

AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO, EM LEGUMINOSAS, PELA REGRESSÃO DO NITROGÊNIO TOTAL DAS PLANTAS SOBRE O PÊSO DOS NÓDULOS¹

JOHANNA DÖBEREINER², NORMA BERGALLO DE ARRUDA³ e ALBERTO DE FIGUEIREDO PENTEADO⁴

Sumário

Em seis experimentos em casa de vegetação e dois no campo com soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e *Centrosema pubescens* foram encontradas regressões significativas do logaritmo do N total das plantas sobre o peso dos nódulos. Partindo destas regressões foi possível avaliar o nitrogênio proveniente do solo e das sementes (ordenada *a* da equação de regressão onde a mesma corta o eixo Y) e a quantidade de nitrogênio fixado por unidade de tecido nodular (coeficiente de regressão *b*). O logaritmo do N fixado para cada peso de nódulos é, então: $NF = bX$.

O coeficiente de regressão foi bastante constante para cada espécie de planta e não foi influenciado por numerosos fatores como: calagens, adubações com elementos maiores exceto o N e menores, níveis de pH, temperaturas do solo, variedades de plantas e a maioria de estirpes de *Rhizobium*. Apenas uma estirpe ineficiente e a adubação com nitrogênio mineral alteraram o coeficiente de regressão. Conclui-se que a maioria dos fatores que agem sobre a fixação do N nas leguminosas, afetam o número e o tamanho dos nódulos, mas não a quantidade de N fixado por unidade de tecido nodular.

INTRODUÇÃO

As interrelações entre nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, nas leguminosas, continuam muito discutidas. É conceito, geralmente aceito, que não há correlação entre o número de nódulos e a fixação de nitrogênio, mas a existência de nódulos grandes, situados nas raízes primárias é uma boa indicação de uma simbiose eficiente. Burton *et al.* (1952) observaram, no entanto, que esta posição dos nódulos é devida à inoculação das sementes e que plantas de feijão, com nodulação natural, espalhada por todo o sistema radicular, podem ser tão eficientes, na simbiose com *Rhizobium*, como plantas inoculadas. Lange e Parker (1960) estudaram os efeitos que influenciam a posição dos nódulos e acharam diferenças significativas entre variedades de plantas, mas não entre estirpes de *Rhizobium*. A cor e o tamanho dos nódulos foram considerados bons índices de uma simbiose eficiente (Burton *et al.* 1952). Virtanen *et al.* (1947) e Graham e Parker (1961) observaram uma correlação entre o teor de hemoglobina dos nódulos e a fixação do nitrogênio.

Pouca atenção, entretanto, tem sido prestada ao único índice, logicamente responsável pela quantidade de nitrogênio fixado, isto é, o volume de tecido nodular. Já em 1940, Chen e Thornton sugeriram, baseados em estudos histológicos do tecido nodular de estirpes de *Rhizobium* eficientes e ineficientes, que as diferenças entre estirpes em relação à sua eficiência devem ser atribuídas às diferenças quantitativas do tecido nodular em função. Bowen (1959) encontrou uma regressão significativa do peso seco de *Centrosema pubescens*, inoculada com 17 estirpes diferentes de *Rhizobium*, sobre o peso total dos nódulos e sugeriu que as diferenças na eficiência de estirpes sejam principalmente, atribuídas às quantidades diferentes de nódulos produzidos por cada estirpe.

No presente trabalho, pretende-se demonstrar que o nitrogênio fixado, na maioria dos casos, está na dependência do tecido nodular formado. Encontrou-se, em uma série de experimentos em casa de

¹ Este trabalho foi apresentado ao II Congresso Latino-Americano e X Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, julho de 1965, e constitui o Boletim Técnico n.º 23 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS). Trabalho parcialmente financiado pela Aliança para o Progresso - Projeto de Pesquisas - Ministério da Agricultura (Departamento de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias) e USAID - Brasil (Instituto de Pesquisas IRI).

² Eng.º Agrônomo do IPEACS e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

³ Eng.º Agrônomo do IPEACS, Km 47, Campo Grande, Rio de Janeiro.

