EFEITO DE ESTIRPES DE *Rhizobium sp.*, DO NITROGÊNIO,
FÓSFORO E ENXÔFRE NA AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DO N₂,
CRESCIMENTO E ABSORÇÃO DE NUTRIENTES EM CULTIVARES
DE *Vigna unguiculata* (L) WALP.

NEWTON PEREIRA STAMFORD

Orientador: Prof. Dr. André Martin Louis Neptune

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz"
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor
em Solos e Nutrição de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
setembro, 1978

A MEUS PAIS,
TÂNIA,
BRUNO E
THAYZA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. André Martin Louis Neptune, pelo estímulo e confiança dispensados na sua orientação firme e decidida.

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes, pelas importantes sugestões.

Ao Prof. Virgílio Franco do Nascimento Filho, pelo apoio na realização dos trabalhos com uso de radioisótopos.

Aos colegas e pessoal técnico administrativo do Setor de Fertilizantes e Fertilidade do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da ESALQ/USP, pela receptividade, prestimosidade e amizade sempre demonstrados.

Aos colegas da Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da ESALQ/USP, por possibilitarem a realização dos trabalhos microbiológicos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, por nos proporcionar a realização do curso.

A CAPES, e ao PEAS por acreditar no nosso trabalho contribuindo com recursos financeiros.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação da ESALQ/USP, pela preparação e conhecimentos transmitidos.

iii.

Agradecimentos são estendidos a todos aqueles que direta ou in diretamente, e de maneira igualmente valiosa, contribuíram pa ra a elaboração deste trabalho.

Finalmente, e principalmente, a Deus que nos permitiu reunir as condições para a execução deste trabalho e nos concedeu a Graça de poder batalhar por um ideal em Seu Nome.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1. Nodulação e fixação do N ₂	9
3.1.1. Inoculação cruzada	9
3.1.2. Competição com estirpes nativas do solo..	11
3.1.3. Efeitos da inoculação das sementes	12
3.1.4. Efeitos dos nutrientes	15
3.2. Estado nutricional	17
3.3. Produção, crescimento e absorção de nutrientes .	19
3.3.1. Efeitos da adubação básica - NPK	19
3.3.2. Efeitos do nitrogênio	21
3.3.3. Efeitos do fósforo	22
3.3.4. Efeitos do enxofre	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Experimento 1	25
4.1.1. Esquema experimental	25
4.1.2. Instalação e condução do experimento	26
4.1.3. Colheita do experimento	27
4.1.4. Análise química e estudo da fixação do N ₂	27
4.2. Experimento 2	28

4.2.1. Esquema experimental	28
4.2.2. Solos utilizados	28
4.2.3. Cultivares utilizadas	29
4.2.4. Instalação do experimento	29
4.2.5. Condução do experimento	31
4.2.6. Colheita do experimento	32
4.2.7. Análise química e bioquímica	33
4.2.8. Detecção das radiações	34
4.2.9. Relação isotópica $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$	37
4.3. Experimento 3	38
4.3.1. Esquema experimental	38
4.3.2. Solos utilizados	38
4.3.3. Instalação e condução do experimento	39
4.3.4. Colheita do experimento	40
4.3.5. Análise química e detecção das radiações.	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Modulação e fixação do dinitrogênio	42
5.1.1. Inoculação cruzada	42
5.1.2. Competição do Rhizobium	44
5.1.3. Efeitos dos nutrientes	46
5.2. Estado nutricional	48
5.2.1. Concentração e distribuição do N-P-S.....	48
5.2.2. Aspectos do metabolismo do nitrogênio ...	50
5.3. Crescimento e absorção de nutrientes	54
5.3.1. Efeitos do nitrogênio	55

5.3.2. Efeitos do fósforo e enxofre	59
5.3.2.1. Produção de matéria seca	59
5.3.2.2. Absorção de N-P-S	60
5.3.2.3. Fósforo e enxofre na planta pro- veniente do fertilizante	63
6. CONCLUSÕES	66
7. SUMMARY	68
8. LITERATURA CITADA	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tratamento com nitrogênio (experimento 2) ...	88
Tabela 2. Características dos solos usados	89
Tabela 3. Balanceamento de nutrientes, fontes e doses da adubação básica (experimento 2)	90
Tabela 4. Principais características do ³² P e do ³⁵ S ..	91
Tabela 5. Tratamento com fósforo e enxofre (experimento 3)	91
Tabela 6. Nodulação e fixação do N ₂ por quatro cultiva- res de <i>Vigna unguiculata</i>	92
Tabela 7. Análise de variância parcial do experimento 1.	93
Tabela 8. Especificidade hospedeira de <i>Vigna unguicu- lata</i> inoculada com três diferentes estirpes .	94
Tabela 9. Formação de nódulos pretos e normais em con- dição de semi esterilização	94
Tabela 10. Formação de nódulos pretos em função de trata- mentos com nitrogênio	95
Tabela 11. Atividade da nitrogenase - experimento 2	96
Tabela 12. Análise de variância parcial para número e peso de nódulos, atividade da nitrogenase e da reductase do nitrato	96
Tabela 13. Efeitos dos tratamentos na matéria seca e na concentração de N, P e S nas folhas	97
Tabela 14. Análise de variância parcial para concentra- ções de N, P e S nas folhas	98

Tabela 15. Efeitos dos tratamentos no nitrogênio livre ..	99
Tabela 16. Relações entre ARN e N-total nas folhas, em função dos níveis	100
Tabela 17. N-total e N-proteico nas folhas em função dos níveis e fontes de nitrogênio	101
Tabela 18. Análise de variância parcial para o fraciona- mento do nitrogênio e açúcar nas folhas	102
Tabela 19. Efeitos dos tratamentos com nitrogênio no pe- so da matéria seca	103
Tabela 20. Relações entre peso de matéria fresca e seca, e doses e fontes de nitrogênio	104
Tabela 21. Efeitos das fontes e níveis de nitrogênio na absorção de nutrientes	105
Tabela 22. Análise de variância parcial para peso da planta, e nitrogênio, fósforo e enxofre nas folhas	106
Tabela 23. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio no nitrogênio, fósforo e enxofre proveniente do fertilizante	107
Tabela 24. Análise de variância parcial para percentagem de nitrogênio, fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante	108
Tabela 25. Efeitos da calagem e equilíbrio fósforo-enxo- fre na matéria seca e nitrogênio absorvido ..	109

Tabela 26. Efeitos da calagem e equilíbrio fósforo-enxofre no fósforo e enxofre absorvidos	110
Tabela 27. Efeitos da calagem e equilíbrio fósforo-enxofre nas percentagens de fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante	111
Tabela 28. Equações de regressão entre matéria seca e <u>n</u> itrogênio absorvido, com doses de fósforo ...	112
Tabela 29. Análise de regressão do fósforo e enxofre absorvidos e as doses de fósforo	113
Tabela 30. Correlações entre N-total, P-total e S-total e matéria seca da parte aérea	114
Tabela 31. Correlações entre P-total, S-total e matéria seca e percentagem de fósforo na planta <u>pro</u> veniente do fertilizante	115
Tabela 32. Correlações entre percentagem de fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante, e doses de fósforo, em função da calagem e doses de enxofre	116
Tabela 33. Análise de variância parcial para peso de <u>ma</u> téria seca, nitrogênio, fósforo e enxofre absorvidos e fósforo e enxofre na planta <u>pro</u> venientes do fertilizante	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto interno dos nódulos pretos e normais.	118
Figura 2. Vasos de Leonard	118
Figura 3. Vasos utilizados nos experimentos com solo ..	119
Figura 4. Aspecto dos nódulos da cultivar "Garoto" inoculada com a estirpe 5.000 (Rothamsted)	119
Figura 5. Curvas de correlação entre nitrogênio total das plantas e peso de matéria seca dos nódulos	120
Figura 6. Influência da inoculação e adubação nitrogenada na nodulação e na atividade da nitrogenase.	121
Figura 7. Relação entre a atividade da nitrogenase e peso da matéria seca dos nódulos	122
Figura 8. Distribuição relativa do nitrogênio nas folhas, ramos e raízes	123
Figura 9. Distribuição relativa do fósforo, nas folhas, ramos e raízes	123
Figura 10. Distribuição relativa do enxofre, nas folhas, ramos e raízes	124
Figura 11. Relação entre o $N-NO_3^-$ nas folhas e o N nas folhas proveniente do fertilizante	125
Figura 12. Relação entre $N-NH_4^+$ nas folhas e o N nas folhas proveniente do fertilizante	126
Figura 13. Relação entre o N-amino nas folhas e o N nas folhas proveniente do fertilizante	127

Figura 14. Relação entre o N-proteico nas folhas e o N nas folhas proveniente do fertilizante	128
Figura 15. Relação entre N-proteico e N-amino nas folhas	129
Figura 16. Relação entre N-proteico e N-total nas folhas.	130
Figura 17. Atividade da reductase do nitrato em função do tempo, na cultivar "Garôto"	131
Figura 18. Atividade da reductase do nitrato em função do tempo, na cultivar "Sempre Verde"	132
Figura 19. Relação entre o N-amino nas folhas e a atividade da reductase do nitrato	133
Figura 20. Relação entre o N-proteico nas folhas e a atividade da reductase do nitrato	134
Figura 21. Relação entre o N-total nas folhas e a atividade da reductase do nitrato	135
Figura 22. Relação entre o nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e a atividade da reductase do nitrato	136
Figura 23. Relação entre o peso da matéria seca das folhas e a atividade da reductase do nitrato ..	137
Figura 24. Relação entre o peso da matéria seca das folhas e N-total nas folhas	138
Figura 25. Relação entre o peso da matéria seca das folhas e o nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante	139

Figura 26. Relação entre o N-total na parte aérea e o <u>n</u> itrogênio na folha proveniente do fertilizante	140
Figura 27. Relação entre o N-total na planta inteira e o <u>n</u> itrogênio nas folhas proveniente do fertilizante	141
Figura 28. Peso da matéria seca das folhas, ramos e raízes em função dos tratamentos	142
Figura 29. Nitrogênio total acumulado nas raízes, ramos e folhas	143
Figura 30. Relação entre o peso da matéria seca da parte aérea e níveis de fósforo, em função da calagem	144
Figura 31. Relação entre o peso da matéria seca da parte aérea e níveis de fósforo, em função das doses de enxofre	145
Figura 32. Relação entre o N-total na parte aérea e níveis de fósforo, em função da calagem	146
Figura 33. Relação entre N-total na parte aérea e os níveis de fósforo, em função das doses de enxofre	147
Figura 34. Relação entre P-total na parte aérea e níveis de fósforo, em função da calagem	148
Figura 35. Relação entre S-total na parte aérea e níveis de fósforo, em função da calagem	149

Figura 36. Relação entre o fósforo na planta proveniente do fertilizante e níveis de fósforo, em fun- ção da calagem	150
Figura 37. Relação entre o fósforo na planta proveniente do fertilizante e os níveis de fósforo, em função das doses de enxofre	151

1. RESUMO

Foram conduzidos três experimentos, o primeiro em vasos de Leonard e os dois últimos em vasos com solo. No primeiro foram usados cinco tratamentos com inoculação e quatro cultivares de *Vigna unguiculata*. No segundo foram utilizadas as cultivares "Garoto" e "Sempre Verde" e dois solos (Podzol Hidromórfico e Podzólico Vermelho Amarelo), com três níveis de N(0,25 e 100ppm) aplicado como sulfato de amonio e nitrato de amonio, e a inoculação com a estirpe C-102. No último experimento foi usada a cultivar "Sempre Verde" em dois solos (Podzólico Vermelho Amarelo e Latossol Vermelho Amarelo), com quatro doses de P(50, 100, 200 e 400ppm), duas doses de S(60 e 120ppm) e os tratamentos sem e com calagem (2.000kg/ha). Em todos os experimentos os tratamentos foram distribuídos em blocos ao acaso, com três repetições.

Os resultados mostraram que o número e peso de nódulos foram influenciados pelas estirpes. Foi observada espe

cificidade hospedeira, com a cultivar "Carirí" fixando mais nitrogênio com a estirpe C-101 e as demais cultivares com a estirpe 5.000. A estirpe C-102 formou nódulos pretos em todas as cultivares e C-101 nas cultivares "Sempre Verde" e "Carirí".

Na competição entre as estirpes não observou-se efeito na formação de nódulos e a estirpe 5.000 foi mais competitiva na nodulação. Em competição com as estirpes do solo a estirpe C-102 formou apenas cerca de 20% dos nódulos. A regressão linear entre N total e peso de nódulos mostrou duas retas distintas, uma para a cultivar "Garôto" e outra para as demais cultivares, com grande diferença entre as duas retas.

A aplicação de 100ppm de N foi totalmente prejudicial à nodulação tanto na forma de sulfato como nitrato de amônio. A dose de arranque não favoreceu a fixação, e o nitrogênio cedido pela simbiose foi insuficiente para o desenvolvimento normal das plantas. A adição de fósforo e enxofre não influenciaram na formação de nódulos quando foi usada a dose de nitrogênio no nível de 100ppm.

Os teores de nitrogênio, fósforo e enxofre foram elevados e crescentes com o aumento das doses aplicadas. O nitrogênio e o fósforo apresentaram maior concentração nas folhas, enquanto o enxofre mostrou as mesmas proporções nas folhas e ramos.

A atividade da reductase do nitrato, e os teores de N-amino e N-protéico mostraram correlação positiva com as

3.

doses de nitrogênio, e a reductase do nitrato, $N-NH_4^+$; $N-NO_3^-$, N-amino e N-protéico e matéria seca apresentaram estreita relação com o nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante.

A reductase do nitrato foi influenciada pela idade da planta e ativada pela adição de nitrogênio, particularmente na forma de nitrato de amônio.

No crescimento e absorção de nutrientes observou-se maior influência do nitrato de amônio na dose de 100ppm. A aplicação de fósforo mostrou efeito positivo na absorção total de nitrogênio, fósforo e enxofre, enquanto a adição deste último influenciou apenas na absorção do enxofre. A calagem favoreceu a absorção do fósforo apenas no Latossol Vermelho Amarelo.

O fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante aumentou com o incremento das doses de fósforo e enxofre, mas não foi observado efeito dos tratamentos com N na absorção destes nutrientes.

2. INTRODUÇÃO

O plano mundial para o desenvolvimento agrícola publicado pela FAO em 1970 ressalta a importância do aumento de produção de proteína a baixo custo, e afirma que as leguminosas de grão constituem o meio mais eficiente para corrigir a deficiência nutricional dos nossos dias. Entre estas leguminosas, uma das espécies de grande potencial é o feijão *Vigna unguiculata* (L) Walp., até pouco tempo classificado como *Vigna sinensis* (L) Endl., da sub família Papilionoideae, (PURSEGLOVE, 1968). É uma cultura antiga, originária da África (JOHNSON e RAYMOND, 1964), cultivada nos trópicos e subtrópicos, onde é denominada vulgarmente cowpea, feijão macáçar, feijão de corda, feijão verde, feijão baiano.

A Nigéria, principal País produtor de feijão *Vigna unguiculata* (L) Walp., tem produção total de mais de um bilhão de quilos por ano, embora com um rendimento de apenas 224 quilos por hectare (SUMMERFIELD, 1974). Entretanto, na

Califórnia, valores como 3.024 quilos por hectare foram obtidos (ROUNCE, 1949). Na África do Sul e no Norte do Brasil a produção média é de 1.100 quilos por hectare, em cultivo intensivo e de 400 quilos por hectare quando em consorciação com milho e sorgo (EMBRAPA, 1976).

O elevado valor nutritivo de *Vigna unguiculata* (L) Walp., sua marcante adaptação a solos com baixa fertilidade, aliada à capacidade de resistência a estiagem prolongada, foram as principais causas que contribuíram para a implantação desta cultura na região Nordeste do Brasil, e em vários países de clima tropical, onde constitui a alimentação básica na dieta humana.

A despeito destas características, esta espécie responde muito bem à adubação, particularmente com referência ao fósforo e nitrogênio (SINGH e JAIN, 1966; SALAM *et alii*, 1968, SANCHEZ e MATA REYES, 1972; HALSEY, 1960 e GODFREY-SAMAGGREY, 1973).

Poucas pesquisas foram realizadas até muito recentemente, e em especial com referência ao uso de fertilizantes, nutrição e fixação do nitrogênio. Portanto, estudos mais aprofundados no que diz respeito a resposta a nutrientes, por diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. devem ser encarados como de relevante importância, considerando-se também a economia do nitrogênio que pode advir da fixação por bactérias do gênero *Rhizobium*.

Com relação a especificidade hospedeira *Rhizobium* - *Vigna unguiculata* (L) Walp., não consta na literatura nenhum trabalho. Deve ser salientado, também, que nada se sabe a respeito da competição entre as estirpes recomendadas para a inoculação e as existentes no solo, sendo este aspecto essencial com vistas ao estabelecimento de uma simbiose realmente eficiente.

O papel do nitrogênio no crescimento das plantas, na formação e desenvolvimento dos nódulos é por demais conhecido (PATE e DART, 1961; DART e WILDON, 1970), entretanto mesmo nas espécies mais bem estudadas, como a soja (*Glycine max* (L) Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L), os resultados são discordantes.

De acordo com o conceito clássico, é conhecido que o nitrogênio prejudica a formação de nódulos, e portanto interfere na fixação do nitrogênio atmosférico. Todavia estudos posteriores mostram que a nodulação é favorecida pela adição de pequenas doses de nitrogênio ao meio (DART e WILDON, 1970). ALLOS e BARTHOLOMEW (1959) estimaram que só metade a um terço do nitrogênio requerido pela soja (*Glycine max* (L) Merrill) e trevo (*Trifolium repens* L) foi obtida através da fixação simbiótica do dinitrogênio, e que a ausência de fertilizantes e de nitrogênio disponível reduziram o número de nódulos em pelo menos 50%.

Aspectos da assimilação e distribuição do nitrogênio, atividade da reductase do nitrato, dinâmica das diversas

formas de nitrogênio no metabolismo de *Vigna unguiculata* (L) Walp., não foram ainda estudados.

Com o fósforo são inúmeros os trabalhos demonstrando a sua grande importância para as plantas e para a realização de uma simbiose eficiente. Estes estudos tornam-se ainda de maior relevância nas condições tropicais, onde a ocorrência de óxidos hidratados de ferro e alumínio e a elevada acidez proporcionam maior retenção do fósforo. Embora este tenha sido um dos nutrientes mais bem estudados em *Vigna unguiculata* (L) Walp., o problema continua em aberto, principalmente no que concerne aos efeitos na nutrição e adubação da cultura.

Com relação ao enxofre, embora conhecida sua importância, sabe-se apenas que na falta do elemento, a relação N solúvel: N protéico aumenta, diminuindo a nodulação e o teor de aminoácidos contendo enxofre, não tendo sido constatado, ainda, se este efeito é direto ou indireto.

Com o uso dos isótopos radioativos e estáveis na agricultura, os estudos de adubação e nutrição vêm tomando novos impulsos, especialmente no caso dos nutrientes nitrogênio, fósforo e enxofre. Assim, tem sido possível estudar, com maior precisão, o comportamento dos elementos adicionados aos solos, o aproveitamento e distribuição destes nos diversos órgãos da planta e a interação entre estes.

Também o uso do método da redução do acetileno, como meio de avaliação do nitrogênio fixado, vem possibilitan-

do novos avanços nos estudos envolvendo a influência dos nutrientes no processo da fixação biológica do dinitrogênio.

No presente trabalho procuramos estudar a eficiência de algumas estirpes de *Rhizobium*, de diferentes origens, em inoculação cruzada com cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., os efeitos dos macronutrientes nitrogênio, fósforo e enxofre, na fixação do dinitrogênio, na produção de massa verde e seca, e no estado nutricional. Procuramos também determinar a absorção do nitrogênio, fósforo e enxofre, sua distribuição nas diversas partes da planta e alguns aspēctos ligados ao metabolismo do nitrogênio nesta leguminosa. Finalmente, foram estudados os efeitos da interação do fósforo e enxofre.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Nodulação e Fixação do N_2 por *Vigna unguiculata* (L)Walp.

