

FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.). II. INFLUÊNCIA DO MAGNÉSIO, DO BORO, DO MOLIBDÊNIO E DA CALAGEM¹

ALAIDES PUPPIN RUSCHEL²,
DIRCE PINTO PACCA DE SOUZA BRITTO³ e JOHANNA DÖBEREINER²

Sumário

O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência dos elementos, magnésio, boro e molibdênio na fixação de nitrogênio no feijão em simbiose com *Rhizobium*, em solo ácido com e sem calagem. Foram executados dois experimentos em casa de vegetação.

Com os dados obtidos concluiu-se que a calagem aumentou o número de nódulos, o peso seco e o nitrogênio total do feijoeiro. Verificou-se ainda que o magnésio somente aumentou o número de nódulos. Interessante notar que o boro influenciou na nodulação e no crescimento da planta, quando em presença da calagem. O molibdênio diminuiu o número de nódulos, aumentando no entanto o nitrogênio fixado por nódulo.

INTRODUÇÃO

Em estudos recentes, Döbereiner e Ruschel (1961) verificaram que, em nossas condições, o *Rhizobium phaseoli*, espécie de bactéria que vive em simbiose com feijão, pode fixar o nitrogênio que supre as necessidades da planta, pelo menos até a época da floração.

A necessidade de se conseguir estirpes selecionadas, que possam substituir a adubação nitrogenada no solo, levou a se fazer estudos mais apurados no sentido de se obter melhores condições para o desenvolvimento da bactéria, em simbiose com o feijão.

A eficiência de *Rhizobium* depende de uma quantidade adequada de elementos disponíveis para a planta, entre as quais destacamos o cálcio, magnésio, boro e molibdênio. Segundo Andrew e Norris (1961) o cálcio é um fator limitante da nodulação em solos ácidos, sendo entretanto certas espécies de leguminosas mais sensíveis à deficiência de cálcio do que outras. Segundo os mesmos autores o feijão é enquadrado dentro das leguminosas de clima temperado, necessitando de mais cálcio que as leguminosas de clima tropical.

Estudos recentes (Norris 1958, Ruschel *et al.* 1962) demonstram a importância do magnésio no desenvolvimento de *Rhizobium* e a conseqüente capacidade de fixação pelo mesmo. O boro é um elemento essencial para a formação dos nódulos nas leguminosas (Brenchley & Thornton 1952, Mulder 1948); segundo Brenchley e Thornton (1952) o boro é mais importante para a fixação simbiótica do nitrogênio que para a planta hospedeira. De acordo com Andrew (1962) o molibdênio é essencial em duas fases da nutrição das leguminosas, sendo uma na fixação de nitrogênio pelo *Rhizobium* no nódulo, e outra na transformação de nitratos em amônia.

Neste trabalho somente se estudou os elementos acima citados em um solo ácido, mas no futuro ampliar-se-á estes estudos na tentativa de completar as presentes conclusões.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com solo da série Ecologia, arenoso, de pH 4,5, o qual abrange 65% dos solos da área do extinto Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas.

O objetivo foi pesquisar a influência da calagem e dos elementos menores, magnésio (Mg), boro (B) e molibdênio (Mo), na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico em feijão. Este trabalho foi realizado em dois anos consecutivos e se designará de experimento n.º 1 o do primeiro ano e experimento n.º 2 o do segundo ano.

¹ Trabalho em parte subvencionado pelo Conselho Nacional de Pesquisas, constituindo o Boletim Técnico n.º 17 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

² Eng.º Agrônomo do IPEACS, Km 47, Campo Grande, Rio de Janeiro.

³ Eng.º Agrônomo do IPEACS e Assistente de Ensino Superior da Escola Nacional de Agronomia da Universidade Rural do Brasil, km 47, Campo Grande, Rio de Janeiro.

O delineamento foi de blocos ao acaso com seis repetições, recebendo três repetições o carbonato de cálcio (CaCO_3) na base de 1,57 t/ha, afim de corrigir o pH do solo, no experimento n.º 1, sendo o CaCO_3 aplicado superficialmente. No experimento n.º 2, usamos 2,0 t/ha, misturados uniformemente ao solo.