⁴ Chefe da Seção de Estatística Experimental do Departamento de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias, Caixa Postal 1620, Rio de Janeiro.

vegetação e no campo, uma regressão significativa entre o logaritmo do nitrogênio total da planta e o peso dos nódulos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados seis experimentos em casa de vegetação e dois no campo, com as mais diversas finalidades. No presente trabalho, aproveitaram-se apenas os dados referentes ao peso dos nódulos e ao peso seco e teor de nitrogênio das plantas.

Em todos estes experimentos, o peso dos nódulos foi determinado da seguinte maneira: no início da floração, as plantas foram retiradas do solo com torção, de modo que o sistema radicular ficasse inteiro; em seguida foram lavadas com cuidado de modo a não haver perda de nódulos. Retiraram-se, então, todos os nódulos que foram secos a 65°C e pesados, depois de rigorosamente removidas as partículas de raiz e terra.

As plantas, sem os nódulos, foram secas a 65°C, pesadas e moídas. Determinou-se o seu teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl, usando HgO ou CuSO₄ como catalisador.

Foram os seguintes, os experimentos acima mencionados:

Experimento 1: efeito do revestimento calcáreo da semente de soja ("Lime pelleting") na fixação simbiótica do nitrogênio, em solo da série Ecologia. Foi feito, em casa de vegetação, um experimento fatorial 2 x 2 x 3 com 3 repetições, usando-se os seguintes tratamentos: 2 variedades de soja, 2 estirpes de *Rhizobium* e 3 tratamentos calcáreos (revestimento calcáreo da semente, calcáreo misturado ao solo e testemunha). Foi usado solo da série Ecologia ("gray hidromórfico" muito arenoso, com pH 5 e apresentando toxidez de manganês) misturado com 1% de palha de arroz. Todos os vasos foram adubados uniformemente com P, K, Mg e elementos menores.

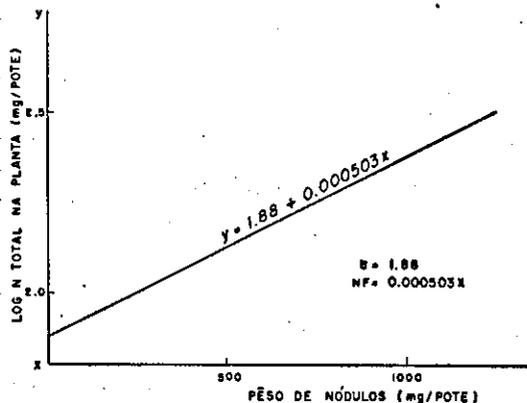


FIG. 1. Linha de regressão referente ao experimento n.º 1. $a = \log N$ absorvido das sementes e do solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão b altamente significativo.

Experimento 2: comparação de estirpes de *Rhizobium japonicum* com e sem calagem. Trata-se de um experimento realizado, em casa de vegetação, em blocos ao acaso, usando-se os 18 tratamentos seguintes: 7 estirpes de *Rhizobium japonicum* e 2 testemunhas (com e sem nitrogênio) com e sem calagem. Os resultados dos tratamentos com nitrogênio não foram incluídos neste trabalho. O solo e a adubação foram iguais aos do experimento 1.

Experimento 3: competição de variedades de soja. Neste experimento, realizado no campo, foram competidas 13 variedades, usando-se um delineamento em blocos incompletos balanceados em que $t = 13$, $r = 6$, $b = 26$, $k = 3$ e $\lambda = 1$. O solo em que foi instalado este ensaio é da série Itaguaí, tendo sido feita uma calagem para corrigir o pH para 5,5 e uma adubação geral P, K. As sementes foram todas inoculadas.

Experimento 4: Ensaio Nacional de Soja, Projeto de Pesquisa IRI n.º 58. Foi instalado, em Pinheiral, um experimento de competição de 25 variedades usando-se um delineamento em reticulado tri-

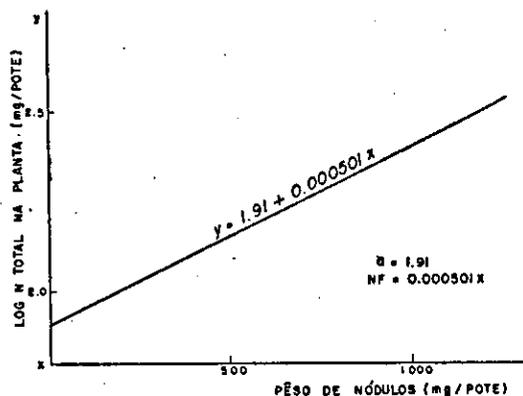


FIG. 2. Linha de regressão referente ao experimento n.º 2. $a = \log N$ absorvido das sementes e do solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão b altamente significativo.