3.1.1. Inoculação cruzada

FRED, BALDWIN e McCoy (1932) propuseram a organização das leguminosas em 20 grupos de inoculação cruzada, os quais foram depois reduzidos, e atualmente existem apenas seis (ALLEN e ALLEN, 1974; ALLEN e BALDWIN, 1954).

Como a grande maioria das leguminosas tropicais, *Vigna unguiculata* (L) Walp. é incluída no chamado grupo de inoculação cruzada cowpea, que nodula com a espécie *Rhizobium* sp. Este é um grupo bastante promíscuo, e como sugerido por WILSON (1939), NORRIS (1956) e HABISH e KHAIRI (1968), apresenta várias inconsistências. Neste grupo foram descritos numerosos casos de inoculação cruzada não recíproca, verificando-se que estirpes isoladas de sesbania nodularam cowpea e soja, enquanto

nenhuma estirpe isolada de cowpea ou soja formaram nódulos nesta planta (JOHNSON e ALLEN, 1952). BOWEN (1959) mostrou maior especificidade de centrosema com relação a várias leguminosas tropicais, sendo difícil seu estabelecimento sem inoculação com estirpes homólogas. HABISH e KHAIRI (1968) observaram que *Arachis hypogaea* (L) e *Acácia* sp também devem possuir estirpes próprias. GUZMAN e DOBEREINER (1969) e DOBEREINER (1970) comentam que algumas variedades de *Stylosanthes* também foram unilateralmente específicas. GALLI (1959) e ISHIZAWA (1972) observaram que no grupo cowpea algumas espécies ocupam posição especial formando grupos de inoculação cruzada aos quais não pertence nenhuma das demais espécies, como é o caso de *Leucena glauca* Benth e *Cratylia floribunda* Benth.

Assim, algumas leguminosas tropicais mostram-se altamente específicas, formando nódulos com estirpes homólogas, outras mostram inoculação unilateral, e a maioria apresenta-se bastante promíscua formando nódulos eficientes com estirpes isoladas das demais espécies.

Com respeito à especificidade hospedeira *Rhizobium* - *Vigna unguiculata* (L) Walp. não há conclusões definitivas, quando se considera apenas a formação de nódulos. Tem-se uma melhor visualização do quadro da relação simbiótica quando é observada a proposição de WILSON (1939) que considera a diferenciação entre plantas sem nodulação, com nodulação ineficiente e com nodulação eficiente; ou melhor ainda, a avaliação diferenciada em excelente nodulação (75% a 100% das plantas apre

sentam nódulos), boa nodulação (50% a 75% das plantas estão no duladas) e nodulação fraca (cerca de 50% das plantas com nódulos).

3.1.2. Competição com estirpes nativas do solo

A grande maioria das leguminosas tropicais nodu lam facilmente com estirpes nativas, desde que ocorram condições satisfatórias, e mesmo quando inoculadas, apenas uma in significante proporção dos nódulos formados são provenientes do inoculante (DOBEREINER, 1974). A existência de um pequeno número de estirpes que produzem nódulos pretos, e que são res tritas a algumas espécies de leguminosas tropicais, é uma certa compensação, pois representa diretamente uma solução para o estudo da competição entre estirpes, um dos problemas mais im portantes para o sucesso da inoculação (STAMFORD *et alii*, 1968).

Desta forma sabe-se que as estirpes usuais não possuem grande capacidade de competição com as nativas do solo, e que estas últimas não possuem elevada eficácia, interferindo, portanto, no estabelecimento de uma simbiose eficiente (NICOL e THORNTON, 1941; MARSHALL, 1956; VINCENT, 1962).

Trabalhos realizados por CLOONAN (1966) e CLOONAN e VINCENT (1967) dão conta de que com a inoculação usual não são normalmente obtidos bons resultados com algumas leguminosas tropicais como *Dolichos lablab* L e *Vigna unguiculata* (L) Walp., sendo necessário realizar-se estudos para procurar obter

meios que permitam melhores condições para a participação mais decisiva das estirpes do inoculante. Estes pesquisadores usando a estirpe CB-756, que tem a capacidade de produzir nódulos pretos em *Dolichos lablab* L e *Vigna unguiculata* (L) Walp. mostraram que o estabelecimento destas leguminosas poderá ser conseguido através da inoculação com grande número de bactérias viáveis, até 1.000 vezes superior à inoculação normal.

Parece que no solo há pouca oportunidade para a multiplicação de bactéria inoculada, e desta forma com maior número de células viáveis haverá maior probabilidade de o número de células não diminuir demasiadamente em períodos críticos.

Talvez o grau de incompatibilidade *Rhizobium* - hospedeiro seja importante neste caso, sendo necessário a realização de estudos para determinar se a bactéria ou o hospedeiro, ou a combinação de ambos é que controla o problema.

3.1.3. Efeitos da inoculação das sementes

Nos solos das regiões tropicais, geralmente pobres em matéria orgânica, o nitrogênio é um dos principais fatores limitantes da produção, observando-se que a adição deste nutriente na forma mineral estimula o crescimento das plantas.

A inoculação das sementes é uma técnica bastante usada nos Países de clima temperado, especialmente para soja,

trevo e alfafa, sendo muito recentes os estudos sobre a inoculação e a extensão da técnica nos Países de clima tropical.

Trabalhando em solos da Austrália, CROFTS e JENKINS (1954) observaram que, de três estirpes usadas, apenas uma promoveu nodulação em *Vigna unguiculata* (L) Walp., e que sem o uso do inoculante não ocorria formação de nódulos efetivos por *Rhizobium* nativo. Por outro lado EZEDINMA (1964), isolando estirpes de *Rhizobium* nativo de 13 solos da Nigéria, constatou que todas induziram bom desenvolvimento destas leguminosas.

ROTIMI (1972), trabalhando na Nigéria, verificou formação de nódulos por estirpes nativas, mas estas não foram muito eficientes, tendo a inoculação estimulado a nodulação e aumentado o teor de nitrogênio nas plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por QUILAPIO (1962) trabalhando nas Filipinas com várias leguminosas para adubação verde.

DÉNARIE *et alii* (1968) cultivando *Vigna unguiculata* (L) Walp. como adubo verde para a cultura do arroz, em solo com baixo teor em húmus, verificou que a inoculação aumentou o número de bactérias promovendo uma boa nodulação natural. O autor comentou que os aumentos de produção obtidos com inoculação foram sempre iguais ou superior à aplicação de 60kg de N/ha, e considerou indispensável a inoculação das sementes nos solos usados.

Em trabalho realizando extração de proteína das

folhas de *Vigna unguiculata* (L) Walp. DESHMUCK e JOSHI (1973) verificaram que a inoculação com *Rhizobium* aumentou significativamente o teor de proteína bruta e o peso de matéria seca mas não afetou a quantidade total de proteína extraída das folhas.

Nos solos deficientes em estirpes específicas para determinada planta, ocorre pequena formação de nódulos efetivos. Neste caso a multiplicação da bactéria é mais lenta e as possibilidades de obter-se uma nodulação eficaz, nos anos seguintes, é mais remota. Realizando estudos neste sentido, HERRIDGE e ROUGLEY (1974) usaram quatro formas de inoculação das sementes, inoculadas com a estirpe CB-756, para verificar a sobrevivência da bactéria e concluíram que não houve efeito dos tratamentos.

Procurando avaliar a fixação do dinitrogênio pelas bactérias que vivem associadas às raízes de *Canavalia ensiformes* L e *Vigna unguiculata* (L) Walp., GARGANTINI e WUTKE (1960) realizaram um estudo em vasos do tipo MITSCHERLICH e calcularam que os máximos de fixação obtidos foram 73,0kg de N/ha para *Vigna unguiculata* (L) Walp. e 48,5kg de N/ha para *Canavalia ensiformes* L. WETSELAAR (1967) estudando quatro leguminosas tropicais encontrou que *Vigna unguiculata* (L) Walp. adicionou ao sistema solo planta 220kg de N/ha, sendo a mais promissora para adubação verde.

3.1.4. Efeitos dos nutrientes

De uma maneira geral, numerosos trabalhos investigando o efeito do nitrogênio na nodulação e fixação do dinitrogênio pelas leguminosas demonstraram que a fixação máxima era obtida quando o meio era deficiente em nitrogênio mineral (FRED, BALDWIN e McCOY, 1932; WILSON, 1940; NUTMAN, 1956).

Mais tarde observou-se que níveis elevados de nitrogênio combinado podem reduzir o número e o crescimento dos nódulos e a fixação do dinitrogênio, sendo este comportamento variável com as espécies, tempo de aplicação, quantidades e formas de nitrogênio adicionado ao meio (THORNTON, 1956). Em seguida surgiram vários trabalhos demonstrando que pequenas doses de nitrogênio inorgânico estimulavam a simbiose, e ainda que vários fatores como modo de aplicação, pH do meio, temperatura e outros fatores climáticos podem também influenciar a assimilação de nitrogênio mineral e molecular pelas leguminosas (Mc CONELL e BOND, 1957; PATE e DART, 1961; EZEDINMA, 1964; DART e WILDON, 1970).

A resposta de *Vigna unguiculata* (L) Walp. a adubação nitrogenada não é ainda bem conhecida, e a influência desta sobre a fixação do dinitrogênio é tema bastante polêmico.

PATE e DART (1961) e DART e WILDON (1970) observaram que pequenas doses de nitrogênio mineral favoreciam a fixação do dinitrogênio e que ocorria resposta com diferença bastante acentuada entre as estirpes. Por outro lado, EZEDINMA (1964) verificou que na forma de nitrato, doses de nitrogênio superiores a 100ppm aumentaram o número e peso de nódulos e nitrogênio fixado.

Com relação ao fósforo os trabalhos realizados por ISWARAN *et alii* (1969) mostraram que a produção e fixação de dinitrogênio nas leguminosas *Vigna unguiculata* (L) Walp., *Phaseolus aureus* L e *Phaseolus mungo* L aumentaram com a adição de fósforo ao meio. Entretanto considerou-se que este efeito pode estar relacionado com o aumento da absorção de íons fosfato do solo, devido ao maior crescimento das plantas inoculadas. Resultados semelhantes foram obtidos por SINGH *et alii* (1968) trabalhando com seis leguminosas tropicais, inclusive *Vigna unguiculata* (L) Walp., e por CHUNDAWAT (1972) em *Vigna unguiculata* (L) Walp. e *Phaseolus vulgaris* L., consorciados com sorgo.

IVANOFF (1948) realizou um trabalho procurando avaliar o efeito do enxofre em *Vigna unguiculata* (L) Walp. em solos calcários e observou que ocorriam nódulos maiores e em número mais elevado quando era adicionado enxofre. A nodulação e a fixação do dinitrogênio variava de cultivo para cultivo e era correlacionada com a intensidade da cor verde das folhas, com a posição, número e peso dos nódulos. Neste trabalho não foi possível constatar se o enxofre favoreceu a nodulação por

efeito direto sobre a bactéria, ou pelo melhor desenvolvimento das plantas, induzido pela liberação de micronutrientes através do abaixamento do pH do solo. PANDEY (1972) verificou o efeito da adição de enxofre na formação de nódulos em *Vigna unguiculata* (L) Walp., amendoim e ervilha, e constatou que a aplicação de 11,2 ou 28kg de S/ha aumentou a nodulação nas três espécies.

3.2. Estado nutricional

Há necessidade de informações básicas a respeito dos efeitos da adição de nutrientes nos requerimentos nutricionais, atividade enzimática e distribuição iônica nas diversas partes constituintes de *Vigna unguiculata* (L) Walp., tendo em vista que as poucas existentes na literatura são extremamente limitadas.

As relações de crescimento dos vegetais foram estudadas por vários pesquisadores, e particularmente para *Vigna unguiculata* (L) Walp., por BLACKMAN e BLACK (1959), CHARREAU e VIDAL (1962), DART e MERCER (1965), RAO *et alii* (1972) e SCHOCH CANDELARIO (1974).

Pesquisando o crescimento e absorção relativa dos macronutrientes em diferentes estádios de desenvolvimento de quatro variedades de *Vigna unguiculata* (L) Walp., JAQUINOT (1967), observou que a absorção de NPK foi bem elevada. Houve indicação de deficiência geral de enxofre e os teores mais al-

tos de cálcio e magnésio foram obtidos nas variedades que apresentaram maior produção de sementes.

Segundo este autor o nitrogênio foi absorvido durante toda a fase vegetativa, distribuindo-se bem, sobretudo nas folhas, e no final do ciclo localizou-se nos frutos. O fósforo foi absorvido em quantidade relativamente grandes, principalmente na fase final do ciclo vegetativo. Nesta fase os maiores teores foram encontrados nos caules e nas folhas jovens, seguindo depois para os frutos. As variedades produtivas apresentaram maior teor de fósforo nas sementes. *Vigna unguiculata* (L) Walp. absorveu bastante enxofre, em geral ocorrendo deficiência ao nível de 0,4% de S nas sementes, com as variedades mais produtivas apresentando maior teor deste nutriente.

A nutrição nitrogenada ainda que seja satisfatória através de uma fixação do dinitrogênio eficiente, parece estar relacionada com a presença de fósforo. A relação do nitrogênio com o enxofre não está bem estudada nesta leguminosa.

De acordo com REDER (1966), o teor de nutrientes em *Vigna unguiculata* (L) Walp. foi mais influenciado pelas localidades onde foram instalados os experimentos do que pela fertilização. SINGH e JAIN (1968), na Índia, verificando o efeito do fósforo na absorção de nitrogênio e fósforo na cultivar "Russian Giant", mostraram que os níveis de nitrogênio e fósforo nas folhas aumentaram consideravelmente com o incremento dos níveis de P_2O_5 do solo.

STEWART e REED (1969) também relataram que o nitrogênio não influenciou o teor de nitrogênio na planta mas aumentou o teor de fósforo com a adubação fosfatada.

OMUETI e OYENUGA (1970) trabalhando com amendoim e *Vigna unguiculata* (L) Walp., mostraram que doses correspondentes a 22 e 44kg de P_2O_5 /ha não afetaram a produção destas culturas. A proteína bruta em amendoim, na dose de 44kg de P_2O_5 /ha sofreu aumento de 35% em relação à testemunha, enquanto que *Vigna unguiculata* apenas mostrou um aumento de 5%.

3.3. Produção, crescimento e absorção de nutrientes

3.3.1. Efeitos da adubação básica - NPK

Vigna unguiculata (L) Walp. é uma leguminosa que tem marcante adaptação a solos de baixa fertilidade, mas ao mesmo tempo apresenta uma grande capacidade de reagir bem à adição de fertilizantes, em particular para a aplicação de fósforo.

O uso de fertilizantes em *Vigna unguiculata* (L) Walp. não está ainda bem definido, sendo citados na literatura trabalhos mostrando efeitos contrastantes com relação a fontes e níveis de fertilizantes.

Trabalhando na Hungria, em experimentos com vasos, com diferentes fontes de fertilizantes, KRAMER *et alii*

(1968) mostraram que nitrato de amônio misturado com superfosfato e cloreto de potássio deram resultados semelhantes na produção de matéria seca e concentrações de nitrogênio e fósforo. Por outro lado, MALOTH e PRASAD (1976), em estudo de adubação com NPK, comparando o fósforo cedido por rochas fosfatadas e pelo superfosfato, relataram que *Vigna unguiculata* (L) Walp. respondeu bem à adubação aumentando a produção de massa verde e absorção de fósforo. A aplicação de nitrogênio como dose de arranque (20kg de N/ha) aumentou a produção total de massa verde em 3,3 ton/ha, no primeiro corte, mas não teve efeito no segundo corte. Neste trabalho não obtiveram correlações entre nitrogênio e fósforo, em ambos os cortes.

STEWART e REED (1969) observaram um aumento na produção de vagens nas cultivares "Black Eye" e "Princess Anne", com a aplicação de 30kg de N/ha e de 200kg de superfosfato simples/ha.

KURDIKERI *et alii* (1973) obtiveram aumento de produção de 778kg/ha, com a adição de 44kg de P_2O_5 /ha e 11kg de N/ha. Em Sierra Leone GODFREY-SAM-AGGREY (1973) também obteve resposta à adubação com NP.

DESHMUKH *et alii* analisando os efeitos das espécies, variedades, estação do ano, fertilizantes e frequência de cortes em várias culturas, sobre a produção de proteína das folhas, observaram que esta leguminosa produziu aumento de matéria seca e proteína devido à fertilização com NPK, em *Vigna*

unguiculata (L) Walp., enquanto muitas outras culturas não reagiram à adição de fertilizantes.

3.3.2. Efeitos do nitrogênio

É bastante difundido que em condições de campo a inoculação com *Rhizobium* é raramente necessária, tendo em vista que as estirpes nativas do solo são capazes de promover nodulação efetiva nas leguminosas tropicais. Entretanto é necessário a realização de pesquisas sobre a simbiose *Rhizobium-Vigna unguiculata* (L) Walp. pois as estirpes nativas podem não ser muito eficientes na fixação do dinitrogênio (SUMMERFIELD *et alii*, 1974). Porém, atualmente pesquisas tendem a serem conduzidas no sentido de verificar a resposta de *Vigna unguiculata* (L) Walp. à adubação nitrogenada, ao invés de estudar os problemas de inoculação.

PATTERSON e BLACKHURST (1958) relataram que com dose equivalente a 40kg de N/hectare, as três cultivares usadas aumentaram significativamente a produção. HALSEY (1960) obteve aumento significativo com níveis de nitrogênio equivalente a 18 e 36kg de N/hectare. MALOTH e PRASAD (1976) verificaram que a aplicação de nitrogênio como dose de arranque aumentou a produção total de massa verde em 33kg/hectare, enquanto BRANTLEY (1964) adicionando ao solo doses de 100 a 300ppm de nitrogênio, constatou que os maiores níveis aumentaram o peso das plantas e o teor de nitrogênio total, com resposta di-

ferente entre as cultivares estudadas.

PAIVA e ALBUQUERQUE (1970) e PAIVA *et alii* (1971) verificaram que a aplicação de nitrogênio influenciou a produção com aumentos variando de 10 a 15%. Por outro lado, CAMPOS e DAMASCENO (1973) não observaram resposta à adubação nitrogenada com aplicação de até 80kg de N/ha. RAM *et alii* (1970), na Índia, chegaram a conclusões semelhantes, tanto na produção como no crescimento da planta.

GODFREY-SAM-AGGREY (1973 e 1975), usando cinco doses de nitrogênio variando de 0 a 330kg de N/ha, verificaram que a aplicação de 165kg de N/ha aumentou significativamente o peso da matéria seca dos grãos, casca e vagens na cultivar "Black Eye" não inoculada.

SINGH *et alii* (1971) em experimento com sorgo consorciado com *Vigna unguiculata* (L) Walp., e outras leguminosas, verificaram que a produção do sorgo isolado foi maior que em consorciação, embora o teor de proteína tivesse dado melhor resultado com esta leguminosa. A aplicação de 24kg de N/ha foi a melhor dose, tanto para a produção de matéria seca como de proteína.

3.3.3. Efeitos do fósforo

Para o fósforo a dose recomendada em *Vigna unguiculata* (L) Walp. nos Estados Unidos situa-se entre 100 e 200kg de P_2O_5 /ha (SELLSCHOP, 1962). Em outros países a aplicação de

superfosfato aumentou significativamente a produção, como é o caso do Egito (SALAM *et alii*, 1968); Índia (RAM *et alii*, 1970); Venezuela (MATA REYES e SANCHEZ, 1970 e 1972; SANCHEZ e MATA REYES, 1972) e Guiana Inglesa (CHESNEY, 1974).

SINGH e JAIN (1966) estudaram o efeito do fósforo e molibdênio, no crescimento e outras características da cultivas "Russian Giant" cultivada na Índia, e constataram aumento no número de ramos, peso dos ramos e nódulos, sem afetar as demais características. CHESNEY (1974) verificou que em solos de savana o fósforo era fator limitante da produção de *Vigna unguiculata* (L) Walp.

