDEY, L.H.; URQUIAGA, S. A técnica de redução do acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Itaguaí, R.J. Ed. Universidade Rural, 1990. 37p. (EMBRAPA-CNPBS, Documento, 6).
- BODDEY, R.M.; QUILT, P.; AHMAD, N. Acetylene reduction in the rhizosphere of rice: methods of assay. Plant and Soil, The Hague, 50:567-574, 1978.

- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. The ^{15}N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Papalum notatum* cv. batatais in the field. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 15(1):25-32, 1983.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 16(6):583-588, 1984.
- BOLE, J.B.; RENNIE, R.J. Letter to the editor. Agronomy Journal, Madison, 75(4):717, 1983.
- BONETTI, R. Efeito do N do solo na fixação simbiótica do N_2 e na utilização de fertilizante nitrogenado em soja (*Glycine max.* (L.) Merrill). Piracicaba, 1982. 144p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BOTHE, H.; YATES, M.G.; CANNON, F.C. Physiology, biochemistry and genetics of dinitrogen fixation. In: LÄUCHLI, A. & BIELESKI, R.L. Inorganic plant nutrition. Berlin, Springer-Verlag, 1983. p.241-285.
- BREMNER, J.M. Isotope-ratio analysis of nitrogen in nitrogen-15. Tracer investigation. In: BLACK, C.A., ed. Methods of soil analysis. Madison, American Society of Agronomy, 1965. Part 2: Chemical and microbial properties, p.1256-1286.
- BREMNER, J.M. & MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, 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).
- BROADBENT, F.E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, G.Y. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. Agronomy Journal, Madison, 74:625-629, 1982.

BROADBENT, F.E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, G.Y. Letter to the editor. Agronomy Journal, Madison, 75:717-718, 1983.

BURRIS, R.H. Methodology. In: QUISPEL, A. The Biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North Holland Publishing, 1974. p.9-33.

BURRIS, R.H. & MILLER, C.E. Application of ^{15}N to the study of biological nitrogen fixation. Science, New York, 93:114-115, 1941.

BURRIS, R.H. & WILSON, P.W. Methods for measurement of nitrogen fixation. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. ed. Methods in enzymology, New York, Academic Press, 1957. v.4, p.355-366.

BURRIS, R.H.; EPPLING, F.J.; WAHLIN, H.B.; WILSON, P.W. Studies of biological nitrogen fixation with isotopic nitrogen. Soil Science Society of America Proceedings, Madison, 7:258-262, 1942.

CASTRO, P.R.C.; BERGAMASCHI, H.; SILVEIRA, J.A.G.; MARTINS, P.F.S. Desenvolvimento comparado de três cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 41:555-584, 1984.

CHALK, P.M. Estimation of N_2 fixation by isotope dilution. An appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 17:389-410, 1985.

CHIU, C.Y.; WATANABE, I.; IOSHIDA, T. Estimation of N_2 fixation of soybean by comparison of different ^{15}N labeling methods. Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, 36(3):383-388, 1990.

CONTADO, J.L. Relação das atividades de fosfoenolpiruvato carboxilase e glutamina sintetase com a fixação simbiótica de N_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Piracicaba, 1990. 75p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

DANSO, S.K.A. Methods for estimating biological nitrogen fixation. In: SSALI, H.; KEYA, S.O. Biological nitrogen fixation in Africa. Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation. (AABNF), Nairobi, Kenya, 1984. p.224-244.

- DANSO, S.K.A. Estimation of N_2 fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application-comments. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, 18:243-244, 1986.
- DANSO, S.K.A. The use of ^{15}N enriched fertilizers for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. In: BECK, D.P. & MATERON, L.A. Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1988. p.345-358.
- DANSO, S.K.A.; HERA, C.; DOUKA, C. Nitrogen fixation in soybean as influenced by cultivar and *Rhizobium* strain. Plant and Soil, Dordrecht, 99:163-174, 1987.
- DANSO, S.K.A.; KAPUYA, J.; HARDARSON, G. Nitrogen fixation and growth of soybean as influenced by varying the methods of inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*. Plant and Soil, Dordrecht, 125:81-86, 1990.
- DANSO, S.K.A. & KUMARASINGHE, K.S. Assessment of potential sources of error in nitrogen fixation measurements by the nitrogen-15 isotope dilution technique. Plant and Soil, Dordrecht, 125:87-93, 1990.
- DANTAS, J.P.; SILVEIRA, J.C.A.; MALAVOLTA, E.; DANTAS, E.C. Absorção de macro e micronutrientes pela cultura do feijão caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 2, Goiânia, 1987. Resumos, Brasília, EMBRAPA, 1987.p.73.
- DART, P.J. & WILDON, D.C. Nodulation and nitrogen fixation by *Vigna sinensis* and *Vicia atropurpurea*: The influence of concentration, form, and site of application of combined nitrogen. Australian Journal Agriculturae Research, Melbourne, 21:45-56, 1970.
- DEIBERT, E.J.; BIJERIEGO, R.A.; OLSON, R.A. Utilization of ^{15}N fertilizer by nodulating and non-nodulating soybean isolines. Agronomy Journal, Madison, 71:717-723, 1979.