Tôdas as combinações possíveis entre os três elementos em estudo foram realizadas, dando um total de oito tratamentos, distribuídos em vasos com capacidade para 4 kg de solo. Inicialmente, foi realizada a aplicação de CaCO_3 nos três blocos e após 20 dias a adubação uniforme foi executada na seguinte base: sulfato de potássio 100 kg/ha; sulfato ferroso 10 kg/ha; cloreto manganoso 9,5 kg/ha; acetato de zinco 1,5 kg/ha; sulfato de cobre 0,2 kg/ha.

Na adubação uniforme todos os produtos foram aplicados em solução, a não ser o fosfato monocálcico, que foi colocado a 5 cm abaixo da superfície do solo, a razão de 425 kg/ha.

Os tratamentos foram representados pelos produtos que se seguem, aplicados em solução: sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) 100 kg/ha; ácido bórico (H_3BO_3), 5 kg/ha; molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 5 kg/ha. No experimento n.º 2 a quantidade de ácido bórico foi de 3,7 kg/ha, pois a dose aplicada no experimento anterior demonstrou ter sido excessiva.

Após a aplicação dos tratamentos, foi feita a semeadura com oito sementes por vaso, sendo o desbaste executado 15 dias após, deixando-se apenas três plantas.

Fêz-se a inoculação com estirpes de *Rhizobium phaseoli* cultivadas em meio líquido. As sementes foram molhadas com o inoculante e secas ao ar antes do plantio.

A colheita foi feita no final da floração.

RESULTADOS

Como já foi esclarecido, realizamos dois experimentos em anos consecutivos.

Experimento n.º 1. É interessante lembrar o que foi dito em Material e Métodos, isto é, que o CaCO_3 não foi perfeitamente incorporado ao solo neste experimento, e também que a quantidade usada foi inferior a do experimento n.º 2. Provavelmente por isto não foi observado efeito da calagem neste experimento.

O Quadro 1 representa o peso seco em gramas e o número de nódulos do feijão. Os dados apresentados se referem à soma de três replicações, correspondentes a três vasos.

QUADRO 1. Influência do Magnésio, Boro e Molibdênio no peso seco das plantas e número de nódulos, no experimento n.º 1

Trat.	Peso seco (g)		N.º de nódulos	
	+ Ca	- Ca	+ Ca	- Ca
Mg.....	31,6	22,7	384	388
B.....	17,1	16,0	468	416
Mo.....	22,1	25,4	687	548
Mg B.....	18,9	21,4	776	506
Mg Mo.....	24,8	25,6	431	484
B Mo.....	26,4	29,3	613	430
Mg B Mo.....	21,3	23,8	603	497
T.....	25,3	20,3	439	481
Soma.....	187,5	193,5	4.401	3.750

O Quadro 2 representa o resultado da análise de variância de peso seco das plantas e número de nódulos, sendo estes últimos transformados em $\sqrt{X} + 0,5$.

QUADRO 2. Análise de variância do peso seco das plantas e número de nódulos

F. Variação	G. L.	Peso seco		N.º de nódulos	
		Q. M.	E	Q. M.	E
Trat. (7)					
Mg.....	1	0,01	- 0,8	4,8641	+ 15,28
B.....	1	22,14 ^a	- 32,5	30,2269 ^a	+ 41,70
Mo.....	1	5,80	+ 16,4	4,7502	+ 15,10
Mg × B.....	1	0,75	- 6,0	22,7425 ^a	+ 33,04
Mg × Mo.....	1	4,44	- 14,6	0,2883	+ 3,72
B × Mo.....	1	30,72 ^a	+ 38,4	0,0310	- 1,22
Mg × B × Mo.....	1	9,19	+ 21,0	4,4896	- 14,68
Cal.....	1	0,75		0,2320	
Cal. × Blocos.....	4	1,70		49,1262	
Trat. × Cal.....	7	2,96		4,7073	
Resíduo.....	28	4,81		5,3287	

^a Significativos ao nível de 5%. E = efeitos ou contrastes.

No Quadro 2, pode ser observado que a aplicação do boro junto ao molibdênio aumentou o peso seco, enquanto que o boro aplicado isoladamente prejudicou o desenvolvimento do feijão. Já o número de nódulos foi aumentado pelo boro, especialmente na presença do magnésio.

Experimento n.º 2. Neste segundo experimento, como já foi citado em Material e Métodos, a quantidade de CaCO_3 foi maior que no experimento anterior, sendo o calcário misturado uniformemente ao solo. A seguir, no Quadro 3, são apresentadas as somas das três replicações dos dados de peso seco das plantas em gramas e número de nódulos no experimento 2, em solo com e sem calagem.