Estudos da aplicação de fósforo em *Vigna unguiculata* (L) Walp., para uso como forragem ou para consorciação, apresentaram resultados divergentes. Em consorciação com trigo, MAHAJAM e KHANNA (1968) estudaram o efeito residual com adição de níveis crescentes de fósforo, e concluíram que a produção desta leguminosa não foi afetada pela aplicação de fósforo mas a produção de trigo foi maior quando consorciado. Por outro lado, GARG *et alii* (1970), também estudando trigo consorciado e em cultivo isolado, verificaram que com aplicação superior a 37kg de P_2O_5 /hectare a produção de forragem aumentou significativamente bem como a produção do trigo plantado isoladamente.

RAM *et alii* (1970) observaram o crescimento de *Vigna unguiculata* (L) Walp. cultivada para forragem, em relação ao número de cortes e níveis de fósforo e nitrogênio, concluindo que com três cortes foram obtidos os melhores resultados. A aplicação de dose equivalente a 80kg de P_2O_5 /ha aumentou a produção com retornos econômicos. Resultados comparativos foram obtidos por MALOTH e PRASAD (1976).

3.4.3. Efeitos do enxofre

Depois do trabalho de HILDER (1953), demonstrando a grande influência da adubação com enxofre no crescimento do trevo, na Nova Inglaterra, as pesquisas com este nutriente cresceram de importância, especialmente em pastagens e culturas cerealíferas.

Geralmente esta leguminosa necessita elevadas quantidades de enxofre, e por esta razão, não raramente apresenta sintomas de deficiência. O efeito da adubação com enxofre em relação à importância deste elemento para a síntese de certos aminoácidos foi estudada por EVANS *et alii* (1977), usando 7 níveis deste nutriente. Os autores constataram que o teor de enxofre na planta aumentou com os níveis crescentes de adubação acima de 5ppm para a cultivar "TVu 76" e acima de 1,8ppm para a cultivar "Sitao Pole". Níveis de 7 e 2ppm na solução do solo foram, respectivamente, necessários para a produção máxima obtida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Experimento 1

4.1.1. Esquema Experimental

O delineamento experimental usado foi um fatorial 4x5, em blocos ao acaso, com 3 repetições, utilizando quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. e cinco tratamentos com estirpes de *Rhizobium* sp (grupo cowpea) incluindo o controle sem inoculação.

As estirpes C-101 e C-102 foram isoladas de *Centrosema pubescens* Benth., pela Dra. Johanna Dobereiner em 1965, e possuem a característica especial de produzir nódulos pretos (figura 1) em algumas leguminosas forrageiras tropicais (STAMFORD *et alii*, 1968). A estirpe 5.000, enviada pelo Dr. Eaglesham da Estação Experimental de Rothamsted, Inglaterra, é uma estirpe homóloga, que forma nódulos de coloração normal e é recomendada para inoculação de *Vigna unguiculata* (L) Walp. na região de origem.

As cultivares usadas foram "Seridô", "Sempre Verde", "Garôto" e "Carirí", obtidas na Estação Experimental do Curado (EMBRAPA-PE).

4.1.2. Instalação e condução do experimento

O trabalho foi conduzido em vasos de LEONARD (1943), com areia lavada e esterilizada, recebendo a solução nutritiva de NORRIS (1964), modificada por DOBEREINER e descrita em detalhes por STAMFORD (1971).

Foram adicionados 250ml da solução nutritiva na parte inferior de cada vaso (figura 2) e 50ml na parte superior, por ocasião do plantio. Duas semanas após a primeira aplicação foram colocados mais 200ml da solução nutritiva, e daí em diante foi adicionado água destilada sempre que necessário.

Antes do plantio as sementes foram esterilizadas, primeiro com álcool a 95% e logo após com HgCl_2 (1:500) e em seguida lavadas cinco vezes com água fervida.

Uma e duas semanas após o plantio foram feitos dois desbastes, deixando primeiro 5 plantas e finalmente 2 plantas, por vaso.

O inoculante foi preparado usando-se cultura líquida com o meio específico para *Rhizobium* (meio 79) mantido por 7 dias em agitador rotativo, com rotação média de 100 rotações por minuto. A inoculação foi realizada com a adição de

1ml da cultura líquida, por planta, uma semana após a germinação.

4.1.3. Colheita do experimento

As plantas foram colhidas 60 dias após o plantio, separando-se a parte aérea das raízes mais nódulos. De cada vaso foi colhida uma amostra de raízes mais nódulos, acondicionadas em frasco de vidro para estudo da fixação do dinitrogênio, através do processo da redução do acetileno.

Posteriormente, os nódulos foram separados das raízes e contados. A seguir, raízes e nódulos foram cuidadosamente lavados em água corrente, água destilada e água deionizada. Os nódulos, acondicionados em vidros e as raízes e a parte aérea em sacos de papel, foram colocados em estufa para secagem a 65°C. Após a secagem foi feita a pesagem da parte aérea, raízes, nódulos pretos e normais.

4.1.4. Análise química e estudo da fixação do N₂

Para a análise química, a parte aérea e as raízes foram previamente moídas em moinho tipo Willey, usando peneira de 20 malhas. A determinação do nitrogênio foi realizada seguindo o método semimicro Kjeldhal, como descrito por BREMNER (1965).

O método usado para o estudo da fixação do dinitrogênio foi o da redução do acetileno, que se baseia na capa-

cidade do sistema enzimático nitrogenase de reduzir o acetileno a etileno (HARDY *et alii*, 1971), descrito detalhadamente por SUHET (1976).

4.2. Experimento 2

4.2.1. Esquema experimental

Os tratamentos consistiram de dois níveis de nitrogênio (1 e 2), duas fontes de nitrogênio (amoniacal e nítrico-amoniacal) e dois tratamentos testemunha (inoculado e sem inoculação). Foram escolhidas como fontes de nitrogênio os fertilizantes sulfato de amônio e nitrato de amônio, marcados com ¹⁵N.

Foi usado o esquema experimental em blocos ao acaso, com 3 repetições. Foram utilizados dois solos, duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. e os seis tratamentos apresentados na tabela 1.

4.2.2. Solos utilizados

Foram utilizados dois solos classificados como Podzol Hidromórfico (HP) e Podzólico Vermelho Amarelo (PVA), segundo o levantamento da Divisão de Pedologia do Ministério da Agricultura (1972). As amostras dos solos foram coletadas nos municípios de Recife (PE) e Moreno (PE), respectivamente, sen-

do os dois solos representativos da zona da mata do Estado de Pernambuco.

Os resultados das análises dos dois solos estão apresentados na tabela 2. As determinações químicas foram feitas segundo os métodos descritos por VETTORI (1969), e a análise mecânica pelo método da pipeta (KILMER e ALEXANDER, 1949).

4.2.3. Cultivares utilizadas

As cultivares utilizadas foram "Garôto" e "Sempre Verde", cujas sementes foram obtidas de um experimento para seleção de cultivares, realizado no campo experimental "Sertãozinho", do LSG-Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes da ESALQ, USP.

4.2.4. Instalação do experimento

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação.

Foram utilizados vasos de barro, com capacidade para 5 litros, pintados internamente com neutrol, visando a impermeabilização a fim de evitar a absorção de nutrientes porventura presentes no barro dos vasos. Antes da adição do solo foi colocada uma tela de nylon fina e um litro de sílica, lavada várias vezes com água corrente e duas vezes com água deionizada.

Foi adicionada sílica também na parte superior dos vasos, duas semanas após a germinação, com a finalidade de prevenir a ocorrência de algas.

Os solos foram destorroados, passados em peneira de 5mm, homogeneizados e colocados 4kg por vaso, da maneira relatada na distribuição das soluções radioativas.

Apesar dos dois solos apresentarem necessidade de calagem, pela recomendação da análise de fertilidade, esta não foi realizada a fim de não promover alteração da disponibilidade dos micronutrientes dos solos.

Para facilitar a instalação do experimento foram preparadas, separadamente, soluções radioativas contendo 100ppm de fósforo e 20ppm de enxofre, usando-se como carregador KH_2PO_4 e K_2SO_4 , respectivamente.

As soluções radioativas foram preparadas de forma a proporcionar, aproximadamente, $40\mu\text{Ci}/100\text{ml}$ para ^{32}P , e $30\mu\text{Ci}/100\text{ml}$ para ^{35}S , adicionando-se por vaso 100ml de cada solução. A distribuição das soluções radioativas foi feita colocando 50ml em metade da quantidade do solo (2kg) e mais 50ml na segunda camada (1,5kg), com a finalidade de promover uma melhor homogeneização. O restante do solo (0,5kg) foi usado para isolar a solução radioativa e cobrir as sementes, após o plantio. O preparo e aplicação do material radioativo foi realizado tomando-se as medidas normais de proteção radiobiológica, e o controle do nível de exposição feito com um monitor Philips

PW 4012/01 com detector Geiger Muller 18505.

As sementes foram inoculadas com a estirpe C-102 deixando-se em contato por uma hora. Logo após foi feita a semeadura colocando-se por vaso, seis sementes, cobertas por uma fina camada de solo.

O controle de umidade do solo foi realizado com o uso de drenos, constituídos de mangueira de plástico, colocados na parte inferior dos vasos, e, introduzidos em garrafas escuras que recebiam a solução drenada (Fig. 3).

Na Tabela 3 encontra-se a relação dos nutrientes que constituíram a adubação básica e as respectivas fontes e doses.

Com a finalidade de observar a influência da adubação nitrogenada na absorção do ^{32}P e ^{35}S na planta proveniente do fertilizante, estes dois últimos foram adicionados, na adubação básica, na forma de soluções radioativas.

4.2.5. Condução do experimento

Durante todo o período experimental, diariamente, pela manhã e à tarde, a água contida nas garrafas era devolvida aos vasos, e a seguir adicionada água destilada até ocorrer a drenagem em cada vaso e atingir a marca de 250ml nas garrafas.

Duas semanas após a germinação foi realizado um desbaste, com corte na base do caule, deixando três plantas por vaso.

Foi desnecessário o emprego de defensivos tendo em vista que as plantas não apresentaram qualquer sintoma de doença ou ataque por insetos.

As folhas que foram amadurecendo foram sendo coletadas e acondicionadas em sacos de papel.

Devido ao crescimento excessivo, as plantas foram amarradas a suportes de madeira com a finalidade de evitar quebra ou engavinhamento.

4.2.6. Colheita do experimento

As plantas com 45 dias de idade, contados a partir da germinação, foram colhidas separando-se as amostras em folhas, caules e raízes. As raízes e os nódulos, sem serem destacados, foram separados do solo, acondicionados em frascos de vidro com capacidade para 500ml e encaminhados para a avaliação da fixação do nitrogênio. Posteriormente, os nódulos foram lavados, separados em pretos e normais e contado o número de nódulos por vaso. As raízes foram lavadas em água corrente, água destilada e água deionizada, e a seguir, juntamente com o restante do material foi levado para secagem em estufa a 65°C. Após a secagem, todo o material foi pesado, separadamente, e

as folhas, caules e raízes conduzidas para as análises químicas.

4.2.7. Análise química e bioquímica

Nos intervalos de 15, 30 e 45 dias após a germinação foram feitas coletas de material para determinação da atividade da reductase do nitrato, sendo analisadas 200mg de rodela de aproximadamente 0,5cm de diâmetro, retiradas dos folíolos das folhas localizadas no terço médio das cultivares "Garoto" e "Sempre Verde". Todas as determinações foram feitas em duas repetições, no tempo zero e uma hora após a incubação. A metodologia usada foi baseada em NEYRA e HAGEMAN (1974), cuja técnica foi esquematizada por NEYRA e VAN BERKUM (1977).

Por ocasião da colheita, ou seja aos 45 dias após a germinação, foi tomada uma amostra de 1g para análise do fracionamento do nitrogênio. O material foi colocado imediatamente em 30ml de etanol a 80%, com a finalidade de paralisar qualquer atividade enzimática.

Posteriormente procedeu-se à homogeneização a 2.000rpm, durante 5 minutos, em homogeneizador Virtiz. O material usado para extração alcoólica (1g) foi passado por 4 camadas de gaze e filtrado em papel de filtro. O filtrado foi centrifugado a 5.000rpm por 20 minutos, transferindo-se o sobrenadante para funil de separação, onde pigmentos e lipídios foram extraídos com clorofórmio. O material restante, com os com

postos solúveis dissolvidos, foi recolhido completando-se o volume para 50ml com etanol a 80%.

Os extratos obtidos foram mantidos em congelador até a ocasião das determinações, e o resíduo retido na gase foi levado para secagem a 65°C, para posterior determinação do N total do resíduo, chamado aqui de nitrogênio proteico.

Na solução sobrenadante foram determinados: amonia e nitrato seguindo a metodologia descrita por BREMNER e KEENEY (1965); nitrogênio amino, pelo método da ninidrina (MOORE e STEIN, 1963); e açúcares solúveis pelo método da antrona. O nitrogênio proteico foi determinado seguindo-se a metodologia de BREMNER (1965).

Para a análise química as folhas e os caules foram previamente moidos em moinho tipo Willey, usando peneira de 20 malhas, e as raízes cortadas com tesoura.

Os métodos utilizados foram: para nitrogênio o semimicro Kjeldhal, descrito por BREMNER (1965); para o fósforo, o método colorimétrico do vanadomolibdato de amonio; para potássio, espectrofotometria de emissão atômica; para cálcio e magnésio, espectrofotometria de absorção atômica e para o enxofre, turbidimetria. Com exceção do enxofre, determinado pelo processo proposto por KRUG *et alii* (1971), foram seguidos os procedimentos descritos por SARRUGE e HAAG (1974).

4.2.8. Detecção das radiações

A separação das radiações beta emitidas pelos radionuclídeos ^{32}P e ^{35}S torna-se possível em amostras duplamente marcadas, em virtude das diferenças das energias e outras características apresentadas na tabela 4.

Com a finalidade de definir as condições de leitura foi realizada uma série de testes prévios, tendo em vista a necessidade de verificar a melhor proporção da amostra e solução cintiladora, e discriminação dos dois canais (A e B), com base nos espectros de energia do ^{32}P e ^{35}S .

Na detecção das radiações usou-se para o canal B discriminador superior e inferior entre 0 e 500, e para o canal A, entre 500 e 1000, de acordo com os testes prévios. Desta forma no canal A só foram detectadas as radiações provenientes do ^{32}P .

Por ocasião da instalação do experimento foram obtidos padrões, a partir das soluções usadas como fertilizantes, preparados em duplicata. Para detecção das radiações usou-se 0,5ml da solução a determinar as contagens, e 5ml da solução cintiladora "Insta gel", misturadas imediata e energeticamente. As radiações de fundo (BG) nos frascos de cintilação foram detectadas antes da adição das amostras e dos padrões, nos dois canais de contagem, no tempo de 10 minutos. Para a detecção das radiações foi usado o cintilador líquido Beckman LS 230 acoplado a computador Beckman.

A interferência do ^{32}P no canal A, para o cálculo

lo da leitura referente ao ^{35}S foi procedida da seguinte forma:

$$A = P$$

$$B = FP + S$$

$$S = 0$$

$$\frac{A}{B} = \frac{1}{F}$$

$$F = B/A \quad \text{onde:}$$

A = canal A (detecção das radiações do ^{32}P)

B = canal B (detecção das radiações do ^{35}S + fração F do ^{32}P)

F = fração de radiações do ^{32}P no canal B

As atividades específicas foram calculadas usando-se a expressão:

$$\text{Atividade específica} = \text{cpm/mg de P ou S}$$

Com o uso dos radioisótopos ^{32}P e ^{35}S foi possível determinar a percentagem de fósforo na planta proveniente do fertilizante e a percentagem de enxofre na planta proveniente do fertilizante. Estas determinações foram feitas para raízes, caules e folhas, usando-se as seguintes expressões:

$$\% \text{ PppF ou } \% \text{ SppF} = \frac{\text{atividade específica na folha}}{\text{atividade específica no fertilizante}} \times 100$$

4.2.9. Relação isotópica $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$

A determinação da relação isotópica $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ foi feita com o auxílio do espectrofotômetro de massa, Modelo CH-4 da Variant-Mat, usando o método de Dumas, modificado, de acordo com PROKSCH (1969). Foi usado o método de medida para análise isotópica com precisão da ordem de 1‰.

A percentagem de átomos de ^{15}N é determinada pela seguinte fórmula:

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

onde R é a relação das intensidades das correntes de iônios correspondentes às massas 28 e 29.

$$R = \frac{28 \left(\text{N}^{14} \text{N}^{14} \right)}{29 \left(\text{N}^{15} \text{N}^{14} \right)} \quad (2)$$

Para calcular a percentagem de nitrogênio na planta ou fração da planta proveniente do fertilizante (% NppF) aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ NppF} = \frac{\% \text{ de átomo de } ^{15}\text{N} \text{ em excesso na planta}}{\% \text{ de átomo de } ^{15}\text{N} \text{ em excesso no fertilizante}} \times 100$$

4.3. Experimento 3

4.3.1. Esquema experimental

Neste trabalho foi utilizado como esquema experimental um fatorial 4x2x2, em blocos ao acaso, com 3 repetições, tendo como planta teste *Vigna unguiculata* (L) Walp. (cv. Sempre Verde).

Os tratamentos que foram usados para o estudo do equilíbrio fósforo-enxofre e que possibilitaram a determinação do fósforo e enxofre na planta provenientes dos fertilizantes nos dois solos testados são apresentados na tabela 5. Estes tratamentos foram aplicados em forma de soluções de fósforo e enxofre, marcados com ^{32}P e ^{35}S , tendo como carregador, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ e K_2SO_4 , respectivamente.

Estes tratamentos foram aplicados nos dois solos usados, na ausência e na presença de calcário, na dose equivalente a 2.000kg/ha, na forma de CaCO_3 (P.A).

4.3.2. Solos utilizados

Foram utilizadas amostras compostas tiradas a 0,20m de profundidade, do solo Podzólico Vermelho Amarelo, descrito no caso anterior, e do Latossol Vermelho Amarelo Textura média (LVm), da Unidade Utinga, município de Paulista (PE). Estes dados foram caracterizados em 1972, pela equipe de Pedalogia do Ministério da Agricultura.

Os resultados das análises físicas, e químicas dos dois solos estão apresentados na tabela 2.

4.3.3. Instalação e condução do experimento

Foram utilizados vasos de barro com capacidade para 3 litros, pintados internamente com neutrol. Antes da adição do solo foi colocada uma tela fina de nylon e meio litro de sílica lavada. Os solos foram destorroados, passados em pe-neira de 5mm, homogeneizados e colocados nos vasos da mesma forma relatada no experimento 2. (4.2.3).

Foram preparadas soluções radioativas para cada nível de fósforo e enxofre a ser aplicado, mantendo-se constante a atividade total, e portanto, com atividade específica de-crescente à medida que foi aumentando o nível de fósforo e enxofre nas soluções a serem aplicadas como fertilizantes.

As soluções radioativas foram preparadas de forma a proporcionar, aproximadamente 40 μ Ci/100ml de solução, para ³²P, e 30 μ Ci/100ml de solução, para ³⁵S. Foram adicionados 100ml de cada uma das soluções, por vaso, distribuídas da mes-ma maneira relatada para o experimento 2 (4.2.3).

Foi aplicado 1,6g de CaCO₃, por vaso, correspon-dendo à adição de 2.000kg de calcário/ha, como recomendado pela análise dos dois solos. Os vasos foram deixados em incuba-ção por 15 dias, colocando-se água diariamente.

A adubação básica com nitrogênio foi feita no nível de 100ppm de N na forma de nitrato de amônio, com base nos resultados do experimento anterior. Para potássio foram adicionados 100ml de soluções preparadas com KCL, de forma a proporcionar, no final, 150ppm de K/vaso, devido a diferentes quantidades aplicadas como K_2SO_4 nos dois tratamentos com enxofre. O magnésio e os micronutrientes foram colocados através da adição de 2ml da solução cuja composição encontra-se na tabela 3.

A inoculação das sementes e o controle da umidade foram realizados da mesma maneira descrita no experimento 2 (4.2.3. e 4.2.4.).

O experimento foi conduzido de maneira idêntica à descrita para o experimento 2 (4.2.4.).