- DEKHUIJZEN, H.M. & VERKERKE, D.R. Uptake, distribution and redistribution of ^{15}N nitrogen by *Vicia faba* under field conditions. Field Crops Research, Amsterdam, 8:93-104, 1984.
- DENILSON, R.F.; SINCLAIR, T.R.; ZOBEL, R.W.; JOHNSON, M.N.; DRAKE, G.M. A non-destructive field assay for soybean nitrogen fixation by acetylene reduction. Plant and Soil, The Hague, 70:173-182, 1983.
- DE-POLLI, H.; FRANCO, A.A.; ALMEIDA, D.L. de; DUQUE, F.F.; MONTEIRO, E.M. da S.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo na agricultura. Seropédica, UAPNPBS/EMBRAPA, 1988. 48p. (Documentos, 05).
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 127:285-294, 1966.
- DOUGLAS, L.A. & WEAVER, R.W. Partitioning of nitrogen-15-labeled biologically fixed nitrogen and nitrogen-15 labeled nitrate in cowpea during pod development. Agronomy Journal, Madison, 78:499-502, 1986.
- DOUGLAS, L.A. & WEAVER, R.W. Partitioning of biologically fixed nitrogen in cowpea during pod development. Plant and Soil, Dordrecht, 116(1):129-131, 1989.
- DUBOIS, J.D. & BURRIS, R.H. Comparative study of N and distribution in three lines of common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) at early pod filling stage. Plant and Soil, Dordrecht, 93(1):79-86, 1986.
- EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEEGER, R. Fertilizer-N effects on N_2 fixation by cowpea and soybean. Agronomy Journal, Madison, 75(1):61-66, 1983.
- EAGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A.; RAO, V.R.; ESKEW, D.L. Improving the nitrogen nutrition of maize by intercropping with cowpea. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 13:169-171, 1981.

- 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, The Hague, **68**:171-181, 1982a.
- EAGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A.; RAO, V.R.; ESKEW, D.L. Mineral N effect on cowpea and soybean crops in a Nigerian soil. II. Amounts of N fixed and accrual to the soil. Plant and Soil, The Hague, **68**:183-192, 1982b.
- EAGLESHAM, A.R.J.; MINCHIM, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; DART, P.J.; HUXLEY, P.A.; DAY, J.M. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*) III. Distribution of nitrogen within effectively nodulated plants. Experimental Agriculture, London, **13**:369-380, 1977.
- EDMEADES, D.C. & GOH, K.M. The use of the ^{15}N -dilution technique for field measurement of symbiotic nitrogen fixation. Communications in Soil Science and Plant Analysis, New York, **10**(3):513-520, 1979.
- EISBRENNER, G. & EVANS, H.J. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, **34**:105-136, 1983.
- ELHASSAN, G.A. & FOCHT, D.D. Comparison of inoculant and indigenous rhizobial dinitrogen fixation in cowpeas by direct nitrogen-15 analyses. Soil Science Society of America Journal, Madison, **50**:923-927, 1986.
- ELOWAD, H.O.A.; HALL, A.E.; JARELL, W.M. Comparisons of ureide and acetylene reduction methods for estimating biological nitrogen fixation by glasshouse-grown cowpea. Field Crops Research, Amsterdam, **15**:215-227, 1987.
- ERIKSEN, F.I. & WHITNEY, A.S. Effects of solar radiation regimes on growth and N_2 fixation of soybean, cowpea and bushbean. Agronomy Journal, Madison, **76**:529-535, 1984.

EZEDINMA, F.O.C. Effects of inoculation with local isolates of cowpea Rhizobium and application of nitrate-nitrogen on the development of cowpeas. Tropical Agriculture, Trinidad, **41**:243-249, 1964.

FAGÉRIA, N.K. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. Brasília, EMBRAPA-DPU, 1989.425p.

FAO QUARTERLY BULLETIN OF STATISTICS - 1991, Roma, **4**(3):56, 1991.

FARIA, S.M. de; LIMA, H.C. de; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F.; SPRENT, J.I. Nodulation of legume trees from South East Brazil. Plant and Soil, Dordrecht, **99**:347-356, 1987.

FERNANDEZ, G.C.J. & MILLER Jr., J.C. Yield component analysis in five cowpea cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, **110**(4):553-559, 1985.

FERNANDEZ, G.C.J & MILLER Jr., J.C. Interaction between rhizobial inoculation and fertilizer nitrogen in five cowpea cultivars. HortScience, Alexandria, **21**(6):1345-1348, 1986.

FERNANDEZ, G.C.J. & MILLER Jr., J.C. Plant growth analysis of field-grown cowpeas. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, **112**(6):1044-1052, 1987.

FERREIRA, J.M. & SILVA, P.S.L.e. Produtividade de "Feijão verde" e outras características de cultivares de caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, **22**(1):55-58, 1987.

FERY, R.L. Cowpea production in the United States. HortScience, Alexandria, **16**(4):474, 1981.

FERY, R.L. Introduction: Cowpea production, utilization, and improvement. In: SOUTHERNPEA (COWPEA) WORKSHOP, 2., Nashville, 1989. Proceedings, Nashville, American Society for Horticultural Science, 1990.p. 1-6.

- FIORE, M.F. Fixação biológica de nitrogênio associado com cultivares de arroz inundado. Piracicaba, 1989. 115p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FOCHT, D.D. & POTH, M. Measurement of biological nitrogen fixation by ^{15}N techniques. In: ELKAN, G.H. ed. Symbiotic nitrogen fixation technology. New York, Marcel Dekker, 1987. p.257-288.
- FONSECA, S.M. Fixação biológica de N_2 e absorção de ^{15}N mineral em variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1985. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FRANCO, A.A. & DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do N por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, Rio de Janeiro, 3:223-227, 1968.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology, Bethesda, 63:421-424, 1979.
- FRIED, M. Unification of two methods for measuring the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil, Dordrecht, 84:139-141, 1985.
- FRIED, M. & BROESHART, H. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil, The Hague, 43:707-711, 1975.
- FRIED, M. & MIDDELBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil, The Hague, 47:713-715, 1977.
- FRIED, M.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F. The methodology of measurement of N_2 fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. Canadian Journal Microbiology, Otawwa, 29:1053-1062, 1983.