QUADRO 3. Influência do Magnésio, Boro e Molibdênio no peso seco das plantas e número de nódulos, no experimento n.º 2

Trat.	Peso seco (g)		N.º nódulos	
	+ Ca	- Ca	+ Ca	- Ca
Mg.....	17,55	11,88	1.150	868
B.....	29,71	11,71	1.110	60
Mo.....	17,64	6,04	830	102
Mg B.....	37,47	10,88	1.618	223
Mg Mo.....	13,70	10,28	1.127	103
B Mo.....	31,66	5,78	1.292	82
Mg B Mo.....	29,87	7,00	1.118	121
T.....	13,61	5,99	600	48
Soma.....	191,21	69,36	8.845	1.607

No Quadro 4 acham-se representados os dados referentes à soma do nitrogênio total nas plantas (mg) e nitrogênio percentual das três replicações, em solos com e sem calagem.

QUADRO 4. Influência do Magnésio, Boro e Molibdênio na quantidade de Nitrogênio fixado, total e percentual, no experimento n.º 2

Trat.	N Total (mg)		N%	
	+ Ca	- Ca	+ Ca	- Ca
Mg.....	208	125	2,80	3,19
B.....	394	150	3,93	3,70
Mo.....	178	57	3,09	2,91
Mg B.....	573	87	4,60	3,05
Mg Mo.....	159	107	3,25	3,06
B Mo.....	430	69	4,07	3,77
Mg B Mo.....	463	53	4,64	2,95
T.....	152	59	3,31	3,06
Soma.....	2.557	707	29,69	25,69

No Quadro 5 apresenta-se a análise de variância do peso seco, número de nódulos, nitrogênio total e nitrogênio percentual dos dados do experimento n.º 2. Os números de nódulos foram transformados em $\sqrt{X} + 0,5$, e o nitrogênio percentual em $\text{ângulo} = \text{sen arc } \sqrt{\text{percentagem}}$.

Neste experimento notou-se efeito altamente significativo da calagem, aumentando o peso seco, número de nódulos e nitrogênio total, nos diferentes tratamentos. Peso seco, nitrogênio total e percentual foram ainda aumentados significativamente pelo boro. A significância de boro em presença de calagem indica, no presente caso, que a relação ideal cálcio/boro foi encontrada para a fixação do nitrogênio.

Nota-se ainda que o magnésio aumentou significativamente o número de nódulos. O molibdênio diminuiu o número de nódulos, especialmente na presença do magnésio.

DISCUSSÃO

Segundo Schmehl *et al.* (1950) os efeitos da acidez do solo sobre a nutrição das leguminosas

podem ser atribuídos a deficiência de cálcio e molibdênio e ao excesso de manganês e alumínio.

O efeito da calagem nos presentes experimentos deve ser observado sob dois aspectos, sendo um a elevação do pH do solo⁴ e outro o fornecimento de cálcio como nutriente, uma vez que se usou um solo extremamente arenoso e deficiente em cálcio.

Ao lado do efeito do cálcio e do pH no crescimento da planta, deve ser notado seu papel no desenvolvimento do *Rhizobium*, assim como na formação dos nódulos e conseqüentemente na eficiência da simbiose *Rhizobium*-Feijão. Observou-se em trabalho anterior (Ruschel *et al.* 1962) que o desenvolvimento do *Rhizobium phaseoli* em meio de cultura não é prejudicado pelo aumento da concentração de ions H⁺ até um pH 5,5. Concentrações de 0,6 mE de cálcio/litro foram suficientes para o bom desenvolvimento da bactéria.

O processo da formação de nódulos, no entanto, segundo Andrew e Norris (1961) necessita de cálcio, provavelmente, agindo sobre as células meristemáticas dos nódulos. Os resultados do Quadro 3 mostram realmente que o número de nódulos foi aumentado mais do que cinco vezes pela calagem, enquanto o peso seco da planta somente foi duplicado.

No Quadro 5 pode-se observar que somente houve efeito significativo do magnésio sobre o número de nódulos. Norris (1959) observou que o magnésio é um elemento essencial na nutrição de *Rhizobium*, sendo o cálcio necessário somente em pequenas quantidades. Em trabalho anterior (Ruschel *et al.* 1962) confirmamos esta observação no caso do *Rhizobium phaseoli*. Possivelmente, no presente experimento, o aumento do número de nódulos pelo magné-

⁴ Estudos posteriores demonstram que o solo usado nos presentes experimentos (solo Ecologia) mostra toxidez de manganês a qual é eliminada com calagem.