4.3.4. Colheita do experimento

Aos 45 dias, após a germinação, foram colhidas as partes aéreas das plantas de todos os vasos, e o material foi levado para secagem em estufa a $65^{\circ}C$.

4.3.5. Análise químicas e detecção das radiações

O material seco e pesado foi moído em moinho tipo Willey, usando peneira de 20 malhas. Foram obtidos extratos, usando 1g desse material, por digestão com ácido nítrico e perclórico. A seguir foram feitas as contagens das radiações

do ^{32}P e ^{35}S , utilizando-se 1ml do extrato e 5ml da solução cintiladora "Insta gel".

O cálculo das atividades específicas na planta e no fertilizante, e dos valores de fósforo e enxofre na planta provenientes do fertilizante, foi feito da mesma maneira descrita no experimento anterior.

As análises químicas do nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, e magnésio seguiram o mesmo procedimento relatado no experimento 2, e o enxofre foi determinado pelo método de JOHNSON e NISHITA (1952).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Nodulação e fixação do dinitrogênio

5.1.1. Inoculação cruzada

Pelos resultados das tabelas 6 e 7, o número e crescimento dos nódulos não apresentaram diferença significativa entre as cultivares usadas. O número de nódulos, e especialmente o peso total dos nódulos variou com as estirpes. Esta variação foi mais notante na cultivar "Garôto" inoculada com a estirpe homóloga 5.000. Esta estirpe foi mais eficaz nas cultivares "Seridô", "Sempre Verde", e "Garôto". Nesta última foram produzidos nódulos extremamente grandes quando em simbiose eficiente (fig. 4).

É interessante observar que os níveis mais elevados de fixação do dinitrogênio foram sempre obtidos com a estirpe 5.000, o que está de acordo com o sugerido por NORRIS

(1964), que considerou que a melhor forma de obtenção de estirpes de *Rhizobium* eficientes deve ser através da seleção entre isolamentos feitos na própria espécie, ou em espécies botanicamente relacionadas. Além disso, estas estirpes quando inoculadas em leguminosas tropicais, cultivadas nestas condições climáticas, são capazes de fixar maiores quantidades de dinitrogênio.

Observou-se certa especificidade hospedeira, tendo a cultivar "Cariri", mostrado características diferentes das demais (tabela 6). Esta cultivar fixou mais nitrogênio e apresentou maior número e peso de nódulos quando inoculada com a estirpe C-101. As cultivares "Seridô", "Garôto" e "Sempre Verde" mostraram comportamento semelhante na inoculação cruzada, apresentado-se com menor especificidade hospedeira.

Os dados apresentados na Tabela 7 indicaram que as estirpes pretas produziram nódulos pretos em todas as cultivares usadas e mostraram diferenças na especificidade hospedeira. A distinção de cor nos nódulos completamente desenvolvidos foi facilmente observada, mas nos nódulos jovens foi dificultada, razão pela qual estes foram incorporados aos nódulos de cor normal. As cultivares "Garôto" e "Seridô" formaram nódulos pretos apenas com a estirpe C-102, enquanto as demais foram mais promíscuas produzindo nódulos pretos com as duas estirpes com esta característica.

A correlação entre o nitrogênio total absorvido

e o peso dos nódulos demonstrou que as cultivares "Seridô" e "Carirí" fixaram maior quantidade de nitrogênio, em contraste com a cultivar "Garôto". Foram obtidas duas curvas distintas, sendo uma para as cultivares "Seridô", "Sempre Verde" e "Carirí", e outra para a cultivar "Garôto" que fixou menor quantidade de nitrogênio por unidade de tecido nodular (Fig. 5).

5.1.2. Competição de *Rhizobium*

Verificou-se, pelos dados da Tabela 7, que, de uma maneira geral, com relação à competição entre as estirpes aplicadas no inoculante, a formação dos nódulos e a fixação do nitrogênio não foram influenciadas pela mistura das estirpes. A estirpe homóloga 5.000 foi mais competitiva na formação dos nódulos nas cultivares "Seridô" e "Carirí". Na cultivar "Garôto" cerca de 40% dos nódulos foram formados pela estirpe C-102, e na cultivar "Sempre Verde" mais de 70% dos nódulos foram formados pelas estirpes C-101 e C-102, que produziram nódulos pretos.

Na competição entre as estirpes do inoculante e as nativas dos dois solos usados, os resultados apresentados na Tabela 10 mostraram que, nas cultivares "Garôto" e "Sempre Verde" a capacidade de competição das estirpes pretas é bastante reduzida. CLOONAN (1966) e CLOONAN e VINCENT (1967) estudando a competição com a estirpe CB-756, recomendada para *Vigna unguiculata* (L) Walp., na Austrália, também verificaram ser

muito difícil o estabelecimento desta leguminosa, e, mesmo com nível de fertilidade adequado, não obtiveram boa nodulação proveniente do inoculante. Outros pesquisadores, entre os quais JENKINS *et alii* (1954) e MEANS *et alii* (1961), usando a técnica da sorologia para identificação da estirpe inoculada, comprovaram a grande capacidade competitiva das estirpes de *Rhizobium* nativas do solo.

Pela Tabela 10 verificou-se que as estirpes do solo, de uma maneira geral, produziram menor número e peso de nódulos, como visto no tratamento testemunha sem inoculação.

Verificou-se também que quando houve formação de nódulos pretos as plantas apresentaram nitrogênio total e peso médio da matéria seca dos nódulos superior ao tratamento sem inoculação, nas duas cultivares, o que foi também observado por DOBEREINER (1970) em algumas leguminosas forrageiras tropicais.

As duas cultivares apresentaram pequena resposta à inoculação, nas condições experimentais usadas, com uma média de apenas 20% dos nódulos sendo formados pelas estirpes pretas. Neste sentido MARSHALL (1956) argumentou que a promiscuidade da maioria das leguminosas tropicais, formando nódulos com estirpes isoladas da maioria das leguminosas, pode ser considerada como uma desvantagem, devido à ocorrência no solo, de estirpes ineficazes, mas com grande capacidade competitiva.

Os resultados indicaram que para o sucesso da ino

culação de *Vigna unguiculata* (L) Walp., faz-se necessário obter estirpes mais competitivas com o *Rhizobium* nativo, e realizar pesquisas para estudar os fatores que interferem na sobrevivência da bactéria no solo, e bem como no aperfeiçoamento dos processos de inoculação.

5.1.3. Efeitos dos nutrientes

A nodulação das cultivares "Garoto" e "Sempre Verde" foi grandemente influenciada pela adição de nitrogênio (Fig. 6). A aplicação de dose equivalente a 100ppm de nitrogênio foi totalmente prejudicial à nodulação, tanto na forma de sulfato de amônio, como na de nitrato de amônio.

EZEDINMA (1964) observou que doses acima de 100ppm na forma de nitrato diminuíam o número e o peso dos nódulos, e concluiu que na Nigéria a boa nodulação em *Vigna unguiculata* (L) Walp. pode ser devido ao baixo teor de nitrogênio no solo, no período vegetativo.

DART e WILDON (1970) consideraram a potencialidade relativa de inibição da nodulação pelas fontes de nitrogênio na seguinte ordem: sulfato de amônio > nitrato de amônio > ureia > nitrato de potássio. Mais recentemente, LATIMORE *et alii* (1977) verificaram que a aplicação de nitrogênio na forma nítrica geralmente tem maior efeito inibidor na atividade da nitrogenase do que quando aplicado na forma amoniacal.

Por outro lado, pela Fig. 6 observou-se que a aplicação de nitrogênio como dose de arranque (25ppm) teve pouca influência sobre a nodulação e chegando mesmo a prejudicar a fixação do nitrogênio, medida em relação à atividade da nitrogenase. Neste caso, o nitrogênio aplicado como nitrato de amônio foi menos prejudicial do que o sulfato de amônio.

Observou-se correlação positiva entre a atividade da nitrogenase e o peso dos nódulos, nas duas cultivares e dois solos usados (Fig. 7), exceção feita à cultivar "Garoto" no solo Podzol Hidromórfico.

A cultivar "Sempre Verde" mostrou maior capacidade de nodulação apresentando, em média, duas vezes mais nódulos e peso de nódulos que a cultivar "Garoto". Com relação à fixação do nitrogênio avaliada através da atividade global da nitrogenase, a primeira fixou 20% mais nitrogênio que a última (Tabela 11) e o tratamento com inoculação sem aplicação de nitrogênio foi superior aos demais (Fig. 6).

Pela Tabela 12 verificou-se efeito altamente significativo das cultivares e dos tratamentos na nodulação e atividade da nitrogenase.

Verificou-se que o nitrogênio cedido pela simbiose não foi suficiente para o desenvolvimento normal das plantas, e que a presença de nitrogênio combinado, em dose pequena, não favoreceu a nodulação e fixação do nitrogênio. Estes

resultados foram concordantes com os obtidos por UEDA e OYAMA (1959).

No experimento variando as doses de fósforo e enxofre não ocorreu nodulação, tendo em vista que foi usada dose de nitrogênio correspondente a 100ppm como nitrato de amônio. Observou-se que mesmo nas doses de 400ppm de fósforo, e 120ppm de enxofre, estes nutrientes não influenciaram na formação de nódulos, na dose de nitrogênio aplicada.

5.2. Estado nutricional

5.2.1. Concentração e distribuição do N-P-S

Pela Tabela 13 verificou-se que a concentração do nitrogênio nas folhas cresceu à medida que aumentou a dose de nitrogênio, e independente da forma em que este nutriente foi aplicado. Entretanto é interessante observar que ao incrementar a dose de nitrogênio, a concentração do fósforo tendeu a diminuir, o que pode ser explicado como efeito da diluição, devido ao maior crescimento das plantas que receberam maior dose de nitrogênio.

Verificou-se uma melhor distribuição do nitrogênio na planta, com maior concentração nas folhas (Fig. 8). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por JAQUINOT (1967), que também não observou variação significativa entre as cultivares.

Como observado por JAQUINOT (1967) e por MAHAJAN e KHANNA (1968), a *Vigna unguiculata* (L) Walp. absorveu quantidades relativamente grandes de fósforo, que apareceu em maior concentração nas folhas e quase que em proporções iguais nos ramos e nas raízes (Fig. 9).

O enxofre foi absorvido em quantidades também relativamente grandes, e distribuiu-se nas mesmas proporções por todas as partes da planta (Fig. 10). Segundo GUPTA (1976) no estágio vegetativo as concentrações de enxofre variam de 0,16 a 0,40% de S, e JAQUINOT (1967) considerou que para *Vigna unguiculata* (L) Walp. concentrações em torno de 0,40% de S ainda indicaram deficiência neste nutriente. JAQUINOT (1967) considerou que este nutriente deve ser responsável pelo vigor da planta, tendo em vista que as concentrações são mais elevadas em todos os órgãos das cultivares mais produtivas. Observou-se também que a concentração de enxofre nas folhas tendeu a aumentar com o incremento das doses de nitrogênio aplicado como sulfato de amônio, mas não quando a fonte usada foi o nitrato de amônio (Tabela 13). Tendo em vista que foi adicionado sulfato de sódio nos vasos com os tratamentos que não receberam o sulfato de amônio, pareceu provável que a disponibilidade do enxofre foi prejudicada, quando este nutriente foi aplicado junto com nitrato de amônio.

O melhor desenvolvimento das plantas, no Podzólico Vermelho Amarelo foi relacionado com uma maior concentração de nitrogênio nas folhas, entretanto, inesperadamente, as con

centrações de fósforo e enxofre no Podzol Hidromórfico foram bem maiores. O fator responsável pela maior absorção de fósforo e enxofre neste solo não foi identificado no presente trabalho.

Os tratamentos mostraram efeito significativo mais pronunciado que o solo e as cultivares, quando consideradas as concentrações do nitrogênio. As concentrações do fósforo e enxofre foram significativamente influenciadas por estas três fontes de variação (Tabela 14).

5.2.2. Aspectos do metabolismo do nitrogênio

De uma maneira geral, os resultados obtidos indicaram que, no período final do ciclo vegetativo, com o aumento dos níveis de nitrogênio aplicado como $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$, ocorreu diminuição do $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ acumulados nas folhas, e um aumento nos níveis de N-amino e N-proteico (Tabela 15). Foi observado também um aumento na atividade da reductase do nitrato correlacionado com o teor de nitrogênio aplicado nos dois solos (Tabela 15). Portanto, o nitrogênio absorvido nas duas formas foi imediatamente metabolizado e incorporado a proteínas, o que foi relacionado com a reductase no nitrato, que continuou ativa, e atuou em velocidade maior do que a da absorção do $N-NO_3^-$, daí a diminuição do nitrogênio nesta última forma.

Concordando com estes resultados, SMITH e LUTWICK (1974) observaram que o teor de $N-NO_3^-$ de 3 espécies de gramíneas decrescia nas parcelas adubadas, à medida que a maturidade

avançava, enquanto em 3 outras espécies aumentava o nível de $N-NO_3^-$ nas folhas.

Nas Figs. 11 e 14 observou-se estreita correlação do nitrogênio nas folhas, como $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, N-amino e N-proteico, com o teor de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante, nas duas cultivares e dois solos usados. Também foi verificado que o N-proteico está positivamente relacionado com o N-amino e com o teor de nitrogênio total nas folhas (Figs. 15 e 16).

Os valores obtidos para $N-NO_3^-$, $N-NH_4^+$, N-amino acumulados nas folhas e o teor de N-proteico nas folhas das cultivares "Garôto" e "Sempre Verde" mostraram que estas formas são significativamente influenciadas pelos níveis de nitrogênio aplicado ao solo. Esta relação é mais evidenciada quando o nitrogênio é aplicado na forma de sulfato de amônio (Tabelas 15 e 18).

Observou-se que a velocidade da atividade da reductase do nitrato foi maior quando aplicou-se nitrogênio na forma de nitrato de amônio. Também foi observado que, nas duas cultivares, a atividade da reductase do nitrato aumentou em função do tempo, sendo, da mesma maneira, influenciada pela forma em que o nitrogênio foi aplicado (Figs. 17 e 18).

BRETELER e SMIT (1974) concluíram que mesmo na presença de 98ppm de $N-NO_3^-$, o íon NH_4^+ em níveis de 14 a 56ppm

inibiu a atividade da reductase do nitrato, em duas e seis vezes, respectivamente, confirmando assim, os resultados obtidos por SYRETT e HIPKIN (1973). Os trabalhos destes pesquisadores podem explicar, pelo menos em parte, a razão para a menor atividade desta enzima, quando aplicado sulfato de amônio.

Os níveis de atividade da reductase do nitrato obtidos nas duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. foram baixos (0,43 a 0,94 $\mu\text{moles de N-NO}_2^-/\text{g.m.f. h}^{-1}$), em comparação com os obtidos por DECKARD *et alii* (1977) para duas linhagens de trigo (5,80 e 10,00 $\mu\text{moles/g.m.f. h}^{-1}$) e CROY e HAGEMAN (1970) para duas variedades de milho (3,38 e 2,25 $\mu\text{moles/g.m.f. h}^{-1}$), mas superiores aos encontrados por FERNANDES e FREIRE (1976) em *Brachiaria sp* (0,2 e 0,5 $\mu\text{moles g.m.f. h}^{-1}$).

Baixos níveis de atividade da reductase do nitrato indicam uma predominância do metabolismo do N-NH_4^+ em relação ao N-NO_3^- como proposto por BRETELER e SMIT (1974). Entretanto, estes pesquisadores encontraram diminuição no teor de N-amino livre e de carboidratos, e no presente trabalho os níveis de N-amino livre e de carboidratos, como açúcares totais, aumentaram com o incremento da aplicação do nitrogênio ao solo (Tabela 15). Tal fato veio sugerir que para *Vigna unguiculata* (L) Walp. não seria esta a explicação para os baixos níveis encontrados para a atividade desta enzima.

Poderia ser argumentado que a nitrificação teria influencia no processo, uma vez que tendo ocorrido lenta-

mente nos dois solos, permitiu maior absorção do nitrogênio na forma de N-NH_4^+ . Esta influência foi menor no caso da aplicação de nitrogênio na forma de nitrato de amônio, em consequência de que 50% do nutriente foi aplicado na forma de N-NO_3^- que promoveu maior atividade enzimática.

A atividade da reductase do nitrato, nas duas cultivares, mostrou correlação positiva com o N-amino, N-protéico e N-total nas folhas, e com o teor de N na planta proveniente do fertilizante (Figs. 19 a 22), indicando que ocorreu redução do N-NO_3^- mas sem acúmulo do N-NO_3^- ou N-NH_4^+ nas folhas. Resultados concordantes foram obtidos por EILRICH e HAGEMAN (1973) com trigo, TRAVIS e HUFFAKER (1970) com milho e MULDER *et alii* (1959) em hortaliças. A correlação com o N-protéico e N-total foi concordante com os resultados obtidos por outros autores, entre os quais McLEOD e McLEOD (1974) e HAGEMAN e FLESHER (1960).

Observou-se correlação positiva entre a atividade da reductase do nitrato e o peso da matéria seca das folhas (Fig. 23), o que mais uma vez comprovou a atuação da enzima na utilização do nitrogênio aplicado.

Os resultados mostraram que com maior atividade da enzima ocorreu aumento da síntese de proteínas. Assim, mantendo alta a atividade da reductase do nitrato durante a fase vegetativa, pode-se aumentar o teor protéico nas folhas, e possivelmente nos grãos.

Os dados sugeriram a possibilidade do uso da atividade da reductase do nitrato como um meio de avaliação do estado do nitrogênio da planta, como proposto por FERNANDES e FREIRE (1976).

Quanto à reserva de N-amino livre, verificou-se pela Tabela 17, que houve uma tendência para estabilizar em nível em torno de 40 μ moles/grama de matéria fresca, resultados concordantes com os obtidos por FERNANDES (1974) para arroz e por FERNANDES e FREIRE (1976) em *Brachiaria sp.*

Os valores obtidos para N-protéico e N-total mostraram variação significativa nos níveis aplicados (Tabela 17). Por outro lado observou-se que a participação do N-livre na composição do N-total foi suficiente para produzir variação significativa no teor de nitrogênio acumulado nas folhas. Neste caso a participação do N-livre atingiu valores que podem mascarar os resultados calculados para proteína bruta.

A análise de variância parcial para os dados do fracionamento do nitrogênio e teor de açúcar nas folhas encontram-se na Tabela 18, destacando-se o efeito dos tratamentos nitrogenados como altamente significativos em todos os parâmetros estudados, bem como o efeito da interação solo, cultivares e tratamentos.

5.3. Crescimento e absorção de nutrientes

5.3.1. Efeitos do nitrogênio

Na Tabela 19 são apresentados os dados do efeito da inoculação, níveis e fontes de nitrogênio, no peso da matéria seca das folhas e da planta inteira, nas cultivares e solos usados.

Pela Tabela 20 observou-se correlações altamente significativas entre o crescimento, medido através dos pesos da matéria seca das folhas e peso da matéria fresca da planta inteira, com as doses e fontes de nitrogênio. Verificou-se efeito significativo dos solos, cultivares e tratamentos no peso da matéria seca das folhas e da planta inteira. No que se refere ao peso da matéria fresca da planta inteira houve apenas efeito dos solos e tratamentos (Tabela 22).

O nitrato de amônio influenciou o peso da matéria seca das folhas e da planta inteira, mais do que o sulfato de amônio, produzindo em relação à testemunha sem inoculação, respectivamente, 99% e 84,5% para peso da matéria seca das folhas e 96,5% e 95,5% para matéria seca da planta inteira. A dose de arranque promoveu aumento de 64% e 61% na matéria seca das folhas e 81,0% e 72,5% na matéria seca da planta inteira, respectivamente para nitrato de amônio e sulfato de amônio, também em relação à testemunha. A inoculação com *Rhizobium* não apresentou diferença significativa quando comparada com o tratamento testemunha sem inoculação.

A cultivar "Sempre Verde", promoveu aumento no pe

so de matéria seca das folhas e da planta inteira, em ambos os casos, com 56,5% a mais do que a cultivar "Garôto". Ocorreu diferença significativa entre solos, com o solo Podzólico Vermelho Amarelo sendo mais produtivo que o Podzol Hidromórfico, em 68,5% e 65,5% para matéria seca das folhas e matéria seca da planta inteira, respectivamente.