- GILLER, K.E. Use and abuse of acetylene reduction assay for measurement of associated nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 19:783-784, 1987.
- GOH, K.M.; EDMANDES, D.C.; ROBINSON, B.W. Field measurement of symbiotic nitrogen fixation in an established pasture using acetylene reduction and a ^{15}N method. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 10:13-20, 1978.
- GORDON, A.J.; MACDUFF, J.H.; RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. White clover N_2 -fixation in response to root temperature and nitrate. II. N_2 -fixation, respiration and nitrate reductase activity. Journal of Experimental Botany, Oxford, 40:527-534, 1989.
- GRAHAM, R.A. & SCOTT, T.W. Response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to nitrogen and inoculation in Trinidad. Tropical Agriculture, Trinidad, 61(1):56-58, 1984.
- GUSS, A. & DÖBEREINER, J. Efeito da adubação e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio em feijão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia, Rio de Janeiro, 7:87-92, 1972.
- HAAKER, H. & VEEGER, C. Enzymology of nitrogen fixation. Trends in Biochemical Science, Amsterdam, 9:188-192, 1984.
- HAMDI, Y.A. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Roma, 1985, 188p. (Boletín de suelos de la FAO no. 49).
- HAMILTON, S.D.; CHALK, P.M.; SMITH, C.J.; HOPMANS, P. Effect of N fertilizer rate on the estimation of N_2 fixation by isotope dilution. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 23(12):1105-1110, 1991.
- HAMILTON, S.D.; SMITH, C.J.; CHALK, P.M.; HOPMANS, P. A model based on measurement of soil and plant ^{15}N enrichment to estimate N_2 fixation by soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in pots. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 24(1):71-78, 1992.

- HARDARSON, G. & DANSO, S.K.A. Use of ^{15}N 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).
- 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 Science, Madison, **28**:101-105, 1988.
- HARDARSON, G.; ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A. Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars. Plant and Soil, The Hague, **82**:397-405, 1984.
- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F.; REICHARDT, K. Measurements of nitrogen fixation in fababean at different N fertilizer rates using the ^{15}N isotope dilution and "A-Value" methods. Plant and Soil, Dordrecht, **131**:161-168, 1991.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT Jr., E. ATP-dependent reduction of azide and HCN by N_2 fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, **139**:69-90, 1966.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HOLSTON, R.O. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, **5**:47-81, 1973.
- 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 Physiology, Bethesda, **43**:1185-1207, 1968.
- HAUCK, R.D. & BREMNER, J.M. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. Advances in Agronomy, New York, **28**:219-265, 1976.
- HENSON, R.A. & BLISS, F.A. Effects of N fertilizer application timing on common bean production. Fertilizer Research, The Hague, **29**:133-138, 1991.

- HERNANDEZ, G. & DREVON, J.J. Influence of oxygen and acetylene during *in situ* open-flow assays of nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) in *Phaseolus vulgaris* root nodules. Journal of Plant Physiology, Stuttgart, 138:587-590, 1991.
- HERRIDGE, D.F. A whole-system approach to quantifying biological nitrogen fixation by legumes and associated gains and losses of nitrogen in agricultural systems. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C., ed. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, CIAT, 1982. p.593-608.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; RAINBIRD, R.M. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.. Plant Physiology, Bethesda, 62(4):495-498, 1978.
- HINE, J.C. & SPRENT, J.I. Growth of *Phaseolus vulgaris* on various nitrogen sources: the importance of urease. Journal of Experimental Botany, Oxford, 39(208):1505-1512, 1988.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 21(2):127-140, 1986.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Cultivar and rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. Plant and Soil, Dordrecht, 103:111-121, 1987.
- HUNGRIA, M. & RUSCHEL, A.P. Atividade da nitrogenase e evolução do hidrogênio pelos nódulos de *Phaseolus vulgaris*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 11:269-274, 1987.
- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A.A.; WALLSGROVE, R.M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. Journal of Experimental Botany, Oxford, 42(240):839-844, 1991.

- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 9(3):201-209, 1985.
- HUXLEY, P.A. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*) IV - Uptake and distribution of a single dose of early applied nitrogen. Tropical Agriculture, Trinidad, 57:193-202, 1980.
- HYNES, M.F. & O'CONNELL, M.P. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, 36:864-869, 1990.
- ISOI, T. & YOSHIDA, S. Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, 37(3):559-563, 1991.
- JAMRO, G.H. & LARIK, A.S. Influence of nitrogenous fertilizer on nodulation, leghaemoglobin content and biological nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Genética Agrária, Roma, 42(1):51-58, 1988.
- JENSEN, E.S. Symbiotic N₂ fixation in pea and field bean estimated by ¹⁵N fertilizer dilution in field experiments with barley as a reference crop. Plant and Soil, Dordrecht, 92:3-13, 1986.
- JENSEN, E.S.; ANDERSEN, A.J.; THOMSEN, J. D. The influence of seed-borne N in ¹⁵N isotope dilution studies with legumes. Acta Agriculturae Scandinavica, Stockholm, 35:428-443, 1985.
- JORDAN, D.C. The rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.C. Bergey's manual of systematic bacteriology, Baltimore, Williams and Wilkins, 1984. v.1, p. 234-256.
- JUNK, G. & SVEC, H.V. The absolute abundance of the nitrogen isotope in the atmosphere and compressed gas various sources. Geochimica et Cosmochimica Acta, London, 14:234-243, 1958.