QUADRO 5. Análise de variância dos dados do experimento n.º 2

F. Variação	G. L.	Quadrado médio							
		Peso seco	E	N.º de nódulos	E	N/Total	E	N%	E
Tratamentos (7)									
Mg.....	1	5,5284	+ 16,29	130,6470 ^b	+ 79,19	1.704	+ 286	0,4466	- 4,63
B.....	1	95,1752 ^d	+ 67,59	3,3973	+ 12,77	28.714 ^d	+ 1.174	61,3138 ^c	+ 54,25
Mo.....	1	5,7816	- 16,63	14,7076	- 26,57	1.121	- 232	0,1271	+ 2,47
Mg X B.....	1	0,2655	- 3,57	31,0891	- 35,63	8	- 20	0,0150	- 0,85
Mg X Mo.....	1	5,0010	- 16,83	103,4000 ^b	- 70,45	752	- 190	0,6098	+ 5,41
B X Mo.....	1	4,2542	- 14,29	0,1036	- 2,23	444	- 146	0,0001	- 0,07
Mg X B X Mo.....	1	0,0698	+ 1,83	2,8470	+ 11,69	1	- 8	1,8448	- 9,41
Blocos (3).....									
Cal.....	1	309,3213 ^d		1967,2314 ^d		71.302 ^c		24,5531	
Cal. X Blocos.....	4	5,8246		44,6853		1.526		6,2643	
Trat. X Cal. (7) *.....									
Resíduo.....	28	6,6046		17,5462		1.545		5,0187	

* Não foram apresentados os quadrados médios da interação Trat. X Cal, porque o estudo desta interação foi feita com os graus de liberdade desde blocos, verificando influência somente do Boro em presença da Cal em todos os itens estudados.

E Efeitos ou contrastes.
 b Significância ao nível de 5%.
 c Significância ao nível de 1%.
 d Significância ao nível de 0,1%.

sio pode ser atribuído à multiplicação do *Rhizobium* na rizosfera do feijão.

Segundo Jones e Scarseth (1944) a relação cálcio/boro é mais importante na nutrição das plantas do que valores absolutos de ambos os elementos. Em solos deficientes de cálcio, pequenas quantidades de boro, podem causar toxidez. Calagem excessiva por outro lado, pode no mesmo solo causar deficiência de boro. No primeiro experimento observou-se que o boro prejudicou o crescimento do feijão. Como este solo é extremamente deficiente de cálcio a aplicação de uma dose relativamente pequena de boro deslocou o equilíbrio cálcio/boro prejudicando assim o crescimento da planta. O número de nódulos, no entanto, foi aumentado significativamente nos tratamentos com boro. Isto indica que o processo da formação dos nódulos necessita de mais boro que a própria planta, o que está de acordo com as observações de Brenchley e Thornton (1952) mas contrário as observações de Mulder (1948). Já no segundo experimento, em virtude da calagem mais elevada, observou-se deficiência de boro e conseqüentemente a adição deste elemento aumentou não só a nodulação e a fixação de nitrogênio, como também, o próprio crescimento da planta.

O molibdênio é elemento essencial para o processo da fixação de nitrogênio nos nódulos (Anderson 1958, Anderson & Moye 1952, Anderson & Ortel 1946). É provável que o molibdênio seja necessário para a formação da hemoglobina nos nódulos (Hewitt 1958). O mesmo autor conclui que a adição de molibdênio ao aumentar o nitrogênio fixado por unidade de nódulo diminuiu o número de nódulos. Anderson e Spencer (1950) fizeram observações semelhantes. Confirmando estas observações, no experimento n.º 1, o molibdênio especialmente na presença do boro, aumentou o crescimento da planta, sem afetar o número de nódulos. Observou-se ainda uma diminuição do número de nódulos pelo molibdênio no experimento n.º 2, especialmente na presença do magnésio.

CONCLUSÕES

Pelo exposto nos itens anteriores e de acordo com os resultados obtidos pela interpretação estatística chegou-se as seguintes conclusões:

1. Notou-se efeito pronunciado da calagem, aumentando mais o número de nódulos do que o peso e nitrogênio total do feijoeiro.