Os dados de peso da matéria seca das raízes, ramos e folhas nas cultivares "Garôto" e "Sempre Verde" estão apresentados na Figura 28. Observou-se identico comportamento das duas cultivares, para o peso da matéria seca das raízes e folhas, mas bastante diferenciado nos ramos.

De uma maneira geral o nitrato de amonio na dose de 25ppm de nitrogênio teve efeito pequeno ou mesmo não influenciou o crescimento das raízes, ramos e folhas. Entretanto, quando aplicado na dose de 100ppm, o nitrato de amonio promoveu maior produção de matéria seca, especialmente nas folhas da cultivar "Sempre Verde".

Comparando os dois solos, verificou-se que ambos têm limitações quanto ao nitrogênio e fósforo, embora o Podzólico Vermelho Amarelo apresente maior potencial de fertilidade em relação aos níveis destes nutrientes.

Os dados do nitrogênio, fósforo e enxofre acumulados nas folhas das duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., nos dois solos, em função dos tratamentos com nitrogênio constam na Tabela 21.

Observou-se que no Podzol Hidromórfico não houve diferença significativa entre as fontes usadas, enquanto no Podzólico Vermelho Amarelo a forma nítrica foi melhor utilizada que a amoniacal.

Verificou-se uma relação altamente significativa entre o peso da matéria seca das folhas e o nitrogênio total absorvido pelas folhas (Figura 24), e uma correlação entre o peso da matéria seca das folhas e o teor de nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante (Figura 25). Igualmente, foram correlacionados com o nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante, o nitrogênio absorvido pelas folhas e pela planta inteira (Figura 26 e 27).

O nitrogênio total e enxofre total acumulados nas folhas mostraram diferença significativa para solos, cultivares e tratamentos, enquanto que o fósforo total absorvido pelas folhas foi significativamente diferente nos dois solos e tratamentos com nitrogênio, mas não para as cultivares (Tabela 22).

Para nitrogênio total absorvido pelas folhas a dose de 100ppm de nitrato de amônio promoveu aumento de 186,5% a mais que a testemunha sem inoculação, e a dose de 25ppm apenas de 82%. Para o sulfato de amônio estes valores foram de 157% e 63%, para 100ppm e 25ppm, respectivamente.

Os dados do nitrogênio total acumulado nas raízes, ramos e folhas estão apresentados na Figura 29. Observou-

se maior concentração nas folhas, com diferença mais acentuada à medida que aumentou a dose de nitrogênio incorporado ao solo. As concentrações nas raízes foram maiores que nos ramos, mas com variação muito pequena entre os tratamentos.

As concentrações de nitrogênio, fósforo e enxofre nas folhas proveniente do fertilizante, em função das doses e fontes de nitrogênio, nas duas cultivares e nos dois solos são apresentadas na Tabela 23.

Por outro lado, as plantas do solo Podzol Hidromórfico apresentaram maior percentagem de nitrogênio e fósforo na planta proveniente do fertilizante, em comparação com as do Podzólico Vermelho Amarelo. O nitrogênio na planta proveniente do fertilizante no primeiro solo foi 33% maior que no segundo, como esperado, tendo em vista que o Podzol Hidromórfico sendo mais arenoso proporcionou maior aproveitamento dos nutrientes, nas condições experimentais usadas. Neste aspecto, o enxofre não apresentou diferença entre os dois solos.

Para o nitrogênio na planta proveniente do fertilizante as cultivares não apresentaram diferença estatística, porém, mostraram uma pequena diferença ao nível de 5% de probabilidade para o fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante (Tabela 24).

Os tratamentos não influenciaram no teor de fósforo e enxofre na planta proveniente de fertilizante, entretanto tiveram efeito altamente significativo com relação ao nitrogênio.

O efeito das fontes, com relação ao nitrogênio na planta proveniente do fertilizante foi bem evidenciado, sendo o nitrato de amônio superior ao sulfato de amônio em 62,5% para a dose de 100ppm de nitrogênio, e de 72,5% na dose de 25ppm.

Os efeitos das interações entre nitrogênio e fósforo e nitrogênio e enxofre não foram observados neste trabalho.

5.3.2. Efeitos do fósforo e enxofre

Foram estudados em dois solos (Podzólico Vermelho Amarelo e Latossol Vermelho Amarelo) os efeitos do fósforo e enxofre no crescimento, absorção de nutrientes e percentagem de nutrientes na planta proveniente do fertilizante, em *Vigna unguiculata* (L) Walp. (cv. Sempre Verde), cujos resultados gerais estão apresentados nas Tabelas 25, 26 e 27.

5.3.2.1. Produção de matéria seca

Verificou-se que o efeito do fósforo e enxofre na produção de matéria seca da planta foi bastante evidente. Elevação nas doses de fósforo ou de enxofre aumentaram o peso da matéria seca em ambos os solos, até a dose de 200ppm de fósforo e 60ppm de enxofre. Na dose de 400ppm a aplicação de fósforo foi prejudicial ao crescimento, promovendo diminuição do

peso de matéria seca em relação à dose de 200ppm. Este efeito quadrático foi observado nos dois solos, na ausência e na presença de calagem.

O cálculo das equações de regressão entre o peso de matéria seca e as doses de enxofre e da calagem (Tabela 28) permitiu conhecer os efeitos dos fatores estudados.

No Latossol Vermelho Amarelo a calagem aumentou o peso da matéria seca quando o fósforo foi adicionado na dose de 200ppm de fósforo (Figura 30). O enxofre também teve efeito positivo na produção de matéria seca quando foi adicionado ao solo, com efeito também quadrático (Figura 31). No Podzólico Vermelho Amarelo estes efeitos não foram observados.

Pelos coeficientes de determinação obtidos em função da aplicação de enxofre e da calagem observou-se que o efeito do segundo fator foi mais evidenciado que o primeiro.

5.3.2.2. Absorção de nitrogênio, fósforo e enxofre.

As absorções de nitrogênio, fósforo e enxofre por *Vigna unguiculata* (L) Walp. mostraram comportamento idêntico para os três nutrientes, com relação ao fósforo aplicado. Observou-se que o fósforo, mais que os outros dois, mostrou uma absorção contínua, quase linear, à medida que aumentou a dose deste nutriente (Tabela 25 e 26).

O enxofre adicionado ao solo não influenciou significativamente na absorção de nitrogênio e fósforo, enquanto a adição de fósforo aumentou significativamente a absorção de enxofre ao nível de 1% de probabilidade. Este aumento, com a adição do enxofre ao solo, só foi significativo ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 33).

A absorção de nitrogênio, diferentemente da matéria seca, foi independente da calagem e da adição de enxofre (Figuras 32 e 33), e influenciadas pelas doses de fósforo, com reação diferente para cada solo. Observou-se uma melhor correlação no Latossol Vermelho Amarelo (Tabela 28) e a absorção foi estatisticamente diferente, sendo maior no Latossol Vermelho Amarelo que no Podzólico Vermelho Amarelo (Tabela 33).

A absorção do fósforo só foi dependente das doses de fósforo aplicadas, com resposta diferente para cada solo (Tabelas 29 e 33). O Latossol Vermelho Amarelo favoreceu a absorção de fósforo, chegando, em média, a absorver cerca de 50% mais fósforo que o Podzólico Vermelho Amarelo. Possivelmente ocorreu uma transformação do fósforo solúvel para uma forma insolúvel, no caso do Podzólico Vermelho Amarelo. A calagem teve efeito estatisticamente significativo na absorção de fósforo no Latossol Vermelho Amarelo mas não no Podzólico Vermelho Amarelo (Tabela 33 e Figura 34). Este fato pode ser atribuído ao teor de alumínio solúvel que apresentou-se bem mais elevado neste último solo (1,20 eq. mg/100g, e pH 4,3) em comparação com o Latossol Vermelho Amarelo (0,60 eq. mg/100g e pH 5,3).

tendo em vista que a calagem foi realizada com base no teor de alumínio (Al^{+3}), e talvez não tenha sido suficiente para neutralizar toda a acidez do Podzólico Vermelho Amarelo.

A absorção do enxofre foi maior no Latossol Vermelho Amarelo do que no Podzólico Vermelho Amarelo (Figura 35).

Pela tabela 26 verificou-se que o aumento crescente da absorção do fósforo, tanto na presença como na ausência da calagem promoveu um consumo de luxo, tendo em vista que não ocorreu, proporcionalmente, elevação na produção de matéria seca (Tabela 25).

A absorção do enxofre foi dependente do solo e das doses de fósforo aplicadas, sendo interessante observar a interação positiva entre solos e doses de enxofre (Tabela 33). EVANS *et alii* (1977), com o objetivo de verificar o efeito da adubação com enxofre, no teor de aminoácidos sulfurados em *Vigna unguiculata* (L) Walp. também observaram efeito positivo das doses crescentes de enxofre na absorção deste nutriente. Neste trabalho estes pesquisadores usaram doses de 0; 0,2; 0,6; 1,8; 5 e 45ppm, com efeito positivo até a dose de 5ppm de enxofre.

A absorção de enxofre aumentou com a elevação da dose de fósforo, com efeito positivo, e muito semelhante tanto com calagem como sem calagem (Tabela 29). Em trabalho realizado por ALVAREZ *et alii* (1976) foram obtidos resultados semelhantes, trabalhando com aveia.

Observou-se correlações quadráticas entre nitrogênio, fósforo e enxofre acumulados na planta, e o peso da matéria seca, em relação a interação entre solo, calagem e doses de fósforo; solo, dose de enxofre e dose de fósforo; e calagem, dose de enxofre e dose de fósforo (Tabela 30).

Com relação aos mesmos parâmetros acima citados verificou-se correlações quadráticas entre fósforo absorvido, enxofre absorvido e peso da matéria seca, relacionados com o teor de fósforo na planta proveniente do fertilizante (Tabela 31).

5.3.2.3. Fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante

O fosforo na planta proveniente do fertilizante, da mesma forma que fósforo total absorvido, mostrou diferença significativa de acordo com o solo e com as doses de fósforo aplicadas (Tabela 33).

As equações de regressão entre as percentagens de fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante e as doses de fósforo aplicadas nos dois solos, na presença e na ausência de calagem e doses de enxofre, permitiram conhecer os efeitos dos fatores estudados (Tabela 32 e Figuras 36 e 37).

No Latossol Vermelho Amarelo não houve correlação significativa para fósforo com relação à calagem, mas sim

para fósforo com as duas doses de enxofre (Tabela 32). No Podzólico Vermelho Amarelo observou-se correlação altamente significativa para fósforo, e apenas significativa ao nível de 5% de probabilidade para enxofre, quando aplicado fósforo sem calagem. O enxofre aplicado mostrou efeito positivo para fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante, com exceção da dose 1 (60ppm de S).

No Latossol Vermelho Amarelo notou-se um efeito favorável do enxofre aplicado, na percentagem de fósforo na planta proveniente do fertilizante, na ausência e na presença de calagem, o que não foi evidenciado no Podzólico Vermelho Amarelo (Tabela 27). Em ambos os solos a percentagem de fósforo na planta proveniente do fertilizante aumentou pela aplicação de fósforo.

Comparando as Figuras 36 e 37 verificou-se que não ocorreram grandes diferenças na relação entre a percentagem de fósforo na planta proveniente do fertilizante e as doses de fósforo aplicadas, em função da calagem e dos níveis de enxofre usados. Observou-se maior efeito no Latossol Vermelho Amarelo, e uma tendência de, na dose de 400ppm de fósforo, a percentagem de fósforo na planta proveniente do fertilizante atingir valores próximos aos obtidos para o Latossol Vermelho Amarelo.

A calagem pareceu atuar com efeito negativo na percentagem de enxofre na planta proveniente do fertilizante,

principalmente no Latossol Vermelho Amarelo (Tabela 27). Este efeito não mostrou diferença estatística (Tabela 33).

A maior aplicação de enxofre correspondeu a uma maior absorção de enxofre na planta proveniente do fertilizante, nos dois solos, com efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nestes experimentos permitem as seguintes conclusões:

1. As estirpes C-101 e C-102 formaram nódulos pretos em *Vigna unguiculata* e portanto poderão ser usadas na identificação da estirpe do inoculante;

2. As cultivares estudadas mostraram-se muito promíscuas nodulando com estirpes de outros hospedeiros, embora com maior quantidade de nitrogênio fixado pela estirpe homologa;

3. Os resultados sugerem que estirpes obtidas de *Vigna unguiculata* cultivada em região tropical deverão fixar mais nitrogênio;

4. A aplicação de nitrogênio na dose de 100ppm inibiu totalmente a formação de nódulos, e promoveu maior atividade da reductase do nitrato e produção de matéria seca, nos dois solos usados;

5. A dose de arranque de nitrogênio (25ppm) não favoreceu a nodulação e o nitrogênio cedido pela simbiose foi insuficiente para o desenvolvimento normal das duas cultivares de *Vigna unguiculata*;

6. A aplicação de $N-NO_3^-$ nos dois solos promoveu aumento da atividade da reductase do nitrato até um nível máximo de 0,9 μ moles/g de matéria verde, provavelmente muito baixo para a capacidade genética das cultivares estudadas;

7. As absorções de nitrogênio, fósforo e enxofre foram altas sendo maior no Podzol Hidromórfico, particularmente para o fósforo e enxofre;

8. A calagem favoreceu a absorção de fósforo no Latossol Vermelho Amarelo mas não no Podzólico Vermelho Amarelo;

9. Houve efeito do nitrogênio e fósforo no peso da matéria seca e na absorção de nitrogênio, fósforo e enxofre;

10. O fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante aumentou com a adição destes dois nutrientes ao solo, mas não com a aplicação de nitrogênio;

11. O nitrogênio nas folhas provenientes do fertilizante cresceu à medida que foi adicionado nitrogênio, tanto na forma de sulfato de amônio como nitrato de amônio.

7. SUMMARY

In Leonard Jars, an experiment was carried out in order to study the effects of five *Rhizobia* strains and four cultivars of *Vigna unguiculata* (L) Walp, on dinitrogen fixation, nutritional status and dry matter yield.

A pot experiment was conducted with two cultivars in two soils (Hidromorphic Podzol and Red Yellow Podzolic), with the aim of studying the effects of different levels of nitrogen applied as ammonium sulphate - ^{15}N and ammonium nitrate - ^{15}N on dry matter yield and N,P,S absorption. An other pot experiment was carried out using also two cultivars and two soils (Red yellow Podzolic and Red yellow Latossol) in order to study the influence of different levels of phosphorus - ^{32}P and sulfur - ^{35}S , with and without lime.

A randomized block design with three replicates was used in all the experiments which were installed in a greenhouse.

The results indicated that the total number of nodules as well as the total nodule weight were influenced by the strains. Certain host specificity was observed and the strain (C-102) produced black nodules on all cultivars.

When all strains used were applied in mixture there was no effect on both nodule formation and nitrogen fixation and it seems that the homologue strain 5.000 was more competitive in nodule formation. Competition between inoculated and native strains showed that C-102 contributed by only 20 per cent of the nodules.

Nodulation was completely inhibited by nitrogen application at the 100ppm level in both forms used. The starter dose (25ppm) had no influence in *Vigna unguiculata* (L) Walp. and symbiotic nitrogen was insufficient to promote normal plant growth in the two soils. Phosphorus and sulphur applications had no effect on promoting nodulation.

The concentrations of nitrogen, phosphorus and sulphur in the plants were high and dependent on nutrient application. Nitrogen and phosphorus showed higher concentration on the leaves but sulphur was present in the same proportion on leaves and shoots.

Nitrate reductase activity, N-amino and N-protein in the leaves showed positive correlations with nitrogen application. Nitrogen fractions (N-NH_4^+ , N-NO_3^- , N-amino and N-protein) in the leaves, reductase nitrate and dry matter yield were

closely correlated with nitrogen from fertilizer.

Nitrate reductase activity was dependent on plant age. It also was dependent on added nitrogen specially when it was applied as ammonium nitrate.

Plant growth and nutrient accumulation were positively influenced by nitrogen and more extensively with ammonium nitrate at the 100ppm level. Phosphorus application influenced absorption of nitrogen, phosphorus and sulphur but the latter one showed no effect except on sulphur absorption. Liming influenced phosphorus absorption in the Red Yellow Latossol.

Phosphorus and sulphur derived from fertilizer increased with successive application of phosphorus and sulphur but not with nitrogen treatments.

8. LITERATURA CITADA

- ALLEN, O.N. e ALLEN, E.K. 1947. A survey of nodulation among leguminous plants. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 12:203-208.
- ALLEN, O.N. e BALDWIN, I.C. 1954. Rhizobia legume relationships. *Soil Sci.* 78:415-427.
- ALVAREZ, V.V.H.; ESTEVÃO, M.M.; BRAGA, J.M. e PINTO, O.C.B. 1976. Equilíbrio de formas disponíveis de fósforo e enxofre em dois latossolos de Minas Gerais: II-Formas isotopicamente trocáveis de fósforo e enxofre. *Experientiae.* 22(12):293-328.
- BLACKMAN, G.E. e BLACK, J.N. 1959. Physiological and ecological studies in the analysis of plant environment. XII-The role of the light factor in limiting growth. *Ann. Bot.* 23:131-145.

- BOWEN, G.D. 1959. Specificity and nitrogen fixation in the *rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *Queensl. Jour. Agric. Sci.* 16:267-282.
- BRANTLEY, B.B. 1964. Responses of southern pea to photoperiod and nitrogen. *Amer. Soc. Agric. Sci.* 85:409-413.
- BREMNER, J.M. 1965. Total nitrogen. In: C.A. Black (ed) *Methods of soil analysis, Part.2. Agronomy.* 9:1149-1178.
- BREMNER, J.M. e KEENEY, D.R. 1965. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Analytica Chimica Acta.* 32:485-495.
- BRETELIER, H. e SMIT, A.L. 1974. Effect of ammonium nutrition on uptake and metabolism of nitrate in wheat. *Neth. Jour. Agric. Sci.* 22:73-81.
- CAMPOS, G.M. e DAMASCENO, J.H. 1973. Adubação mineral na cultura do feijão de corda (*Vigna sinensis* (L) Endl) em Pente_{coste}-Ceará. *Bol. Tec. DNOCS.* 31(2):101-107.
- CHARREAU, C. e VIDAL, P. 1962. Facteurs pédologiques influant sur la croissance et la nutrition des doliques. *Agron. Trop.* 17(9):765-775.
- CHESNEY, H.A.D. 1974. Performance of cowpea cv "Black-eye" in Guyana as affected by phosphorus and potassium. *Turrialba.* 24(2):193-199.

- CHUNDAWAT, G.S. 1972. Note on the effect of phosphate fertilization and legume, non legume component on nitrogen reserve of soil. *Indian Jour. Agric. Res.* 6(2):167-168.
- CLOONAN, M.J. 1966. The root nodule bacteria as factors in the establishment of tropical legumes. *Jour. Aust. Inst. Agric. Sci.* 284.
- CLOONAN, M.J. e VICENT, M.J. 1967. The nodulation of annual summer legumes sown on the far north coast of new south wales. *Aust. Jour. Expl. Agric. Anim. Husb.* 7(25):181-189.
- CROFTS, F.C. e JENKINS, H.V. 1954. Root nodule bacteria for cowpeas on the red river basaltic soils of the Richmond River district of New South Wales. *Jour. Aust. Inst. Agric. Sci.* 20(4):257-258.
- CROY, L.I. e HAGEMAN, R.H. 1970. Relationships of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. *Crop Sci.* 10(3):280-285.
- DART, P. e EAGLESHAM, A. 1975. Progress report on *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*. IAEA Meeting, Viena.
- DART, P.J. e MERCER, F.V. 1965. Effect of growth temperature level of ammonium nitrate and light intensity on the growth of cowpea (*Vigna sinensis* Endl. ex Hassk). *Aust. Jour. Agric. Res.* 16(1)-321-345.