- KESSEL, C. van & ROSKOSKI, J.P. Row spacing effects on N₂-fixation, N-yield and soil N uptake of intercropped cowpea and maize. Plant and Soil, Dordrecht, **111**:17-23, 1988.
- KOCH, B. & EVANS, H.J. Reduction of acetylene and ethylene by soybean root nodules. Plant Physiology, Bethesda, **41**:1748-1750, 1966.
- KURUVADI, S. & AGUILERA, D.M. Patrones del sistema radical en frijol común. (*Phaseolus vulgaris* L.). Turrialba, Costa Rica, **40**(4):491-498, 1990.
- LANGER, R.H.M. & HILL, G.D. Agricultural Plants. London, Cambridge University Press, 1982. 344p.
- LATUNDE-DADA, A.O. Genetic manipulation of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) for enhanced resistance to fungal pathogens and insect pests. Advances in Agronomy, New York, **44**:133-154, 1990.
- LAYZELL, D.B.; WEAGLE, G.E.; CANVIN, D.T. A highly sensitive, flow through H₂ gas analyzer for use in nitrogen fixation studies. Plant Physiology, Bethesda, **75**:582-585, 1984.
- LEDGARD, S.F.; MORTON, R.; FRENEY, J.R.; BERGERSEN, F.J.; SIMPSON, J.R. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plants in the ¹⁵N dilution measurement of N₂ fixation. I. Derivation of method. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, **17**:317-321, 1985.
- LEÓN, J. Botánica de los cultivos tropicales. San José, IICA, 1987. 445p.
- LEPO, J.E. & FERRENBACH, S.M. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: ELKAN, G.H. ed. Symbiotic nitrogen fixation technology. New York, Marcel Dekker, 1987, p.221-255.
- LIBARDI, P.L.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K.; CERVellini, A. Nitrogen cycling in a ¹⁵N-fertilized bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crops. Plant and Soil, The Hague, **67**:193-208, 1982.

- LIE, T.A. Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: QUISPÉL, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North Holland, 1974. v.33, p.555-582.
- LIMA, M.H. Eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio x evolução do H_2 x respiração dos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1981. 190p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- LJONES, T. The enzyme system. In: QUISPÉL, A., ed. The Biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North Holland, 1974. p.617-638.
- LUYINDULA, N. & WEAVER, R.W. Nitrogen partitioning in cowpea as influenced by rhizobial strain and mineral nitrogen. Agronomy Journal, Madison, 81(4):593-596, 1989.
- McAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE-ARANGO, H.; WOODHOUSE, W.W. Influence of inorganic nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N . Agronomy Journal, Madison, 50:334-347, 1958.
- McNEILL, A.M.; SHEEHY, J.E.; DRENNAN, D.S.H. The development and use of a flow-through apparatus for measuring nitrogenase activity and photosynthesis in field crops. Journal of Experimental Botany, Oxford, 40:187-194, 1989.
- MARIOTTI, A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ^{15}N abundance measurements. Nature, London, 303:685-687, 1983.
- MARTENSSON, A.M. & LJUNGGREN, H.D. A comparison between the acetylene reduction method, the isotope dilution method and the total nitrogen difference method for measuring nitrogen fixation in lucerne (*Medicago sativa* L.). Plant and Soil, The Hague, 81:177-184, 1984.
- MARTIN, F. Monitoring plant metabolism by ^{13}C , ^{15}N e ^{14}N nuclear magnetic resonance spectroscopy. A review of applications to algae, fungi and higher plants. Physiology Végétale, Paris, 23:463-490, 1985.

- MEIRELLES, N.M.D.; LIBARDI, P.L.; REICHARDT, K. Absorção e lixiviação de nitrogênio em cultura de feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* (Rosinha). Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 4:83-88, 1980.
- MILLER Jr., J.C.; SCOTT, L.M.; FERNANDEZ, G.C.J. Influence of root and shoot on N₂ fixation in cowpea. HortScience, Alexandria, 22(6):1313-1315, 1987.
- MILLER Jr., J.C.; SCOTT, J.S.; ZARY, K.W.; O'HAIR, S.K. The influence of available nitrate levels on nitrogen fixation in three cultivars of cowpea. Agronomy Journal, Madison, 74:14-18, 1982.
- MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E.; WITTY, J.F. Further errors in the acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. Journal of experimental Botany, Oxford, 37:1581-1591, 1986.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; NEVES, M.C.P. Nitrogen nutrition of cowpeas (*Vigna unguiculata*): effects of timing of inorganic nitrogen applications on nodulation, plant growth and seed yield. Tropical Agriculture, Trinidad, 58:1-12, 1981.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J.E.; MÜLLER, M. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. Journal of Experimental Botany, Oxford, 34(142):641-649, 1983.
- MONTANGE, D.; WAREMBOURG, F.R.; BARDIN, R. Utilisation du ¹⁵N₂ pour estimer la fixation d'azote et sa repartition chez les légumineuses. Plant and Soil, The Hague, 63:131-142, 1981.
- MURAOKA, T. Uso de técnicas isotópicas em fertilidade do solo. In: OLIVEIRA, A.J. de; GARRIDO, W.E.; ARAÚJO, J.D. de; LOURENÇO, S. Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília, EMBRAPA-SEA, 1991, p.225-273.