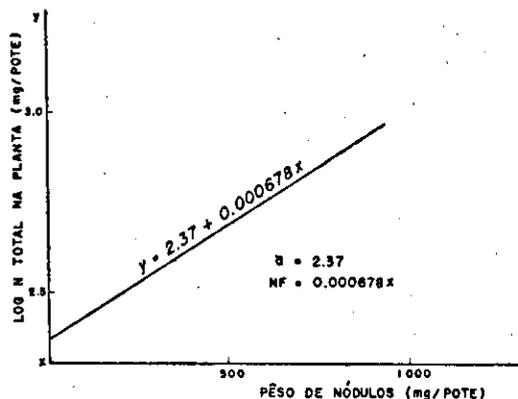


FIG. 3. Linha de regressão referente ao experimento n.º 3. $a = \log N$ absorvido das sementes e solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão b significativo.

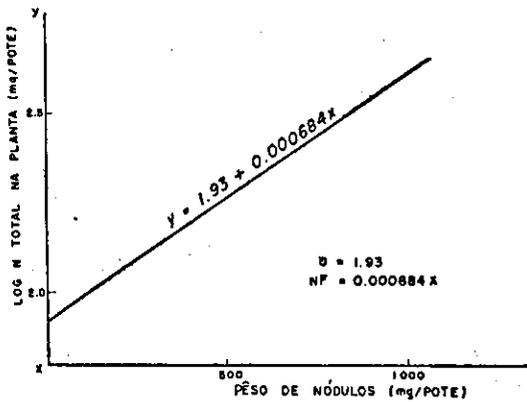


FIG. 4. Linha de regressão referente ao experimento n.º 4. $a = \log N$ absorvido das sementes e solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão b altamente significativo.

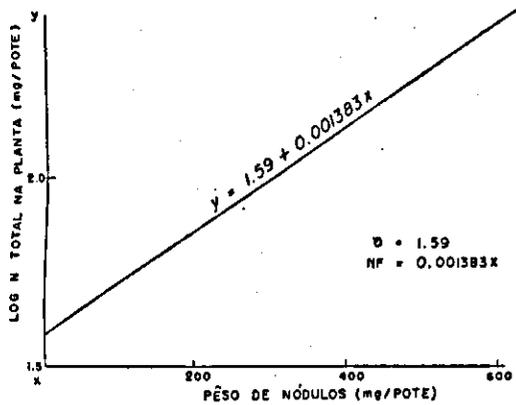


FIG. 5. Linha de regressão referente ao experimento n.º 5. $a = \log N$ absorvido das sementes e do solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão b altamente significativo.

plice. O solo em que foi montado este ensaio é argiloso e de aluvião com pH 5,6. Foi feita uma adubação geral com P, K, Zn e Mo. As sementes foram inoculadas com o inoculante da Leivas Leite.

Experimento 5: efeito da matéria orgânica e da inoculação com bactérias oxidantes de manganês na fixação simbiótica do nitrogênio em feijão, em solo com toxidez de manganês. Foi instalado, em casa de vegetação, um experimento fatorial $3 \times 2 \times 2$, com 3 repetições. Os tratamentos foram: 0,1% e 3% de palha cortada, com e sem inoculação de bactérias oxidantes de manganês e, com e sem revestimento calcáreo das sementes. Todos os tratamentos foram uniformemente inoculados com *Rhizobium phaseoli*. O solo e a adubação foram iguais aos do experimento 1.

Experimento 6: competição de estirpes de *Rhizobium phaseoli* com e sem calagem, em solo com toxidez de manganês. Neste experimento, repetimos com o feijão (*Phaseolus vulgaris*) todos os tratamentos descritos no experimento 2 para a soja.

Experimento 7: efeito da diluição, com areia, do solo da série Ecologia sobre a toxidez do mesmo, observada através do desenvolvimento do feijão. Foi realizado, em casa de vegetação, um experimento fatorial 4×5 , com 3 repetições. Os tratamentos foram as 4 diluições do solo com areia nas proporções: 4/0, 3/1, 2/2 e 3/1 e as 5 combinações de adubo mineral: O, PK, NPK, PK + elementos menores e NPK + elementos menores. Todos os tratamentos foram inoculados uniformemente com *Rhizobium phaseoli*.