- DART, P.J. e WILDON, D.C. 1970. Nodulation and nitrogen fixation by *Vigna sinensis* and *Vicia atropurpurea*: The influence of concentration, form and sit of application of combined nitrogen. *Aust. Jour. Agric. Res.* 21(1):45-56.
- DECKARD, E.L.; LUCKEN, K.A.; JOPPA, L.R. e HAMMOND, J.J. 1977. Nitrate reductase activity, nitrogen distribution, grain yield and grain protein of tall semidwarf near-isogenic lines of *Triticum aestivum* and *T. turgidum*. *Crop. Sci.* 17:293-296.
- DÉNARIÉ, J.; ANDRIAMANANTENA, S. e RAMONJY, J. 1968. Legume inoculation in Madagascar. Results from trials in 1966 - 1967. *Agron. Trop.* 23(8):925-966.
- DESHMUKH, M.G. e JOSHI, R.N. 1973. Effect of rhizobial inoculation on the extraction of protein from the leaves of cowpea (*Vigna sinensis* (L) Savi ex Hassk). *Indian Jour. Sci.* 43(6):539-542.
- DESHMUKH, M.G.; GORE, S.B.; MUNGIKAR, A.M. e JOSHI, R.N. 1974. The yield of leaf protein from various short nodulation crops. *Jour. Sci. Food Agri.* 25(6):717-724.
- DOBEREINER, J. 1970. Inoculação cruzada e eficiência da simbiose de leguminosas tropicais. V Reun. Lat. Amer. *Rhizobium*. Km 47.
- DOBEREINER, J. 1974. Legumes in latin american agricultura. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad. B. Biol. Sci.* 40:768-794.

- DOBEREINER, J. e COSER, A.C. 1970. Effectiveness of natural nodulation and cross inoculation of tropical forage legumes. X Congress Intern. Microbiol. México.
- EILRICH, G.L. e HAGEMAN, R.H. 1973. Nitrate reductase activity and its relationships to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Sci.* 13(1):59-66.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. 1976. Sistema de Produção para feijão. Bol. nº 18.
- EVANS, I.M.; BOULTER, D.; FOX, R.L. e KANG, B.T. 1967. The effects of sulphur fertilizers on the content of sulpho amino acids in seeds of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Jour. Sci. Food Agric.* 28:161-166.
- EZEDINMA, F.O.C. 1964a. Notes on the distribution and effectiveness of cowpea rhizobium in Nigerian Soils. *Plant and Soil.* 21(1):134-136.
- EZEDINMA, F.O.C. 1964b. Effects of inoculation with local isolates of cowpea rhizobium and application of nitrate nitrogen on the development of cowpeas. *Trop. Agric. Trinidad.* 41(3):243-249.
- FERNANDES, M.S. e FREIRE, L.R. 1976. Efeitos de nitrogênio nitrado aplicado ao solo na atividade de nitrato-reductase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaria* sp. *Turrialba.* 26(3):268-273.

- FERNANDES, M.S. 1974. Effects of light and temperature on the nitrogen metabolism of tropical rice. Ph.D. Thesis, Michigan State University.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. e McCOY, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *Univ. Wisc., Madison*. 343pp.
- GALLI, F. 1959. Inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. *Rev. Agric. Piracicaba, São Paulo*. :139-151.
- GARG, K.P.; SHARMA, A.K. e THAKUR, B.S. 1970. Studies on the different rates of phosphorus and molybdenum on the growth and yield of cowpea fodder and residual effect on wheat. *Indian Jour. Agron.* 16(2): 185-188.
- GARGANTINI, H. e WUTKE, A.C.P. 1960. Fixação do nitrogênio do ar pelas bactérias que vivem associadas às raízes do feijão de porco e do feijão baiano. *Bragantia*. 19(40):639-652.
- GODFREY-SAM-AGGREY, W. 1973. Effects of fertilizers on harvest time and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) in Sierra Leone. *Expl. Agric.* 9(4):315-320.
- GODFREY_SAM_AGGREY, W. 1975. Nitrogen fertilizer management for cowpea (*Vigna unguiculata*) production in Sierra Leone. *Acker-und Pflanzenbau*. 141:167-177.
- GUPTA, V.V. 1976. Tissue sulphur levels and additional sulphur needs for various crops. *Can. Jour. Plant Sci.* 56:651-657.

- GUZMAN, I. e DOBEREINER, J. 1969. Effectiveness and inefficiency in the symbiosis of four cross inoculated legumes. *Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol.* 11:137-140.
- HABISH, H.A. e KHAIRI, S.M. 1968. Nodulation of legumes in the Sudan: Cross inoculation groups and the associated *rhizobium* strains. *Expl. Agric.* 4(3):227-234.
- HAGEMAN, R.H. e FLESHER, D. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant. Physiol.* 35:700-708.
- HALSEY, L.H. 1960. Influence of nitrogen fertilization and seed inoculation levels on yield of southern peas. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 75:517-520.
- HARDY, R.W.F., BURNS, R.C., HERBERT, R.R., HOLSTEN, R.D. e JACKSON, E.K. 1971. Biological nitrogen fixation: A key to world protein. *Plant and Soil*, special volume. 561-590.
- HERRIDGE, D.F. e ROUGLEY, R.J. 1974. Survival of some slow growing rhizobium on inoculated legume seed. *Plant and Soil.* 40(2):441-444.
- HILDER, E.J. 1953. Some aspects of sulphur as a nutrient for pastures in New England Soils. *Aust. Jour. Agric. Res.* 5(1):39-55.
- ISHIZAWA, S. 1972. Root nodule bacteria of tropical legumes. *JARQ* 6(4):199-211.

ISWARAN, V.; KAVIMANDAN, S.K. e KAMATH, M.B. 1969. Response of inoculated and uninoculated legumes to application of phosphate. *Current Sci.* 38(10):251-252.

IVANOFF, S.S. 1948. Chlorosis and nodulation of cowpeas as affected by trials sulphur applications to calcareous soil in the greenhouse. *Plant Physiol.* 23:162-164.

JAQUINOT, L. 1967. Croissances et alimentations minérales comparées de quatre variétés de niébē. *Agron. Trop.* 22(6-7):575-640.

JENKINS, H.V., VINCENT, J.M. e WALTERS, L.M. 1954. The root nodule bacteria as factors of clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore District, New South Wales. III. Field inoculation trials. *Aust. Jour. Agric. Res.* 5(1):77-89.

JOHNSON, C.M. e NISHITA, H. 1952. Microestimation of sulfur in plant materials, soils and irrigation waters. *Anal. Chem.* 24(4):736-742.

JOHNSON, H.W. e ALLEN, O.N. 1952. Nodulation studies with special reference to strains isolated from sesbania species. *Leewenhoeck.* 18:12-22.

JOHNSON, R.M. e RAYMOND, W.D. 1964. The chemical composition of some tropical food plants: II. Pigeons peas and cowpeas. *Trop. Sci.* 6(2):68-73.

- KILMER, V.J. e ALEXANDER, L.T. 1949. Methods of making mechanical of soil. *Soil Sci.* 68(1):15-26.
- KRAMER, M.; KOZAK, K. e LANG, I. 1968. Effect of potassium metaphosphate on the dry matter, yield and the nutrient uptake of rye seedlings of cowpea (*Vigna sinensis* L) and tobacco plants in pot experiments. *Agrochem. Soil Sci.* 17:55-62.
- KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. e JORGENSEN, S.S. 1977. Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continous flow injection turbidimetry. *Anal.* 102:503-508.
- KURDIKERI, C.B.; PATIL, R.V. e KRISHNAMURTHY, K. 1973. Respon_ se of cowpea (*Vigna catjang*) to varying fertilizer levels. *Mysore Jour. Agric. Sci.* 7(2):170-174.
- LATIMORE, M.J.; GIDDENS, J. e ASHLEY, D.A. 1977. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthate supply and nitrogen fixation by soybeans. *Crop Sci.* 17:399-404.
- McCONNEL, J.T. e BOND, G.A. 1957. Comparison of the effects of combined nitrogen on nodulation in non legumes and legumes. *Plant and Soil.* 8:378-388.
- McLEOD, L.B. e McLEOD, J.A. 1974. Effects of N and K fertili- zation on the protein nitrate and non protein reduced N fractions of timothy and brome grass. *Can. Jour. Plant Sci.* 54:331-341.

- MAHAJAN, K.K. e KHANNA, S.S. 1968. Study on the recovery of added phosphorus in legume wheat sequence. *Jour. Res. Punjab. Agric. Univ.* 5(4):545-548.
- MALOTH, S. e PRASAD, R. 1976. Relative efficiency of rock phosphate and superphosphate for cowpea (*Vigna sinensis* Savi) fodder. *Plant and Soil*. 45:295-300.
- MARSHALL, K.C. 1956. Competition between strains of rhizobium trifolii in peat and broth culture. *Jour. Aust. Inst. Agric. Sci.* 22:137-140.
- MATA REYES, A e SANCHEZ, P.C. 1970. Efecto del método de aplicación fuente y dosis de fósforo en un suelo franco arenoso de sabana del estado Monagas (Venezuela) sobre el rendimiento del frijol (*Vigna sinensis* Endl.). *Oriente Agrop. Venezuela*. 2(1):27-39.
- MEANS, U.M., JOHNSON, H.W. e ERDMAN, L.W. 1961. Competition between bacterial strains affecting nodulation in soybeans. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 25:105-108.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Divisão de Pesquisa Pedológica, Recife. 1972. Levantamento Exploratório - Reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco. Vol. I. Bol. nº 26. Série Pedologia nº 24.
- MOORE, S. e STEIN, W.M. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In: Colowick, S.P. e Kaplan, N.O. eds. *Methods in enzymology*, New York, Academic Press, Vol. VI. 819-831.

MULDER, E.G., BOSMA, R. e VAN VEEN, W.L. 1959. Nitrate reduction in plant tissue. *Plant and Soil*. 10(4):335-355.

NEYRA, C.A. e HAGEMAN, R.H. 1974. Dependence of nitrite reduction on electron transport in chloroplasts. *Plant Physiol.* 54:480-483.

NEYRA, C.A. e VAN BERKUM, P. 1977. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. *Can Jour. Microbiol.* 23(3):306-310.

NICOL, H. e THORNTON, R.G. 1941. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on the legume host. *Proc. Roy. Soc. B.* 130:52-59.

NORRIS, O.D. 1956. Legumes and the rhizobium symbiosis. *Emp. Jour. Expl. Agric.* 24(96):247-270.

NUTMAN, P.S. 1956. The influence of the legume in root nodule symbiosis. *Biol. Rev.* 31:109-151.

OMUETI, J.O. e OYENUGA, V.A. 1970. Effect of phosphorus fertilizer on the protein and the essential component of the ash of groundnuts and cowpeas. *W. Afri. Jour. Biol. Appl. Chem.* 13(1):14-19.

- PAIVA, J.B. e ALBUQUERQUE, J.J.L. 1970. Ensaio de adubação mineral NPK em feijão de corda (*Vigna sinensis* Endl) no Ceará. *Pesq. Agrop. Nord.*, Recife. 2(2):53-56.
- PAIVA, J.B.; ALBUQUERQUE, J.J.L. e BEZERRA, F.F. 1971. Adubação mineral em feijão de corda (*Vigna sinensis* Endl) no Ceará. *Brasil. Cien. Agron.* 1(2):75-78.
- PANDEY, S.N. 1972. Effect of sulphur application on nodule formation in legumes. *Agric. Agro-Ind.* 5(1):11-12.
- PATE, J.S. e DART, P.J. 1961. Nodulation studies in legumes. IV. The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant and Soil.* 15(4):329-346.
- PATTERSON, D.R. e BLACKHURST, H.T. 1958. Some effects of irrigation, fertilizer and variety on the yield of southern peas. *Texas Agr. Exp. Sta. Prog. Rept.* 2021.
- PROKSCH, G. 1969. Routins analysis of ¹⁵N in plant material by mass spectrometry. *Plant and Soil.* 31(2):380-384.
- PURSEGLOVE, J.W. 1968. Tropical Crops. 1. Dicotyledons. London, Longsmans. 321-338.
- QUILAPIO, M.P. 1962. Effect of inoculation of seeds on the nitrogen content of certain legumes. *Araneta Jour. Agric.* 9(1):53-65.

- RAM, D.; TOMER, P.S. e TRIPATHI, H.P. 1970. Effect of number of cuttings and levels of phosphorus and nitrogen on summer cowpea forage. *HAU. Jour. Res.* 1(3):39-43.
- RAO, P.S.; PATEL, G.L. e MISTRY, P.D. 1972. Effect of interaction of temperature and photoperiod on flower initiation in cowpea. *Indian Jour. Agric. Sci.* 42(2):109-111.
- REDER, R. 1946. Effect of fertilizer and environment on the calcium, phosphorus and iron content of cowpeas. *Georgia Agric. Exp. Sta. Southern Cooperative Series. Bull.* nº 4.
- ROTIMI, O.A. 1972. Effects of inoculation with commercial peat-base cowpea rhizobium strain on the development of cowpea varieties. *Nigerian Agric. Jour.* 7(2):174-179.
- ROUNCE, M.V. 1949. The agriculture of the cultivation steppe of the lake, western and central provinces (Tanganyika). Cape Town. *Longsmans, Green and Co.* 68-69.
- SALAM, A.M.A.; OSMAN, A.Z. e BASIOUNY, H. 1968. Interaction of the level and method of phosphorus fertilization on cowpea production in newly reclaimed soils. *Isotope Rad. Res.* 1:33-39.

- SANCHEZ, P.C. e MATA REYES, R.A.R. 1972. Efecto del método de colocación, fuente y dosis de fósforo sobre el rendimiento del maní (*Arachis hypogaea* L) y del frijol (*Vigna sinensis* Endl). *Fitotecnia Lat. Amer.* 8(3):78-84.
- SARRUGE, J.R. e HAAG, H.P. 1974. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ/USP. 56p mimeografado.
- SCHOCH, P.G. e CANDELARIO, L.S. 1974. Influencia de la sombra sobre el crecimiento y la productividad de las hojas de *Vigna sinensis* L. *Turrialba*. 24(1):84-89.
- SELLSCHOP, J.P.F. 1962. Cowpeas, *Vigna unguiculata* (L) Walp. *Field Crop Abst.* 15:259-266.
- SINGH, R.M. e JAIN, T.C. 1966. Effect of phosphate and molybdate on the growth characters of russian giant cowpea (*Vigna sinensis*). *Allahabad Farmer*. 40(1):29-32.
- SINGH, R.M. e JAIN, T.C. 1968. Effect of phosphate and molybdate on the uptake of N and P by russian giant cowpea. *Ann. Arid Zone*. 7(1):142-146.
- SINGH, R.M.; SINGH, N. e SIDHU, G.S. 1968. Symbiotic fixation by some summer (kharif) legumes of Punjab. 2. Effect of phosphate on nitrogen fixation. *Jour. Res. Agric. Univ.* 5(1):88-94.
- SINGH, S.D., MISRA, D.K. VYAS, D.L. e DAULAY, H.S. 1971. Fodder production of sorghum in association with different legumes under different level of nitrogen. *Indian Jour. Agric. Sci.* 41(2):172-176.

- SMITH, A.D. e LUTWICK, L.E. 1974. Effects of N fertilizer on total N and NO_3^- content of six grass species. *Can. Jour. Plant Sci.* 55:573-577.
- STAMFORD, N.P. 1971. Nódulos pretos no estudo da inoculação cruzada e da competição entre estirpes de *Rhizobium* em leguminosas forrageiras tropicais. Rio de Janeiro (km 47), Univ. Federal Rural do Rio de Janeiro. 112p. Tese de Mestrado.
- STAMFORD, N.P.; CAMPELO, A.B. e DOBEREINER, J. 1968. Nódulos pretos eficientes e ineficientes e sua inoculação cruzada em algumas leguminosas. IV Reun. Lat. Amer. Inoc. Leguminosas. Porto Alegre.
- STEWART, F.B. e REED, M. 1969. Effect of fertilization on yield growth and mineral composition of southern peas. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.* 94:258-260.
- SUHET, A.R. 1976. Efeito do ^{59}Fe e do ^{65}Zn na produção de matéria seca e na composição química do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca e na fixação de nitrogênio atmosférico, em três solos. Piracicaba, ESALQ/USP. 73p. (Dissertação de Mestrado).
- SUMMERFIELD, R.J.; HUXLEY, P.A. e STEELE, W. 1974. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp). *Field Crop. Abst.* 27(7):301-313.

- SYRETT, P.J. and HIPKINS, C.R. 1973. The Appearance of Nitrate Reductase Activity in Nitrogen-starved Cells of *Ankistrodesmus braunii* Planta (Berl.) 111:57-64.
- THORNTON, G.D. 1956. The effect of fertilizer nitrogen on nodulation growth and nitrogen content of several legumes grown in sandy soils. *Proc. Soil Crop Soc.* 16:146-151.
- TRAVIS, R.L. e HUFFAKER, R.C. 1970. Light induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.* 46(6):800-805.
- UEDA, H. e OYAMA, K. 1959. Studies on nodule bacteria of leguminous plants in sand dune. I. Some conditions for the nodule formation on *Vigna* plants. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan.* 28:247-249.
- VETTORI, L. 1969. Métodos de análise de solo. Ministério da Agricultura-Equipe de Pedologia e Fertilidade do Solo. Rio de Janeiro. Bol. Técnico nº 7. 24p.
- VINCENT, J.M. 1962. Australian studies of the root nodule bacteria. *Rev. Proc. Linn. Soc. New South Wales.* 87:8-38.
- WETSELAAR, R. 1967. Estimation of nitrogen fixation by legumes in a dry monsoonal area of north western Australia. *Aust. Jour. Expl. Agric. Anim. Husb.* 7(29):518-522.
- WILSON, J.K. 1939. Symbiotic promiscuity in the legumosae. *Trans. III Comm. Int. Soc. Soil Sci.* A:49-63.

WILSON, P.W. 1940. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation. Univ. Wisc., Madison.

Tabela 1. Tratamentos com diferentes níveis e fontes de nitrogênio (experimento 2).

Tratamento	Fonte	Dose de N (ppm)	Quantidade/vaso <u>a/</u> Reagente(g) Solução(ml)	
1	$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	1,880	100
2	$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25	0,470	100
3	$^{15}\text{NH}_4\ ^{15}\text{NO}_3$	100	1,140	100
4	$^{15}\text{NH}_4\ ^{15}\text{NO}_3$	25	0,285	100
5	Inoculante <u>b/</u>	-	-	-
6	Testemunha <u>c/</u>	-	-	-

a/ Vasos com 4kg de solo

b/ Estirpe C-102 e 5.000

c/ Sem nitrogênio mineral e sem inoculante.

Tabela 2. Características químicas e físicas dos solos usados.

Discriminação da Análise	S O L O S		
	Podzol Hidromórfico	Latossol Verm. Amarelo	Podzólico Verm. Amarelo
<u>Características químicas</u>			
pH em água	5,6	5,3	4,5
PO_4^{-2} eq. mg/100g	0,16	0,02	0,13
K^+ eq. mg/100g	0,10	0,20	0,22
Ca^{+2} eq. mg/100g	0,88	0,96	0,96
Mg^{+2} eq. mg/100g	0,24	0,32	0,48
Al^{+3} eq. mg/100g	0,24	0,64	1,20
H^+ eq. mg/100g	1,87	5,12	5,90
N total			
Carbono (%)	0,63	1,59	1,38
<u>Características físicas</u>			
<u>Análise mecânica (%)</u>			
Areia muito grossa	11,2	1,8	-
Areia grossa	37,0	13,3	0,3
Areia média	31,3	31,6	4,3
Areia fina	10,6	21,8	19,3
Areia muito fina	1,4	2,8	11,7
Areia (total)	91,5	71,3	35,6
Limo	6,8	7,9	22,4
Argila	1,7	20,8	42,0
Argila dispersa <u>a/</u>	1,3	9,0	24,5
<u>Densidade</u>			
Densidade real	2,6	2,6	2,3
Densidade aparente	1,7	1,4	1,3

a/ Dispersa em água.

Tabela 3. Balanceamento de nutrientes, fontes e doses da adubação básica (experimento 2).