- MURAOKA, T.; OLIVEIRA, J.P.; BOARETTO, A.E.; VICTORIA, R.L. Efeitos da aplicação foliar de uréia e da adubação no solo de sulfato de amônio e uréia na produção e aproveitamento do N pelo feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Anais do Seminário Regional sobre Técnicas Nucleares na Produção de Plantas Agrícolas. OEA, CENA/USP, p.211-216, 1984.
- MURAOKA, T.; DAGHLIAN, C.; BOARETTO, A.E.; MATSUI, E. Absorption and translocation of foliar applied urea ^{15}N in bean plants. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna, 1991. p.411-412 (Proceedings series).
- NAUDÉ, S.M. The isotopes of nitrogen mass 15 and oxygen masses 18 and 17 and their abundance. Physiological Reviews, Lancaster, **36**:333-346, 1930.
- NEPTUNE, A.M.L. & MURAOKA, T. Aplicação de uréia- ^{15}N em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar carioca. Revista Brasileira de Ciência do Solo, campinas, **2**:51-55, 1978.
- NESHEIM, L. & BOLLER, B.C. nitrogen fixation by while clover when competing with grasses at moderately low temperatures. Plant and Soil, Dordrecht, **133**:47-56, 1991.
- 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. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, **17**(5):689-695, 1982.
- NOHRSTEDT, H. Ö. Natural formation of ethylene in forest soils and methods to correct results given by the acetylene-reduction assay. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, **15**:281-286, 1983.
- OFORI, F.; PATE, J.S.; STERN, W.R. Evaluation of N_2 -fixation and nitrogen economy of a maize/cowpea intercrop system using ^{15}N dilution methods. Plant and Soil, Dordrecht, **102**:149-160, 1987.

- OLIVEIRA, I.P. & DANTAS, J.P. nutrição mineral do caupi. In: ARAUJO, J.P. de & WATT, E.E. O caupi no Brasil. Brasília, IITA/EMBRAPA, 1988.p.405-430.
- OLIVEIRA, I.P. de & THUNG, M.D.T. Nutrição mineral. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do feijoeiro - fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.175-212.
- PATE, J.S.; PEOPLES, M.B.; AART, J.E. van B.; KUO, J.; CRAIG, A.A. Diurnal water balance of the cowpea fruit. Plant Physiology, Bethesda, 77:148-156, 1985.
- PATRA, D.D.; SACHDEV, M.S.; SUBBIAH, B.V. Residual value of ¹⁵N-labelled fertilizer applied to a maize-cowpea intercropping system. Biology and Fertility of Soils, New York, 8(2):183-188, 1989.
- PEOPLES, M.B. & HERRIDGE, D.F. Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. Advances in Agronomy, New York, 44:155-223, 1990.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; BERGERSEN, F.J. Measurement of nitrogen fixation in crop and shrub legumes. In: SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE: GREEN MANURE IN RICE FARMING, Manila, 1988. Manila, IRRI, 1988. p. 223-237.
- PEOPLES, M.B.; PATE, J.S.; ATKINS, C.A. Mobilization of nitrogen in fruiting plants of a cultivar of cowpea. Journal of Experimental Botany, Oxford, 34:563-578, 1983.
- PEOPLES, M.B.; PATE, J.S.; ATKINS, C.A. The effect of nitrogen source on transport and metabolism of nitrogen in fruiting plants of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Journal of Experimental Botany, Oxford, 36(165):567-582, 1985.
- PEREIRA, P.A.A.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. ¹⁵N-determined dinitrogen fixation potential of generically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant and Soil, Dordrecht, 120:171-179, 1989.

- PEREIRA, P.A.A.; VON BÜLOW, J.F.W.; NEYRA, C.A. Atividade da nitrogenase, nitrato redutase e acumulação de nitrogênio em milho braquítico *Zea mays* L.(cv. Piranão) em dois níveis de adubação nitrogenada. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 2(1):28-33, 1978.
- PIHA, M.I. & MUNNS, D.N. Nitrogen fixation capacity of field-grown bean compared to other grain legumes. Agronomy Journal, Madison, 79:690-696, 1987.
- PINERO, D.; MARTINEZ, E.; SELARDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 54:2825-2832, 1988.
- PORTER, L.K. & O'DEEN, W.A. Apparatus for preparing nitrogen from ammonium chloride for nitrogen-15 determinations. Analytical Chemistry, Washington, 49(3):514-516, 1977.
- PRESTON, C.M. Optical emission ^{15}N analysis techniques in forestry research. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna, 1991. p.49-50 (Proceedings series).
- PRÉVOST, D. & BROMFIELD, E.S.P. Effect of low root temperature on symbiotic nitrogen fixation and competitive nodulation of *Onobrychis viciifolia* (sainfoin) by strains of arctic and temperate rhizobia. Biology and Fertility of Soils, New York, 12:161-164, 1991.
- PROKSCH, G. Routine analysis of ^{15}N in plant material by mass spectrometry. Plant and Soil, The Hague, 31:380-384, 1969.
- RACHIE, K.O. & ROBERTS, L.M. Grain legumes of the lowland tropics. Advances in Agronomy, New York, 26:1-132, 1974.
- RENNIE, R.J. Comparison of ^{15}N aided methods for determining symbiotic dinitrogen fixation. Revue d'ecologie et de biologie du sol, Montrouge, 16:455-463, 1979.