2. Efeito do magnésio somente foi observado na elevação do número de nódulos.

3. O efeito do boro dependia de sua concentração e da quantidade de cálcio disponível no solo.

No primeiro experimento, com calagem deficiente, 5kg/ha de ácido bórico ($H_3 + BO_3$) prejudicaram o crescimento da planta. Já no segundo experimento 3,75 kg/ha, com calagem de 2 t/ha, aumentaram tanto o crescimento da planta como a fixação de nitrogênio. Nota-se que maior quantidade de boro foi necessária para a nodulação do que para o crescimento da planta.

4. O molibdênio diminuiu o número de nódulos, aumentando no entanto, o nitrogênio fixado por nódulo.

REFERÊNCIAS

- Anderson, A. J. 1956. Molybdenum deficiencies in legumes in Australia. *Soil Sci.* 81:173-182.
- Anderson, A. J. & Moye, D. V. 1952. Lime and molybdenum in clover development on acid soils. *Aust. J. Agric. Res.* 3:95-110.
- Anderson, A. J. & Ortel, A. C. 1946. Factors affecting the responses of plants to molybdenum. *Bull. Coun. Sci. Industr. Res. Aust.* 198.
- Anderson, A. J. & Spencer, D. 1950. Molybdenum in nitrogen metabolism of legumes and non-legumes. *Aust. J. Sci. Res. (B)* 3:414-430.
- Andrew, C. S. 1962. Influence of nutrition on nitrogen fixation and nutrition of legumes. In: C. S. I. R. O. (ed.) *A review of nitrogen in the tropics with particular reference to pastures*. A symposium Commonwealth Agr. Bureaux.
- Andrew, C. S. & Norris, D. O. 1961. Comparative responses to calcium of five tropical and four temperate pasture legumes species. *Aust. J. Agric. Res.* 12:40-50.
- Brenchley, W. E. & Thornton, H. G. 1952. *Proc. Roy. Soc. (B)* 98:373. In: Hewitt, E. J. 1958. Some aspects of mineral nutrition of legumes. In: Hallsworth, E. G. (ed.). *Nutrition of legumes*. Academic Press Inc., Publishers, New York.
- Döbereiner, J. & Ruschel, A. P. 1961. Fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico em feijão. I. Influência do solo e da variedade. Comunicado Técnico n.º 10. Inst. Ec. Exp. Agr., M. A., Rio de Janeiro, Brasil.
- Hewitt, E. J. 1958. Some aspects of mineral nutrition of the legumes. In: Hallsworth, E. G. (ed.). *Nutrition of the legumes*. Academic Press Inc., Publishers, New York.
- Jones, H. E. & Scarseth, G. D. 1944. The calcium-boron balance in plants as related to boron needs. *Soil Sci.* 57:15-24.
- Mulder, E. G. 1948. Investigation on the nitrogen nutrition of pea-plants. *Plant and Soil* 1:179-212.
- Norris, D. O. 1958. *Rhizobium* needs magnesium, not calcium. *Nature* 182:734-735.
- Norris, D. O. 1959. The role of calcium and magnesium in the nutrition of *Rhizobium*. *Aust. J. Agric. Res.* 10: 651-698.
- Ruschel, A. P. et al. 1962. Influência do cálcio, do magnésio e da acidez sobre o *Rhizobium phaseoli* em meio de cultura. Comunicado técnico n.º 16. Inst. Ec. Exp. Agr., M. A., Rio de Janeiro.
- Schmehl, W. R. et al. 1950. Causes of poor growth of plants in acid soils and beneficial affects of liming. *Soil Sci.* 70:393-410.

EFFECTS OF MAGNESIUM, BORON AND MOLYBDENUM ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION OF BEANS (*Phaseolus vulgaris*, L.)*Abstract*

In the present paper, effects of magnesium, boron and molybdenum on symbiotic nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris*), were studied in acid soil, with and without liming. Two greenhouse experiments were carried out in randomised complete blocks, the following conclusions were drawn:

1. There was a pronounced effect of liming which increased nodule numbers more than plant growth.
2. Magnesium increased nodule numbers only.
3. Boron effects were dependent on the calcium applications. In the first experiment, where lime was not applied adequately, 5 kg/ha of H_3BO_3 reduced plant growth. In the second experiment 3,75 kg/ha of H_3BO_3 increased nitrogen fixation and plant growth, but in the limed treatments only. More boron was necessary for optimal nodulation than for plant growth.
4. Molybdenum decreased nodule numbers, increasing at the same time the amount of nitrogen fixed per nodule.