Tratamento ^{a/}	Reagentes (g/vaso)				
	KH ₂ PO ₄	K ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄ ^{b/}	NaCl ^{c/}	MgSO ₄ .7H ₂ O ^{d/}
1	1,760	0,436	-	1,660	0,60
2	1,760	0,436	1,515	0,415	0,60
3	1,760	0,436	2,020	-	0,60
4	1,760	0,436	2,020	-	0,60
5	1,760	0,436	2,020	-	0,60
6	1,760	0,436	2,020	-	0,60

a/ Os tratamentos seguem a mesma ordem da tabela 1.

b/ Adicionado para balanceamento do enxofre devido aos tratamentos que receberam sulfato de amônio.

c/ Balanceamento do sódio quando da adição do Na₂SO₄ para equilibrar o enxofre.

d/ Magnésio e micronutrientes foram colocados pela adição de 2ml, por kg de solo, de uma solução contendo/l: 150,0g de MgSO₄.7H₂O; 15,8g de CuSO₄; 20,0g de Fe₂(SO₄)₃; 1,00g de H₃BO₃; 7,0g de NaMoO₄ e 20,0g de ácido cítrico.

Tabela 4. Principais características físicas dos radionuclídeos ^{32}P e ^{35}S .

Radionuclídeo	Meia vida (dias)	Decaimento	Partícula b	
			Energia (MeV)	Intensidade %
^{32}P	14,3	β^-	1,710	100
^{35}S	88,0	β^-	0,167	100

Tabela 5. Tratamentos com diferentes doses de fósforo e enxofre, e fontes usadas (experimento 3).

Tratamento	Fósforo		Enxofre		
	dose (ppm)	reagente (g)	dose (ppm)	reagente (g)	
		$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$		K_2SO_4	MgSO_4 ^{a/}
1	50	0,375	60	0,217	0,300
2	100	0,750	60	0,217	0,300
3	200	1,500	60	0,217	0,300
4	400	3,000	60	0,217	0,300
5	50	0,375	120	0,868	0,300
6	100	0,750	120	0,868	0,300
7	200	1,500	120	0,868	0,300
8	400	3,000	120	0,868	0,300

^{a/} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, adicionado juntamente com a solução de micronutrientes (2ml/kg de solo), em vasos com 2kg de solo. Equivale a aproximadamente 40ppm de S e 30ppm de Mg.

Tabela 6. Nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico por quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., em inoculação cruzada com três estirpes de *Rhizobium* (média de três repetições).

Culti- vares	Estirpes	Nódulos			Plantas	
		número	peso	peso médio	mat.seca	N total
		(vaso)	(mg/vaso)	(mg)	(g/vaso)	(mg/vaso)
<u>Seridô</u>	-	10	23	2,3	2,3	34
	C-101	79	213	2,7	2,5	100
	C-102	91	317	3,5	2,4	86
	5.000	104	413	4,0	3,3	123
	mistura	50	267	5,3	2,5	97
<u>Sempre Verde</u>	-	0	0	0	1,8	9
	C-101	91	327	3,6	2,8	101
	C-102	102	360	3,5	2,2	38
	5.000	21	366	17,4	2,6	105
	mistura	74	497	6,7	2,8	104
<u>Garôto</u>	-	2	4	2,0	1,4	17
	C-101	95	283	3,0	2,3	69
	C-102	78	403	5,2	2,0	39
	5.000	15	450	30,0	2,7	94
	mistura	99	424	4,3	1,8	54
<u>Carirí</u>	-	10	37	3,7	1,7	33
	C-101	84	463	5,5	3,2	133
	C-102	47	303	6,5	4,4	109
	5.000	56	275	4,9	2,7	84
	mistura	71	396	5,6	2,8	96

Tabela 7. Formação de nódulos pretos e normais em quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., inoculadas com estirpes formadoras de nódulos normais e pretos (média de três repetições).

Cultivar	Estirpe	Nódulo					
		número/vaso		peso total (mg / vaso)		peso médio(mg)	
		Preto	Normal	Preto	Normal	Preto	Normal
<u>Seridô</u>	-	0	10	0	23	0	2,3
	C-101	0	79	0	213	0	2,7
	C-102	91	0	317	0	3,5	0
	5.000	0	104	0	413	0	4,0
	mistura	0	50	0	267	0	5,3
<u>Sempre Verde</u>	-	0	0	0	0	0	0
	C-101	78	13	307	20	3,9	1,5
	C-102	83	19	341	19	4,1	1,0
	5.000	0	21	0	366	0	17,4
	mistura	53	21	388	109	7,3	5,2
<u>Garôto</u>	-	0	2	0	4	0	2,0
	C-101	0	95	0	283	0	3,0
	C-102	68	10	344	59	5,1	5,9
	5.000	0	15	0	450	0	30,0
	mistura	38	61	142	282	3,7	4,6
<u>Cariri</u>	-	0	10	0	37	0	3,7
	C-101	84	0	463	0	5,5	0
	C-102	35	12	287	16	8,2	1,3
	5.000	0	36	0	275	0	4,9
	mistura	0	71	0	396	0	5,6

Tabela 8. Especificidade hospedeira de quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. inoculadas com três diferentes estirpes.

Cultivares	Especificidade Hospedeira			(N fixado)
	100%	a	75%	75% a 50%
Seridô	5.000	e	C-101	C-102
Sempre Verde	5.000	e	C-101	C-102
Garoto	5.000	e	C-101	C-102
Cariri	C-101	e	C-102	5.000

Tabela 9. Análise de variância parcial do experimento em vasos de Leonard.

Fonte de Variação	G.L.	Planta	Nódulo		Nitrogênio	
		Mat. seca (g / vaso)	Número	Peso (mg/vaso)	%	total
Cultivares	3	17,626**	0,394	0,378	3,627*	1,591
Estirpes	4	27,212**	17,952**	23,078**	12,731**	10,013**
Cult. X Est.	12	8,720**	1,427	0,996	1,091	0,855
Repetição	2	4,469*	1,554	0,119	3,710*	3,530
Resíduo	38					
C.V. (%)		17,41	34,82	31,00	28,08	26,11

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 10. Nodulação por estirpes formadoras de nódulos pretos e normais, em dois solos e duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., em função de tratamentos com nitrogênio (média de três repetições).

Tratamento	Nódulo				
	Número/vaso			Peso/vaso (mg)	
	preto	total	%preto	total	médio
<u>Podzol Hidromófico</u>					
<u>cv. Garoto</u>					
Sulfato de amonio 100ppm	0	0	0	0	0
Sulfato de amonio 25ppm	2	8	25,0	23,0	2,9
Nitrato de amonio 100ppm	0	2	0	1,4	0,7
Nitrato de amonio 25ppm	5	27	22,2	77,5	2,9
Inoculação (estirpe C-102)	0	9	0	21,9	2,4
Sem inoculação	0	17	0	30,3	1,8
<u>cv. Sempre Verde</u>					
Sulfato de amonio 100ppm	0	0	0	0	0
Sulfato de amonio 25ppm	0	108	0	261,9	2,4
Nitrato de amonio 100ppm	0	1	0	1,4	1,4
Nitrato de amonio 25ppm	0	130	0	237,2	1,8
Inoculação (estirpe C-102)	5	60	8,3	89,2	1,5
Sem inoculação	0	106	0	160,4	1,5
<u>Podzólico Verm. Amarelo</u>					
<u>cv. Garoto</u>					
Sulfato de amonio 100ppm	0	0	0	0	0
Sulfato de amonio 25ppm	0	3	0	11,0	3,7
Nitrato de amonio 100ppm	0	0	0	0	0
Nitrato de amonio 25ppm	1	8	12,5	16,5	2,1
Inoculação (estirpe C-102)	1	4	25,0	27,0	6,8
Sem inoculação	0	3	0	12,2	4,1
<u>cv. Sempre Verde</u>					
Sulfato de amonio 100ppm	0	0	0	0	0
Sulfato de amonio 25ppm	2	9	22,2	51,2	8,5
Nitrato de amonio 100ppm	0	0	0	0	0
Nitrato de amonio 25ppm	1	7	14,3	36,5	5,2
Inoculação (estirpe C-102)	1	29	3,5	207,8	7,2
Sem inoculação	0	15	0	50,6	3,4

Tabela 11. Nodulação e fixação do nitrogênio, medida através da atividade da nitrogenase, nas cultivares "Garoto" e "Sempre Verde" (experimento 2).

Cultivares	Nódulos		Ativ. da nitrogenase μmoles de C ₂ H ₂ /vaso
	Número	Peso (mg/vaso)	
Garoto	2,48	3,77	6,76
Sempre Verde	4,93	7,78	8,38

Tabela 12. Análise de variância parcial para número e peso de nódulos, atividade da nitrogenase e da reductase do nitrato.

Fonte de Variação	G.L.	Nódulo		Atividade	
		Número ^{a/}	Peso M.S. ^{a/}	Nitrogenase	Reductase nitrato
Solo	1	**	NS	NS	NS
Cultivar	1	**	**	NS	*
Tratamento	5	**	**	**	**
Solo X Cult.	1	NS	NS	NS	NS
Solo X Trat.	5	NS	NS	NS	NS
Cult. X Trat.	5	NS	NS	NS	NS
Solo X Cult. X Trat.	5	NS	NS	NS	NS

^{a/} Valores transformados em $\sqrt{x + T}$

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

M.S. = matéria seca.

Tabela 13. Efeitos das fontes e níveis de nitrogênio (ppm) e inoculação com *Rhizobium*, na matéria seca das folhas e da planta inteira e na concentração de N, P e S nas folhas.

Tratamentos	Peso Mat. Seca(g)		Folhas		
	P. Inteira	Folhas	N%	P%	S%
<u>Sulfato de amônio-¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>					
25	15,46	6,19	1,51	1,28	0,56
100	18,43	8,14	2,90	1,00	1,39
<u>Nitrato de amônio-¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>					
25	13,90	5,88	2,01	1,42	0,75
100	18,30	9,57	2,84	1,17	0,61
<u>Inoculante sem adubo</u>	10,98	5,05	1,88	1,70	1,06
<u>Sem inóculo, sem adubo</u>	9,96	4,82	1,56	1,63	0,92
dms a 5%	1,60	0,85	0,45	0,16	0,41
dms a 1%	1,93	1,03	0,54	0,19	0,49
F	**	**	**	**	**
C.V. (%)	9,11	10,67	17,44	9,65	37,45

Tabela 14. Análise de variância parcial para as concentrações de nitrogênio, fósforo e enxofre nas folhas.

Fonte de Variação	G.L.	% nas folhas		
		Nitrogênio	Fósforo	Enxofre
Solo	1	NS	**	**
Cultivar	1	NS	**	**
Tratamento	5	**	**	**
Solo x Cultivar	1	NS	**	NS
Solo x Tratamento	5	**	**	**
Cultivar x Trat.	5	*	**	*
Solo x Cult. x Trat.	5	NS	**	*

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 15. Efeitos das fontes e doses de nitrogênio (ppm) e inoculação com *Rhizobium*, nas formas de nitrogênio livre acumuladas nas folhas.

Tratamentos	Quantidade nas folhas (moles/g.m.f.)					ARN
	Açúcar	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-amônio	N-proteico	N-NO ₃ ⁻
<u>Sulfato de amônio - ¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>						
25	16,11	6,52	8,54	24,7	0,94	0,49
100	19,66	4,70	6,79	35,8	1,85	0,75
<u>Nitrato de amônio - ¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>						
25	17,88	5,02	8,51	29,1	1,00	0,53
100	18,88	5,13	7,39	38,9	1,52	0,94
<u>Inoculante - adubo</u>	18,00	4,99	7,04	26,9	1,09	0,62
<u>Sem inóculo - adubo</u>	13,00	5,94	7,87	22,7	0,87	0,43
dms a 5%	1,75	0,75	1,64	3,23	0,15	0,23
dms a 1%	2,11	0,91	1,98	3,90	0,19	0,28
F	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	8,39	11,60	17,61	8,87	10,82	21,57

Tabela 16. Regressões entre a atividade da reductase do nitrato e N-amino nas folhas (Y) e doses de nitrogênio nítrico e amoniacal (X), no Podzol Hidromórfico e no Podzólico Vermelho Amarelo, nas cv "Garôto" e "Sempre Verde".

Equação de regressão		R ² (%)
<u>ATIVIDADE DA REDUCTASE DO NITRATO</u>		
<u>Podzol Hidromórfico - cv "Garôto"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 0,423 + 0,009X$	52,6*
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 0,423 + 0,007X$	64,3*
<u>cv "Sempre Verde"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 0,287 + 0,006X$	94,3**
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 0,287 + 0,015X$	98,1**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo - cv "Garôto"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 0,537 + 0,004X$	36,3
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 0,537 - 0,002X$	52,5*
<u>cv "Sempre Verde"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 0,507 - 0,010X$	56,3*
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 0,507 - 0,002X$	84,6**
<u>N-TOTAL NA PLANTA INTEIRA</u>		
<u>Podzol Hidromórfico - cv "Garôto"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 94,847 + 4,450X - 0,019X^2$	95,4**
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 94,847 + 2,725X - 0,005X^2$	97,4**
<u>cv - "Sempre Verde"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 101,853 + 7,942X - 0,051X^2$	96,1**
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 101,853 + 5,595X - 0,035X^2$	97,7**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo - cv "Garôto"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 108,467 + 2,253X + 0,003X^2$	99,0**
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 108,467 + 4,618X - 0,013X^2$	98,9**
<u>cv "Sempre Verde"</u>		
$N-NH_4^+$	$= 133,933 + 1,694X + 0,005X^2$	97,6**
$N-NH_4^+NO_3^-$	$= 133,933 + 5,582X - 0,030X^2$	92,5**

Tabela 17. Nitrogênio total e nitrogênio protéico nas folhas das cultivares "Garoto" e "Sempre Verde", em função das fontes e níveis de nitrogênio (ppm) e inoculação com *Rhizobium*.

Tratamentos	% nas folhas			
	N-total % p.m.s.	N-proteico % p.m.s.	N-livre % p.m.s.	N-livre em relação ao N-total(%)
<u>Sulfato de amônio-¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>				
0	1,56	0,87	0,70	44,2
25	1,51	0,94	0,57	37,8
100	2,90	1,85	1,05	36,2
<u>Nitrato de amônio-¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>				
0	1,56	0,87	0,70	44,2
25	2,01	1,10	0,91	50,3
100	2,84	1,52	1,32	46,5

p.m.s. = peso da matéria seca.

Tabela 18. Análise de variância parcial para o fracionamento do nitrogênio e teor de açúcar nas folhas.

Fonte de Variação	G.L.	$\frac{a}{N-NO_3^-}$	$\frac{a}{N-NH_4^+}$	$\frac{a}{N-amino}$	$\frac{b}{N-prot.}$	$\frac{a}{Açúcar}$
Solos	1	NS	*	NS	**	**
Cultivares	1	**	*	NS	NS	**
Tratamentos	5	**	**	**	**	**
Solos X Cult.	1	**	NS	**	NS	**
Solos X Trat.	5	**	**	**	**	**
Cult. X Trat.	5	**	NS	**	**	**
Solos X Cult. X Trat.	5	**	**	**	**	**
C.V. (%)						

$\frac{a}{}$ moles/g.m.f.

$\frac{b}{}$ porcentagem.

NS - Não significativo.

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade..

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 19. Efeito da inoculação, fontes e níveis de nitrogênio no peso da matéria seca das folhas e da planta inteira, nas cultivares "Garoto" e "Sempre Verde", no Podzol Hidromórfico e no Podzólico Vermelho Amarelo.

Inoculação e Nitrogênio Aplicado (ppm)	Podzol Hidromórfico				Podzólico Vern. Amar.			
	Garoto		S. Verde		Garoto		S. Verde	
	Folha	P.Int.	Folha	P.Int.	Folha	P.Int.	Folha	P.Int.
<u>Sulfato de amônio-¹⁵N e inoculação</u>								
25	4,23	12,27	6,33	16,77	7,30	17,37	6,90	15,43
100	6,66	17,70	6,50	13,90	9,67	21,13	9,73	21,00
<u>Nitrato de amônio-¹⁵N e inoculação</u>								
25	4,10	10,83	6,20	14,27	6,07	11,77	7,17	18,73
100	7,37	17,57	11,17	18,87	9,70	15,93	10,03	20,83
<u>Inoculação</u>	3,70	7,67	3,43	7,27	6,30	13,10	6,77	15,89
<u>Sem adubo e sem inoculante</u>	3,80	7,00	3,67	7,00	5,53	11,50	6,30	14,33
dms a 5%	2,23	4,17	2,23	4,17	2,23	4,17	2,23	4,17
dms a 1%	2,57	4,80	2,57	4,80	2,57	4,80	2,57	4,80
F	**	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	10,67	9,11	10,67	9,11	10,67	9,11	10,67	9,11

Tabela 20. Equações quadráticas simples e coeficientes de determinação (R^2), entre peso de matéria fresca da planta inteira e de matéria seca das folhas (Y), e doses de nitrogênio nitrato e amoniacal aplicadas (X), nas cv "Garoto" e "Sempre Verde", no Podzol Hidromórfico e no Podzólico Vermelho Amarelo.

Equação de regressão	R^2 (%)
<u>PESO DA MATÉRIA FRESCA</u>	
<u>Podzol Hidromórfico - cv "Garoto"</u>	
$N-NH_4^+ = 7,000 + 0,302X - 0,002X^2$	97,5**
$N-NH_4^+NO_3^- = 7,000 + 0,424X - 0,003X^2$	98,2**
cv "Sempre Verde"	
$N-NH_4^+ = 7,000 + 0,593X - 0,005X^2$	95,5**
$N-NH_4^+NO_3^- = 7,000 + 0,424X - 0,003X^2$	98,2**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo - cv "Garoto"</u>	
$N-NH_4^+ = 11,500 + 0,343X - 0,002X^2$	95,7**
$N-NH_4^+NO_3^- = 11,500 + 0,006X + 0,000X^2$	88,1**
cv "Sempre Verde"	
$N-NH_4^+ = 14,333 + 0,052X + 0,000X^2$	78,6**
$N-NH_4^+NO_3^- = 14,333 + 0,259X - 0,002X^2$	87,5**
<u>PESO DA MATÉRIA SECA - FOLHAS</u>	
<u>Podzol Hidromórfico - cv "Garoto"</u>	
$N-NH_4^+ = 3,800 + 0,020X + 0,000X^2$	94,0**
$N-NH_4^+NO_3^- = 3,800 + 0,010X + 0,000X^2$	96,4**
cv "Sempre Verde"	
$N-NH_4^+ = 3,667 + 0,160X - 0,000X^2$	91,1**
$N-NH_4^+NO_3^- = 3,667 + 0,140X - 0,000X^2$	95,0**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo - cv "Garoto"</u>	
$N-NH_4^+ = 5,533 + 0,100X - 0,000X^2$	87,2**
$N-NH_4^+NO_3^- = 5,533 + 0,023X - 0,000X^2$	92,7**
cv "Sempre Verde"	
$N-NH_4^+ = 6,300 + 0,029X + 0,000X^2$	85,3**
$N-NH_4^+NO_3^- = 6,300 + 0,045X - 0,000X^2$	91,1**

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 21. Efeitos das fontes e níveis de nitrogênio (ppm) na absorção de nutrientes pelas folhas, no Podzol Hidromórfico e no Podzólico Vermelho Amarelo.

Tratamentos	Nutrientes nas folhas (total em mg/vaso)					
	Podzol Hidromórfico			Podzólico Verm. Amar.		
	N	P	S	N	P	S
<u>Sulfato de amônio</u> - ¹⁵ N						
<u>e inoculação</u>						
25	88,18	116,23	46,17	93,65	24,36	25,10
100	218,37	118,23	155,18	237,02	28,22	39,77
<u>Nitrato de amônio</u> - ¹⁵ N						
<u>e inoculação</u>						
25	92,64	121,30	57,39	145,55	23,49	19,50
100	191,33	190,81	59,51	349,23	33,78	52,38
<u>Inoculação</u>	82,68	108,57	64,28	91,59	24,93	20,91
<u>Sem inoculação e sem nitrogênio</u>	68,30	107,53	56,25	76,46	22,25	19,10
dms a 5%	27,74	26,57	31,89	27,74	26,57	31,89
dms a 1%	32,52	31,15	37,38	32,52	31,15	37,38
F	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	9,64	17,52	31,24	9,64	17,52	31,24

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 22. Análise de variância parcial para pesos da planta, nitrogênio, fósforo e enxofre acumulados nas folhas.