- RENNIE, R.J. Quantifying dinitrogen (N_2) fixation in soybeans by ^{15}N isotope dilution: the question of the nonfixing control plant. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 60:856-861, 1982.
- RENNIE, R.J. Comparison of N balance and ^{15}N isotope dilution to qualify N_2 fixation in field-grown legumes. Agronomy Journal, Madison, 76(5):785-790, 1984.
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. Selection for dinitrogen-fixing ability in *Phaseolus vulgaris* L. at two low-temperature regimes. Euphytica, Wageningen, 30:87-95. 1981a
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. Dinitrogen fixation in pea beans (*Phaseolus vulgaris*) as affected by growth stage and temperature regime. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 59(7):1181-1188, 1981b.
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. N_2 -fixation in field beans quantified by ^{15}N isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. Agronomy Journal, Madison, 75:645-649, 1983.
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. ^{15}N -determined time course for N_2 fixation in two cultivars of field bean. Agronomy Journal, Madison, 76:146-154, 1984.
- RENNIE, R.J. & RENNIE, D.A. Techniques for quantifying N_2 fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, 29:1022-1035, 1983.
- RENNIE, R.J.; RENNIE, D.A.; FRIED, M. Concepts of ^{15}N usage in dinitrogen fixation studies. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Isotopes in biological dinitrogen fixation. Vienna, 1978. p.107-133 (Panel proceedings series).
- RENNIE, R.J.; DUBETZ, S.; BOLE, J.B.; MUENDEL, H.H. Dinitrogen fixation measured by ^{15}N isotope dilution in two canadian soubean cultivars. Agronomy Journal, Madison, 74:725-730, 1982.

- REYES CUESTA, R. Crescimento e produção de dois cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. em função da fonte de nitrogênio. Viçosa, 1991. 157p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa-MG).
- RICHARDS, J.E. & SOPER, R.J. Effect of N fertilizer on yield, protein content, and symbiotic N fixation in fababean. Agronomy Journal, Madison, 71:807-811, 1979.
- RIVERA-ORTIZ, J.M. & BURRIS, R.H. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. Journal of bacteriology, Baltimore, 123:537-545, 1975.
- ROBERTS, J.K.M. NMR in plant Biochemistry. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. eds. The Biochemistry of Plants. San Diego, Academic Press, 1987, v.13, cap.4, p.181-227.
- ROSS, P.J. & MARTIN, A.E. A rapid procedure for preparing gas samples for nitrogen-15 determination. Analyst, London, 95:817-822, 1970.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T., VOSE, P.B. Atividade da redutase do nitrato e nitrogenase com relação ao N absorvido do solo, ^{15}N -fertilizante e fixação simbiótica em soja (*Glycine max*). Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2(1):8-17, 1980.
- RUSCHEL, A.P.; SALATI, S.; VOSE, P.B. nitrogen enrichment of soil plant by *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* symbiosis. Plant and Soil, The Hague, 51:425-429, 1979.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean, *Glycine max*. Plant and Soil The Hague, 53:513-525, 1979.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T. Field evaluation of N_2 -fixation and N-utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ^{15}N isotope dilution. Plant and Soil, The Hague, 65:397-407, 1982.

- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E.; GORDON, A.J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. I. Nitrogen fixation and the respiration of the nodulated root. Journal of Experimental Botany, Oxford, 30:135-144, 1979.
- SAITO, S.M.T. Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, 1978. 98p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SAITO, S.M.T.; MATSUI, E.; SALATI, E. $^{15}\text{N}_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. Physiology Plantarum, Copenhagen, 49:37-42, 1980.
- SAITO, S.M.T.; MONTANHEIRO, M.N.S.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K. The effects of N fertilizer and soil moisture on the nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris*. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 103(1):87-93, 1984.
- SANABRIA, C.A. Nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* as quantified by the N-15 isotope dilution method. Soils Newsletter, Vienna, 13(2):9, 1990.
- SANABRIA, C.A.; PAPPA, J.L.; SOTO, J.J. Quantification of N_2 fixation in genotypes of *Phaseolus vulgaris* L. by the isotope dilution technique. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna, 1991. p.223-226 (Proceedings series).
- SANCHEZ, F.; PADILLA, J.E.; PEREZ, H.; LARA, M. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. Palo Alto, 42:507-528, 1991.
- SANTOS, D.R.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. Inoculação do caupi em solo salinizado da região semi-árida do Nordeste do Brasil. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 14:291-295, 1990.

- SCHOENHEIMER, R.; RITTENBERG, D.; FOSTER, G.L.; KESTON, A.S.; RATNER, S. The application of the nitrogen isotope ^{15}N for the study of protein metabolism. Science, New York, 88:599-600, 1938.
- SCHÖLLHORN, R. & BURRIS, R.H. Study of the intermediates in nitrogen fixation. Federation Proceedings, Baltimore, 24:710, 1966.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., Washington, 73(4):1207-1211, 1976.
- SENARATANE, R.; AMORNPIMOL, C.; HARDARSON, G. Effect of combined nitrogen on nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) as affected by cultivar and rhizobial strain. Plant and Soil, Dordrecht, 103:45-50, 1987.
- SILVA, A.J. da. Resposta de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à adubação nitrogenada. Lavras. 1988. 85p. (Mestrado - Universidade Federal de Lavras/MG).
- SILVEIRA, J.A.G. da; CASTRO, P.R.C.; DECHEN, A.R. Partição de nitrogênio e distribuição da matéria seca em três cultivares de caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 24(9):1153-1160, 1989.
- SPRENT, J.I. Biology of nitrogen-fixing organisms. London, McGraw-Hill, 1979.
- SPRENT, J.I. & SPRENT, p. Nitrogen fixing organisms. pure and applied aspects. London, Chapman and Hall, 1990. 256p.
- SPRENT, J.I. & THOMAS, R.J. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. Plant and cell Environment, Oxford, 7:637-645, 1984.
- SRIVASTAVA, H.S. Distribution of nitrate reductase in ageing bean seedlings. Plant and Cell Physiology, Tokyo, 16:995-999, 1975.