Experimento 8: efeito do revestimento calcáreo da semente de *Centrosema pubescens* e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio, em solo com toxidez de manganês. Foi instalado, em casa de vegetação, um experimento em blocos partidos, colocando-se as temperaturas nas parcelas e nas sub-parcelas os demais tratamentos que são os seguintes: semente

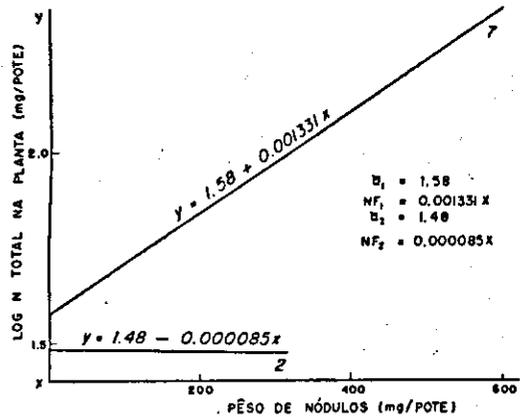


FIG. 6. Linha de regressão referente ao experimento n.º 6. Linha 1 - 6 estirpes mais ou menos eficientes; Linha 2 - 1 estirpe ineficiente; $a = \log N$ absorvido das sementes e do solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão b da linha 1 altamente significativo.

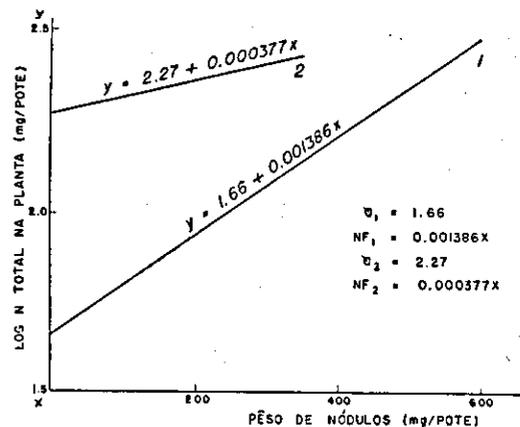


FIG. 7. Linha de regressão referente ao experimento n.º 7. Linha 1 - vasos sem adição de nitrogênio mineral; Linha 2 - vasos com adubação de nitrogênio mineral (100 ppm); $a = \log N$ absorvido das sementes e do solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão da linha 1 altamente significativo.

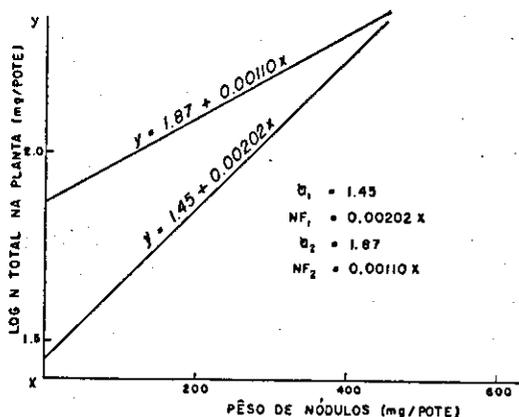


FIG. 8. Linha de regressão referente ao experimento n.º 8. Linha 1 — vasos sem adição de nitrogênio mineral; Linha 2 — vasos com adição de nitrogênio mineral (50 ppm); $a = \log N$ absorvido das sementes e do solo; $NF = \log N$ fixado; coeficiente de regressão das duas linhas altamente significativo; teste de significância entre os dois coeficientes significativo.

sem inoculação, semente inoculada, semente inoculada e revestida com carbonato de cálcio, semente inoculada e colocada em solo cujo pH foi corrigido para 6,5 com carbonato de cálcio. Estes tratamentos foram feitos com e sem a adição de 50 ppm de nitrogênio.