Fonte de Variação	G.L.	Peso			Nutriente acumulado (mg/vaso)		
		mat. seca Fls.	P. Int.	mat. fresca P. Int.	N	P	S
Solo	1	**	**	**	**	**	**
Cultivares	1	**	**	NS	**	NS	**
Tratamentos	5	**	**	**	**	**	**
Solo X Cult.	1	*	**	NS	NS	*	NS
Solo X Trat.	5	**	**	NS	**	**	**
Cult. X Trat.	5	**	**	NS	**	**	NS
Solo X Cult. X Trat.	5	**	**	NS	**	**	*
C.V. (%)		10,67	9,11	34,71	9,64	17,52	31,24

NS - não significativo

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 23. Efeitos das fontes e níveis de nitrogênio (ppm), no Teor de nitrogênio, fósforo e enxofre nas folhas provenientes do fertilizante, no Podzol Hidromórfico e no Podzólico Vermelho Amarelo.

Tratamentos	% de nutriente na folha prov. do fertilizante					
	Podzol Hidromórfico			Podzólico Verm. Amar.		
	N	P	S	N	P	S
<u>Sulfato de amonio-¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>						
25	32,25	55,81	11,36	12,55	54,43	9,75
100	50,42	57,78	9,95	39,53	48,23	14,49
<u>Nitrato de amonio-¹⁵N</u> <u>e inoculação</u>						
25	20,70	61,29	9,59	10,10	37,79	12,21
100	44,08	53,98	10,96	28,17	50,98	7,22
<u>Inoculação</u>	-	57,76	9,22	-	42,30	10,94
<u>Sem inoculação e sem nitrogênio</u>	-	60,97	9,12	-	40,81	11,67
dms a 5%	7,09	23,61	10,42	7,09	23,61	10,42
dms a 1%	8,54	27,61	12,18	8,54	27,61	12,18
F	**	NS	NS	**	NS	NS
C.V. (%)	12,70	23,00	49,91	12,70	23,00	49,91

NS = não significativo

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 24. Análise de variância parcial para percentagem de nitrogênio, fósforo e enxofre na folha proveniente do fertilizante.

Fonte de Variação	G.L.	Nutriente na folha proveniente do fertilizante		
		Nitrogênio	Fósforo	Enxofre
Solo	1	**	**	NS
Cultivar	1	NS	*	*
Tratamento	5	**	NS	NS
Solo X Cult.	1	NS	NS	NS
Solo X Trat.	5	*	NS	NS
Cult. X Trat.	5	**	NS	NS
Solo X Cult. X Trat.	5	**	NS	NS
C.V. (%)				

NS - não significativo

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 25. Efeitos da calagem e equilíbrio fósforo-enxofre na matéria seca (g) da parte aérea e nitrogênio absorvido, no Latossol Vermelho Amarelo e no Podzólico Vermelho Amarelo.

(ppm)		Latossol Verm. Amar.				Podzólico Verm. Amar.			
		Mat. Seca		N Total		Mat. Seca		N Total	
		P	S	Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁
50	- 30	3,9	6,3	189,9	218,6	4,4	4,3	176,6	143,8
100	- 30	5,4	7,4	198,1	261,3	5,9	5,9	184,6	148,4
200	- 30	6,9	8,1	251,9	314,7	6,8	6,9	212,4	195,2
400	- 30	6,3	6,8	258,8	257,8	5,9	5,7	169,6	170,8
50	- 60	4,8	5,8	205,9	194,6	4,6	4,6	167,1	150,5
100	- 60	5,5	8,9	235,8	269,1	5,7	5,0	189,8	160,7
200	- 60	7,4	9,0	230,7	284,1	6,6	5,6	216,6	159,1
400	- 60	6,8	8,0	222,1	257,0	6,3	5,8	207,2	186,4
dms a 5%		0,59		46,34		0,59		46,34	
dms a 1%		0,70		54,77		0,70		54,77	
C.V.(%)		7,50		17,86		7,50		17,86	

Tabela 26. Efeitos da calagem e equilíbrios fósforo-enxofre no fósforo e enxofre absorvidos no Latossol Vermelho Amarelo e no Podzólico Vermelho Amarelo.

(ppm)		Latossol Verm. Amar.				Podzólico Verm. Amar.			
		P Total		S Total		P Total		S Total	
		Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁
P	S								
50	- 30	12,45	15,14	16,78	20,11	11,06	11,33	13,47	13,41
100	- 30	22,94	29,67	30,78	31,15	18,43	18,01	19,07	21,39
200	- 30	37,57	44,93	39,59	38,71	26,93	27,31	27,77	27,50
400	- 30	50,17	41,11	34,57	33,44	29,86	29,99	26,55	25,03
50	- 60	13,98	16,70	22,45	21,67	11,84	10,64	15,10	14,64
100	- 60	23,59	34,55	28,71	37,93	19,49	16,89	20,75	20,76
200	- 60	38,82	40,21	44,77	49,08	25,62	22,38	31,03	25,05
400	- 60	52,86	46,84	46,25	41,19	32,77	29,54	26,81	23,93
dms a 5%		4,54		8,22		4,54		8,22	
dms a 1%		5,37		9,71		5,37		9,71	
C.V. (%)		13,16		23,11		13,16		23,11	

Tabela 27. Efeitos da calagem e equilíbrio fósforo-enxofre nas percentagens de fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante, no Latossol Vermelho Amarelo e no Podzólico Vermelho Amarelo.

(ppm)		Latossol Verm. Amar.				Podzólico Verm. Amar.			
		% PPPF		% SPPF		% PPPF		% SPPF	
		Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁	Ca ₀	Ca ₁
P	S								
50 - 30		62,96	66,60	29,26	25,71	46,49	42,54	25,41	21,80
100 - 30		67,40	71,73	26,14	22,96	56,59	59,75	26,11	20,75
200 - 30		93,48	93,57	27,38	29,97	81,77	77,56	23,12	21,89
400 - 30		90,78	90,01	35,84	24,33	93,58	84,68	22,93	22,76
50 - 60		66,09	59,87	44,00	39,55	45,43	46,09	34,31	34,49
100 - 60		72,29	68,21	48,16	45,71	53,05	55,32	36,56	35,26
200 - 60		97,29	97,18	45,55	38,74	76,70	72,65	31,83	36,11
400 - 60		93,61	93,39	52,45	45,47	85,27	91,71	50,23	41,85
dms a 5%		16,38		11,46		16,38		11,46	
dms a 1%		19,36		13,54		19,36		13,54	
C.V.(%)		17,65		26,87		17,65		26,87	

Tabela 28. Equação de regressão quadrática entre o peso de matéria seca da parte aérea e nitrogênio absorvidos (Y) com as doses de fósforo aplicadas (P).

Equação de regressão	R^2 (%)
<u>MATÉRIA SECA - Latossol Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = $1,515 + 0,045P$	97,20**
Com calagem = $2,312 + 0,058P - 0,002P^2$	77,00**
Dose 1 de enxofre = $3,806 + 0,031P$	74,90**
Dose 2 de enxofre = $3,972 + 0,036P$	79,80**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = $2,669 + 0,036P$	89,00**
Com calagem = $2,617 + 0,038P$	88,90**
Dose 1 de enxofre = $3,056 + 0,036P$	72,50**
Dose 2 de enxofre = $3,833 + 0,018P$	77,40**
<u>NITROGÊNIO TOTAL - Latossol Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = $75,111 + 1,927P$	92,50**
Com calagem = $89,753 + 2,109P - 0,004P^2$	81,30**
Dose 1 de enxofre = $145,200 + 1,020P$	68,20**
Dose 2 de enxofre = $156,561 + 0,960P - 0,002P^2$	82,40**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = $109,246 + 0,897P$	79,20**
Com calagem = $109,226 + 0,589P - 0,001P^2$	77,60**
Dose 1 de enxofre = $105,033 + 0,788P - 0,002P^2$	70,50**
Dose 2 de enxofre = $128,006 + 0,556P - 0,001P^2$	59,10**
* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade	
** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.	

Tabela 29. Análise de regressão entre o fósforo e enxofre acumulados (Y) e as doses de fósforo aplicadas (P).

Equação de regressão	R ² (%)
<u>Fósforo Acumulado</u> ^{1/} - <u>Latossol Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = 1,494 + 0,245P	99,10**
Com calagem = 2,210 + 0,330P	88,90**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = 4,251 + 0,160P	95,80**
Com calagem = 4,172 + 0,147P	92,80**
<u>Enxofre Acumulado</u> ^{1/} - <u>Latossol Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = 4,291 + 0,294P	97,20**
Com calagem = 8,467 + 0,256P	83,70**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo</u>	
Sem calagem = 6,190 + 0,161P	88,90**
Com calagem = 6,375 + 0,170P	93,10**

^{1/} Fósforo e enxofre acumulados, expressos em mg/vaso.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 30. Correlações entre N total, P total e S total** e matéria seca ^{1/} da parte aérea.

Equações de regressão		R ² (%)
<u>Solo X Calagem X Dose de fósforo</u>		
N ^{2/}	= 182,974 - 28,148N + 4,904N ²	85,2**
P ^{2/}	= -69,981 + 23,802P - 1,264P ²	63,5**
S ^{2/}	= -25,709 + 10,672S - 0,312S ²	74,1**
<u>Solo X Dose de enxofre X Dose de fósforo</u>		
N	= 173,623 - 25,364N + 4,745N ²	79,7**
P	= -62,552 + 19,857P - 0,840P ²	71,1**
S	= - 0,222 + 0,309S + 0,668S ²	91,6**
<u>Calagem X Dose de enxofre X Dose de fósforo</u>		
N	= 162,267 - 13,935N + 3,250N ²	87,6**
P	= -80,425 + 27,892P - 1,659P ²	61,5**
S	= -24,666 + 10,402S - 0,300S ²	80,0**

^{1/} matéria seca da parte aérea (g/vaso).

^{2/} nitrogênio, fósforo e enxofre acumulados na parte aérea, expressos em mg/vaso.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 31. Correlações entre P total, S total e Matéria Seca com a percentagem de fósforo na planta proveniente do fertilizante.

Equação de regressão quadrática		R ² (%)
<u>Solo X Calagem X Dose de fósforo</u>		
$P_{1/}$	$= 7,587 - 0,174P + 0,006P^2$	81,7**
$S_{1/}$	$= 6,150 + 3,301S - 0,030S^2$	82,1**
$M_{2/}$	$= 72,788 + 37,375M - 2,160M^2$	56,9*
<u>Solo X Dose de enxofre X Dose de fósforo</u>		
P	$= 6,782 - 0,152P + 0,006P^2$	85,2**
S	$= 5,961 + 3,322S - 0,030S^2$	81,4**
M	$= 67,137 + 32,267M - 1,514M^2$	75,2**
<u>Calagem X Dose de enxofre X Dose de fósforo</u>		
P	$= 17,733 + 3,463P - 0,019P^2$	88,5**
S	$= 33,194 + 0,926 + 0,016S^2$	81,4**
M	$= 8,732 + 8,617M + 0,275M^2$	59,8*

$P_{1/}$ e $S_{1/}$ - Fósforo e enxofre absorvidos, expressos em mg/vaso.

$M_{2/}$ - Matéria seca da parte aérea da planta (g)

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 32. Equação de regressão entre percentagens de fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante (Y) e doses de fósforo aplicadas (P), em função da calagem e de doses de enxofre.

Equações de regressão		R^2 (%)
<u>PPPF% - Latossol Vermelho Amarelo</u>		
Sem calagem	= 70,613 + 0,078P	37,20
Com calagem	= 70,607 + 0,061P	33,20
Dose 1 de enxofre	= 46,690 + 0,334P	92,80**
Dose 2 de enxofre	= 41,944 + 0,399P	94,20**
<u>Podzólico Vermelho Amarelo</u>		
Sem calagem	= 28,428 + 0,340P	96,80**
Com calagem	= 30,710 + 0,299P	98,60**
Dose 1 de enxofre	= 27,211 + 0,367P	97,50**
Dose 2 de enxofre	= 31,594 + 0,279P	98,10**
<u>SPPF% - Latossol Vermelho Amarelo</u>		
Sem calagem	= 30,873 - 0,053P	42,40*
Com calagem	= 33,580 + 18,460P + 15,120P ²	19,00
Dose 1 de enxofre	= 25,948 + 0,006P	16,70
Dose 2 de enxofre	= 44,384 - 0,016P	27,80
<u>Podzólico Vermelho Amarelo</u>		
Sem calagem	= 30,497 + 20,530P + 11,690P ²	40,40*
Com calagem	= 26,740 + 17,940P + 8,800P ²	6,30
Dose 1 de enxofre	= 24,337 - 0,014P	6,20
Dose 2 de enxofre	= 37,202 - 0,046P	77,80**

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 33. Análise de variância parcial para peso de matéria seca, nitrogênio, fósforo e enxofre absorvidos e fósforo e enxofre na planta proveniente do fertilizante.

Fonte de Variação	G.L.	Mat. Seca (g / vaso)	Nutriente				
			Total	absorv.	Prov. Fert.		
			N	P	S	P	S
Solo	1	**	**	**	**	**	**
Calagem	1	**	NS	NS	NS	NS	NS
Enxofre	1	*	NS	NS	*	NS	**
Fósforo	3	**	**	**	**	**	NS
Solo X Calagem	1	**	**	*	NS	NS	NS
Solo X Enxofre	1	**	NS	NS	*	NS	NS
Solo X Fósforo	3	NS	NS	**	NS	NS	NS
Calagem X Enxofre	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Calagem X Fósforo	3	**	NS	**	NS	NS	NS
Enxofre X Fósforo	3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Solo X Cal. X Enx.	1	*	NS	NS	NS	NS	NS
Solo X Cal. X Fósf.	3	**	NS	**	NS	NS	NS
Solo X Enx. X Fósf.	3	**	NS	NS	NS	NS	NS
Cal. X Enx. X Fósf.	3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Solo X Cal. X Enx. X Fósf.	3	*	NS	NS	NS	NS	NS
C.V. (%)		7,50	17,86	13,16	23,11	17,65	26,87

NS - Não significativo

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** - Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Fig. 1. Aspecto interno dos nódulos pretos (esquerda) e normais (direita).

Fig. 2. Vasos de Leonard utilizados no experimento 1.

Fig. 3. Vasos utilizados nos experimentos com solo.

Fig. 4. Aspecto dos nódulos da cultivar "Garoto" inoculada com a estirpe 5.000 (Rothamsted).

Fig. 5 - Correlações entre o nitrogênio total da parte aérea e o peso da matéria seca dos nódulos, em quatro cultivares de Vigna unguiculata (L) Walp. (média de 3 repetições).

Fig. 6 - Influência da inoculação com *Rhizobium* e adubação nitrogenada sobre a nodulação e a atividade da nitrogenase, em *Vigna unguiculata* (L) Walp., 45 dias após o germinação.

Fig. 7 - Relação entre a atividade da nitrogenase e o peso da matéria seca dos nódulos, 45 dias após a germinação, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp. e nos solos Podzol Hidromórfico (PH) e Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 8 - Distribuição relativa do nitrogênio (N%), nas raízes, ramos e folhas de *Vigna unguiculata* (L) Walp., em função da inoculação com *Rhizobium* e da adubação nitrogenada.

Fig. 9 - Distribuição relativa do fósforo (P%), nas raízes, ramos e folhas de *Vigna unguiculata* (L) Walp., em função da inoculação com *Rhizobium* e da adubação nitrogenada.

Δ - FOLHAS
 ○ - RAMOS
 □ - RAIZES
 SA - Sulfato de amônia
 NA - Nitrato de amônio

Fig.10 - Distribuição relativa do enxofre, nas raízes, ramos e folhas de Vigna unguiculata (L) Walp., em função da inoculação com Rhizobium e da adubação nitrogenada.

Fig. 11 - Relação entre o nitrogênio nítrico acumulado nas folhas e o nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante, em duas cultivares de Vigna unguiculato (L) Walp. nos solos Podzol Hidromórfico (PH) e Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 12 - Relação entre o nitrogênio amoniacal, acumulado nas folhas e o teor de nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., nos solos Podzol Hidromórfico (PH) e Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 13 - Relação entre o nitrogênio amino acumulado nas folhas e o teor de nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 14 – Relação entre o nitrogênio protéico nos folhas e o nitrogênio na folha proveniente do fertilizante, em duas cultivares da Vigna unguiculata (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 15 - Relação entre o nitrogênio protéico e o nitrogênio amino nas folhas, em duas cultivares de Vigna unguiculata (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig.16 - Relação entre os teores de nitrogênio protéico e o nitrogênio total acumulado nas folhas, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 17- Atividade da reductase do nitroto em função do tempo na cultivar "Garôto, com os tratamentos inoculação com Rhizobium, níveis e fontes de adubação nitrogenada.

Fig. 18 - Atividade da reductase do nitrato em função do tempo na cultivar "Sempre Verde", com os tratamentos inoculação com Rhizobium, níveis e fontes de adubação nitrogenada.

Fig. 19 - Relação entre o nitrogênio amino acumulado nas folhas e a atividade da reductase do nitrato, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 20 - Relação entre o teor de nitrogênio protéico nas folhas e a atividade da reductase do nitrato, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., no Podzól Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 21- Relação entre o nitrogênio total acumulado nas folhas e a atividade da reductase do nitrato, em duas cultivares de Vigna unguiculata (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig.22 -Relação entre o nitrogênio na planta proveniente do Fertilizante e o atividade do reductase do nitrato, em duas cultivares de Vigna unguiculata (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 23- Relação entre o peso da matéria seca das folhas e a atividade da reductase do nitrato, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., no Podzól Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo. (PVA).

Fig. 24 - Relação entre o peso da matéria seca das folhas e o nitrogênio acumulado nas folhas, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 25 - Relação entre o peso da matéria seca das folhas e o teor de nitrogênio nas folhas proveniente do fertilizante, nas duas cultivares de Vigna unguiculata (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 26 - Relação entre o nitrogênio total acumulado na parte aérea e o nitrogênio na folha proveniente do fertilizante, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 27- Relação entre o nitrogênio acumulado na planta inteira e o nitrogênio nas folhas proveniente do Fertilizante, em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp, no Podzol Hidromórfico (PH) e no Podzólico Vermelho Amarelo (PVA).

Fig. 28 - Peso de matéria seca das folhas, ramos e raízes, em função da inoculação com Rhizobium e adubação nitrogenada, nas cultivares "Garoto" e "Sempre Verde".

Fig. 29 - Distribuição do nitrogênio total acumulado nas folhas, ramos e raízes de duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp., em função da inoculação com *Rhizobium* e da adubação nitrogenada.

Fig. 30 — Regressões entre o peso da matéria seca da parte aérea e níveis de fósforo adicionado aos solos, em função da calagem.

Fig. 31 - Regressões entre o peso da matéria seca da parte aérea e níveis de fósforo adicionado aos solos, em função das doses de enxofre.

Fig. 32 - Regressões entre o nitrogênio total acumulado na parte aérea e os níveis de fósforo adicionado aos solos, em função da calagem.

Fig. 33 - Regressões entre o nitrogênio total acumulado na parte aérea e os níveis de fósforo adicionado aos solos, em função das doses de enxofre.

Fig. 34 - Regressão entre o fósforo total acumulado na parte aérea e os níveis de fósforo adicionado aos solos, em função da colagem.

Fig. 35 - Regressão entre o enxofre total acumulado na parte aérea e os níveis de fósforo adicionado aos solos, em função da calagem.

Fig. 36 Regressão entre o fósforo na planta proveniente do fertilizante e os níveis de fósforo adicionado aos solos, em função da calagem.

Fig. 37 - Regressão entre o fósforo na planta proveniente do fertilizante e os níveis de fósforo adicionado aos solos, em função das doses de enxofre.