- STAMFORD, N.P. Efeito de estirpes de *Rhizobium* sp., do nitrogênio, fósforo e enxofre na avaliação da fixação do N_2 , crescimento e absorção de nutrientes em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Piracicaba, 11978. 151p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ST. CLAIR, D.A. & BLISS, F.A. Intrapopulation recombination for ^{15}N -determined dinitrogen fixation ability in common bean. Plant Breeding, Berlin, 106:215-225, 1991.
- ST. CLAIR, D.A.; WOLYN, D.J.; DuBOIS, J.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. Field comparison of dinitrogen fixation determined with nitrogen-15-depleted and nitrogen-15 enriched ammonium sulfate in selected inbred backcross lines of common bean. Crop Science, Madison, 28:773-778, 1988.
- STEELE, W.M.; ALLEN, D.J.; SUMMERFIELD, R.J. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: SUMMERFIELD, R.J. & ROBERTS, E.H. Grain legume crops. London, Collins, 1985. cap. 12, p.520-583.
- SUMMERFIELD, R.J.; HUXLEY, P.A.; DART, P.J.; HUGHES, A.P. Some effects of environmental stress on seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp.) cv. Prima. Plant and Soil, The Hague, 44:527-546, 1976.
- 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, London, 13:129-142, 1977.
- TALBOTT, H.J.; KENWORTHY, W.J.; LEGG, J.O. Field comparison of the nitrogen-15 and difference methods of measuring nitrogen fixation. Agronomy Journal, Madison, 74:799-804, 1982.
- TEIXEIRA, S.M. & ROCHA, L.S. de A. Análise sócio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do feijoeiro, fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.37-56.

- THOMAS, R.J. & SPRENT, J.I. The effects of temperature on vegetative and early reproductive growth of a cold-tolerant and a cold sensitive line of *Phaseolus vulgaris* L. 1. Nodulation, growth and partitioning of dry matter, carbon and nitrogen. Annals of Botany, Oxford, **53**:579-588, 1984.
- TRIVELIN, P.C.O. Medida da fixação simbiótica do nitrogênio marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento isotópico. Piracicaba, 1982, 162p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- TRIVELIN, P.C.O. & BOARETTO, A.E. Uso de isótopos como traçadores em fertilidade do solo e nutrição de plantas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 19, Santa Maria. 1990 (no prelo).
- TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. Preparo de amostras para análise de ^{15}N por espectrometria de massa. Piracicaba, CENA, 1973. 41p. (Boletim técnico, 2).
- TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E.; SAITO, S.M.T.; LIBARDI, P.L. Medida da fixação de nitrogênio atmosférico em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca, empregando-se o método com $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento. Energia Nuclear & Agricultura, Piracicaba, **6**(1):55-74, 1984.
- TSAI, S.M. Improvement of BNF in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soils Newsletter, Vienna, **13**(2):11, 1990.
- TURNER, G.L. & GIBSON, A.H. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: BERGERSEN, F.J. Methods for evaluating biological nitrogen fixation, Chichester, John Willey & Sons, 1980. p.111-138.
- UPCHURCH, R.C. Estimation of bacterial nitrogen fixation using acetylene reduction. In: ELKAN, G.M. Symbiotic nitrogen fixation technology. New York, Marcel Dekker, 1987. p.289-305.

- UREY, H.C.; FOX, M.; HUFFMAN, J.R.; THODE, H.G. A concentration of ^{15}N by a chemical exchange reaction. Journal of the American Chemical Society, Easton, **59**(7):1407-1408, 1937.
- URQUIAGA-CABALLERO, S.S. Dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Carioca. Piracicaba, 1982. 154p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. Theoretical considerations in the comparison of total nitrogen difference and ^{15}N isotope dilution estimates of the contribution of nitrogen fixation to plant nutrition. Plant and Soil, Dordrecht, **102**:291-294, 1987.
- VASILAS, B.L. & HAM, G.E. Nitrogen fixation in soybeans: an evaluation of measurement techniques. Agronomy Journal, Madison, **76**:759-764, 1984.
- VASILAS, B.L.; NELSON, R.L.; HEUVEL, R.M.V. Effect of method and plant sample on nitrogen fixation estimates in soybean. Agronomy Journal, Madison, **82**:673-676, 1990.
- VENKATE SWARLU, B.; SAHARAN, N.; MAHESWARI, M. Nodulation and $\text{N}_2(\text{C}_2\text{H}_2)$ fixation in cowpea and groundnut during water stress and recovery. Field Crops Research, Amsterdam, **25**:223-232, 1990.
- VESSEY, J.K. & WATERER, J. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules. recent developments. Physiologia Plantarum, Copenhagen, **84**:171-176, 1992.
- VICKERY, H.B.; PUCHER, G.W.; SCHOENHEIMER, R.; RITTENBERG, D. The metabolism of nitrogen in the leaves of the buckwheat plant. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, **129**(1):791-792, 1939.

- VIEIRA, C. Perspectiva da cultura do feijão e de outras leguminosas de grão no país e no mundo. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do feijoeiro, fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.3-19.
- VIEIRA, R.F. Comparações de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Viçosa, 1989. 213p. (Doutorado - Universidade Federal de Viçosa, MG).
- VOET, D. & VOET, J.G. Biochemistry. New York, John Willey & Sons. 1990. 1223p.
- VOSE, P.B. & VICTORIA, R.L. Re-examination of the limitations of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. In: HAUCK, R.D. & WEAVER, R.W. ed. Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification. Madison, SSSA, 1986. p.23-41 (SSSA Special publications, 18).
- VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T.; MATSUI, E. 15-nitrogen as a tool in biological nitrogen fixation research. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TECHNOLOGY FOR TROPICAL AGRICULTURE, Cali, 18p. 1981.
- WAGNER, G.H. & ZAPATA, F. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. Agronomy Journal, madison, 74:607-612, 1982.
- WALKER, D.W. & MILLER, Jr. J.C. Influence of water stress on nitrogen fixation in cowpea. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, 111(3):451-458, 1986.
- WALKER, F.W.; KIROUAC, G.J.; ROURKE, F.M. Chart of the nuclides. 12nd ed. Schenectady, Educational Relations, General Eletric Company, 1977.
- WATANABE, I. Errors related to the ¹⁵N dilution method for estimating nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. Vienna, 1991. p.83-88 (Proceedings series).