RESULTADOS

Na Fig. 1 está representada uma regressão entre o nitrogênio total das plantas de soja e o peso de nódulos, regressão típica, encontrada em uma série de experimentos. Nestes experimentos, em todos os tratamentos, o nitrogênio fixado depende diretamente da quantidade de tecido nodular à disposição da planta e o logaritmo do N total aumenta linearmente com o peso dos nódulos. Partindo-se da equação da regressão linear: $Y = a + bX$ podemos, então, calcular a quantidade de N fixada e a absorvida das sementes e do solo, sabendo-se que Y representa o logaritmo do nitrogênio total da planta e X o peso de nódulos, correspondente a cada ponto da linha de regressão. O ponto a representa o ponto no eixo das ordenadas onde não há nódulos, isto é, o log do N absorvido das sementes e do solo. Em vista disto o log do N fixado é igual a: $NF = Y - a \therefore Y = NF + a$. Substituindo na equação da regressão, temos:

$$\begin{aligned}
 Y &= a + bX \\
 NF + a &= a + bX \\
 NF &= bX
 \end{aligned}$$

Como o ponto a e o coeficiente de regressão b representam respectivamente, a quantidade de N absorvida da semente, do solo e o N fixado para cada unidade nodular, é evidente que o emprego das fórmulas de regressão nos dará, facilmente, estes valores. O coeficiente de regressão b apresenta-se como um

índice da eficiência da fixação do N por unidade de tecido nodular.

Na Fig. 8 está representada a linha de regressão de um experimento com *Centrosema pubescens*. O coeficiente de regressão ($b = 0.00202$) mostra que nas condições do experimento, os nódulos da *Centrosema* foram ainda mais eficiente na fixação do nitrogênio, que os do feijão. Neste experimento, o nitrogênio adicionado também modificou o coeficiente de regressão e, também houve necessidade de se dividir os dados em dois grupos. A quantidade de N adicionada (50 ppm), entretanto, neste caso não foi suficiente para o máximo desenvolvimento das plantas e registrou-se, também nestes vasos uma fixação de N, isto é, houve uma regressão altamente significativa do N total sobre o peso de nódulos. O coeficiente de regressão, no entanto, foi significativamente mais baixo que o coeficiente de regressão dos dados obtidos nos vasos sem nitrogênio mineral. Ambas as linhas de regressão terminam no mesmo ponto, isto é, no ponto de desenvolvimento máximo das plantas, nas condições do experimento.

DISCUSSÃO

A observação da existência de uma regressão do N total das plantas sobre o peso dos nódulos, isto é, a dependência da quantidade do N fixado do tecido nodular em funcionamento, não deveria surpreender. Não obstante, não foi ainda levada em consideração, porque até o presente, o conceito geralmente aceito é o de que a eficiência da simbiose *Rhizobium*-leguminosa é equivalente à quantidade de N fixado por unidade nodular, independente do número ou peso dos nódulos. No entanto, os resultados apresentados no presente trabalho mostram que este conceito é falso.

Os resultados apresentados por Graham e Parker (1961) já deveriam ter levado a esta conclusão se os referidos autores, ao invés de calcular a correlação entre a concentração da hemoglobina e o N total das plantas, tivessem determinado a regressão do N total das plantas sobre a hemoglobina total dos nódulos. Assim, teriam chegado a conclusões muito semelhantes às apresentadas no presente trabalho.

Se a nossa hipótese for verdadeira, isto é, se $NF = bX$ e se a concentração da hemoglobina nos nódulos determina a quantidade de N fixado por unidade de tecido nodular, a regressão de Graham e Parker deveria ser, em todos os casos e em qualquer ambiente, uma única reta com um coeficiente de regressão constante para cada espécie de planta ou até mesmo para todas as espécies.

Os resultados do presente trabalho mostram, ainda, que os fatores que agem sobre a eficiência dos

nódulos são poucos e que, na maioria dos casos, a fixação do N depende diretamente do peso dos nódulos. Nos diversos experimentos realizados, observamos que apenas dois fatores afetaram a eficiência dos nódulos, isto é, influíram sobre o coeficiente de regressão; são eles: adubações com N mineral em doses elevadas e uma estirpe ineficiente. Numerosos outros fatores como calagens, adubações com elementos maiores (exceto o N) e menores, pH, temperaturas do solo, variedades de plantas e estirpes de *Rhizobium* influíram sobre o número e o tamanho dos nódulos e sobre a fixação do nitrogênio, porém permaneceu constante a relação entre estes fatores, isto é, o coeficiente de regressão *b*.