- WATANABE, I.; CHIU, C.Y.; YOSHIDA, T. Estimation of N_2 fixation in soybean and cowpea by using soil residual ^{15}N . Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, **36**(3):375-381, 1990.
- WEAVER, R.W. Isotope dilution as a method for measuring nitrogen transfer from forage legumes to grasses. In: BECK, D.P. & MATERON, L.A. (eds.). Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1988. p.359-365
- WEBER, C.R. Nodulating and nonnodulating soybean isolines. II. Response to applied nitrogen and modified soil condition. Agronomy Journal, Madison, **58**:46-49, 1966.
- WERY, J.; TURC, O.; SALSAC, L. Relationship between growth nitrogen fixation and assimilation in a legume (*Medicago sativa* L.). Plant and Soil, Dordrecht, **96**:17-29, 1986.
- WESTERMANN, D.T.; PORTER, L.K.; O'DEEN, W.A. Nitrogen partitioning and mobilization patterns in bean plants. Crop Science, Madison, **25**(2):225-229, 1985.
- WILLIAMS, W.A.; JONES, M.B.; DELWICHE, C.C. Clover N-fixation measurement by total-N difference and ^{15}N A-values in lysimeters. Agronomy Journal, madison, **69**(6):1023-1024, 1977.
- WITTY, J.F. Estimating N_2 -fixation in the field using ^{15}N - l a b e l l e d fertilizer: Some problems and solutions. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, **15**(6):631-639, 1983.
- WITTY, J.F. & DAY, J.M. Use of $^{15}N_2$, in evaluating asymbiotic N_2 fixation. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Isotopes in biological dinitrogen fixation. Vienna, 1978. p.135-149. (Panel Proceedings Series).
- WITTY, J.F. & GILLER, K.E. Evaluation of errors in the measurement of biological nitrogen fixation using ^{15}N fertilizer. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies. Vienna, 1991. p.59-72. (Proceedings series).

WITTY, J.F. & MINCHIN, F.R. Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; Myths and mysteries. In: BECK, D.P. & MATERON, L.A. (eds.). Nitrogen fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, p.331-344, 1988.

WITTY, J.F. & RITZ, K. Slow-release ^{15}N fertilizer formulations to measure N_2 -fixation by isotope dilution. Soil Biology and biochemistry, Oxford, 16:657-661, 1984.

WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E.; MINGUEZ, M.I. Acetylene-induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase activity of legume root nodules. Annals of Botany, Oxford, 53:13-20, 1984.

WOLYN, D.J.; ST. CLAIR, D.A.; DuBOIS, J.; ROSAS, J.C.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. Distribution of nitrogen in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes selected for differences in nitrogen fixation ability. Plant and Soil, Dordrecht, 138:303-311, 1991.

WUTKE, A.C.P. Nitrogênio. In: MONIZ, A.C. Elementos de pedologia, São Paulo, Ed. Polígono, 1972. p.179-189.

YONEYAMA, A.N. & ISHIZUKI, J. ^{15}N study on the partitioning of the nitrogen taken by soybean from atmospheric dinitrogen, medium nitrate or ammonium. Soil Science and Plant Nutrition, 28:451-461, 1982.

YONEYAMA, T.; NAMBIAR, P.T.C.; LEE, K.K.; SRINIVASA RAO, B.; WILLIAMS, J.H. Nitrogen accumulation in three legumes and two cereals with emphasis on estimation of N_2 fixation in the legumes by the natural ^{15}N -abundance technique. Biology and fertility of Soils. New York, 9(1):25-30, 1990.

YOSHIDA, T. & YONEYAMA, T. Atmospheric dinitrogen fixation in the flooded rice rhizosphere as determined by the ^{15}N isotope technique. Soil Science and Plant Nutrition. Tokyo, 26(4):551-559, 1980.

- YOURSTONE, K.S. & WALLACE, D.H. Effects of photoperiod and temperature on rate of node development in indeterminate bean. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, **115**(5):824-828, 1990.
- ZABLOROWICZ, R.M.; FOCHT, D.D.; CANNELL, G.H. Nodulation and N fixation of field-grown California cowpeas as influenced by well irrigated and droughted conditions. Agronomy Journal, Madison, **73**:9-12, 1981 .
- ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A; HARDARSON, G.; FRIED, M. Time course of nitrogen fixation in field grown soybean using nitrogen-15 methodology. Agronomy Journal, madison, **79**:172-176, 1987a.
- ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G.; FRIED, M. Nitrogen fixation and translocation in field-grown fababean. Agronomy Journal, Madison, **79**:505-509,. 1987b.
- ZARY, K.W. & MILLER Jr., J.C. The influence of genotype on diurnal and seasonal patterns of nitrogen fixation in southernpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, **105**(5):699-701, 1980.
- ZIMMERMANN, M.J. de O. & TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T. Cultura do feijoeiro, fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, POTAFOS, 1988. p.79-85.