Isto confirma a sugestão de Bowen (1959) de que as diferenças entre estirpes de *Rhizobium* em relação à sua eficiência sejam devidas a diferentes aptidões de formar nódulos e não a diferenças na eficiência destes nódulos. As observações de Andrew e Norris (1961), em relação à necessidade de cálcio para os pontos meristemáticos dos nódulos, também são confirmadas pelos resultados do presente trabalho.

A uniformidade dos coeficientes de regressão obtidos nos diversos ensaios realizados indica que não deve ser difícil controlar nos experimentos, os fatores que agem sobre a eficiência dos nódulos. Entretanto, isto não deve ser superestimado, pois são poucos ainda, os experimentos analisados e estes, na maioria, foram feitos em condições controladas, bastante uniforme e com solos deficientes em nitrogênio.

O estudo do complexo processo da simbiose *Rhizobium*-leguminosa está na dependência de melhor avaliar as diferenças entre os fatores que têm efeito sobre as bactérias, sobre a iniciação e o crescimento dos nódulos ou na fixação do N nos nódulos depois de formados. Estes estudos têm sido feitos, somente, em condições artificiais com N¹⁵, em raízes ou nódulos separados ou, no máximo, em culturas de agar.

Virtanen e Haunsen (1952) sugeriram um método de diferenciar em condições de campo, o N fixado nos nódulos do absorvido pelas raízes, inoculando testemunhas com estirpes ineficientes. Mas este método apresentou sérias dificuldades pela contaminação com *Rhizobium* eficiente do solo.

Esperamos que o método apresentado, no presente trabalho, contribua para tais estudos, sob condições mais naturais.

REFERÊNCIAS

- Andrew, C. S. & Norris, D. O. 1961. Comparative responses to calcium of five tropical and four temperate pasture legume species. *Aust. J. Agric. Res.* 12:40-55.
- Bowen, G. D. 1959. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *Qld. J. Agric. Sci.* 16:267-281.
- Burton, J. C., Allen, O. N. & Berger, K. C. 1952. The prevalence of strains of *Rhizobium* in some midwestern soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 16:167-169.
- Burton, J. C., Allen, O. N. & Berger, K. C. 1954. Response of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with mixtures of effective and ineffective rhizobia. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 18:156-159.
- Chen, H. K. & Thornton, H. G. 1940. The structure of effective nodules and its influence on nitrogen fixation. *Proc. Roy. Soc. B.* 129: 208-229.
- Graham, P. H. & Parker, C. A. 1961. Leghaemoglobin and symbiotic nitrogen fixation. *Aust. J. Sci.* 23:231-232.
- Lange, R. T. & Parker, C. A. 1961. Effective nodulation of *Lupinus digitatus* by native rhizobia in south western Australia. *Plant and Soil* 15:193-198.
- Virtanen, A. J., Erkama, J. & Linkola, H. 1947. On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules II. *Acta Chem. Scand.* 1:861-870.
- Virtanen, A. J. & Hausen, S. S. von 1952. A method for determining in pea cultures the amount of molecular nitrogen fixed and the amount of combined nitrogen taken up from soil. *Plant and Soil* 4:171-177.

EVALUATION OF NITROGEN FIXATION IN LEGUMES BY THE REGRESSION OF TOTAL PLANT NITROGEN WITH NODULE WEIGHT

Abstract

In six greenhouse and two field experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*), soybeans (*Glycine max*) and *Centrosema pubescens*, significant regressions were found of the logarithm of total plant nitrogen with nodule weight. With these regressions it became possible to evaluate the amount of nitrogen absorbed from seeds and soil (Y intercept *a*) and the amount of nitrogen fixed per unit nodule tissue (regression coefficient *b*). The logarithm of N fixed for each nodule weight can then be calculated by $NF = bX$.

The regression coefficient was quite constant for each species not being affected by a number of factors such as liming, fertilizing with major and minor elements (except N), pH levels, soil temperatures, plant varieties and most *Rhizobium* strains. One completely inefficient *Rhizobium* strain and the addition of mineral nitrogen were the only factors affecting the regression coefficient. It was concluded that most factors affecting nitrogen fixation of legumes act on nodule numbers or sizes but not on the amount of nitrogen fixed/unit nodule tissue.