

# SINERGIA DA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO DO SOLO E DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO DIRIGIDA PARA O AUMENTO DO NITROGÊNIO TOTAL DA SOJA (*Glycine max*)<sup>1</sup>

ALÁIDES PUPPIN RUSCHEL<sup>2</sup> e RENATO RUSCHEL<sup>3</sup>

**SINOPSE.**— Foram estudados os efeitos da inoculação e da adubação com diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de potássio, sulfato de amônio, nitrato de amônio, e uréia) na nodulação, isto é, número e peso de nódulos, e na fixação simbiótica de nitrogênio, observando-se a atividade da nitrogenase e o teor de nitrogênio, total e percentual, da planta de soja (*Glycine max* (L.) Merrill).

Houve redução da massa nodular com a aplicação de sulfato e nitrato de amônio e nitrato de potássio. Este efeito não foi observado com a uréia. O número de nódulos diminuiu com a adição de nitrogênio ao solo, porém, não foi observada inibição da atividade da nitrogenase. O peso seco da planta tomado até os 45 dias de idade não mostrou diferenças devidas à inoculação; no entanto a inoculação mostrou-se efetiva no sentido de aumentar o nitrogênio total e percentual da parte aérea da planta em todos os tratamentos estudados. A inoculação manteve o teor de nitrogênio constante durante todo o desenvolvimento da planta. Um efeito aditivo da inoculação e adubação nitrogenada foi observado no aumento do nitrogênio total da planta.

*Palavras chaves adicionais para índice:* Nodulação, nitrogenase, adubação nitrogenada.

## INTRODUÇÃO

Tem sido amplamente difundida a idéia de que o nitrogênio mineral, quando abundante, diminui a nodulação em leguminosas. Van Schreven (1958, 1959) observou redução no número de nódulos causada pelo íon nitrato, enquanto Vincent (1965) notou que a aplicação de doses sucessivas de nitrogênio reduziam progressivamente o tecido nodular em soja. Pate e Dart (1961) estudaram a influência de três níveis de nitrogênio mineral na formação do nódulo, notando que níveis baixos aumentaram o número dos mesmos na raiz principal em três leguminosas, e observaram também diferentes respostas, dependendo da época ou estação do ano. Stewart (1966) diz que a inibição da fixação simbiótica de nitrogênio é proporcional à quantidade de nitrogênio aplicada. Segundo este autor, o nitrato inibe a fixação simbiótica, o mesmo acontecendo com a uréia, enquanto que para o nitrato os resultados foram contraditórios, ora inibindo, ora estimulando.

O uso de nitrogênio marcado em soja e trevo demonstrou que embora o nitrogênio fixado fosse inversamente proporcional ao nitrogênio mineral suprido, a fixação simbiótica nunca foi completamente inibida (Norman & Krampitz 1946, Thornton 1948, Walker *et al.* 1956, Allos

& Bartholomew 1955, 1959). No entanto, Broeshart e Axmann (1972), em experimento usando solução nutritiva com  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  marcados, não observaram nenhuma fixação simbiótica detectável, porém, em experimento de campo, tais íons não inibiram aquela fixação em feijão e trevo; também não obtiveram resposta da produção ao nitrogênio aplicado.

Atualmente, com o advento do método de redução do acetileno, usando cromatografia de gás, pode-se melhor avaliar a atividade da nitrogenase (Kock & Evans 1966, Hardy *et al.* 1968, Schinghamer *et al.* 1970) e consequentemente a fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico (Roughly & Dart 1971, Hardy *et al.* 1971, Ruschel & Ruschel 1975). Recentemente, Ruschel *et al.* (1974) observaram que a soja inoculada em presença de altas doses de uréia e nitrato de amônio adicionados ao solo produzia nódulos em menor escala que a testemunha, porém com atividade normal da nitrogenase, vindo seus resultados sugerir um efeito aditivo do nitrogênio fixado simbioticamente e do absorvido do solo, aumentando o nitrogênio total da planta de soja.

O presente trabalho visou melhor estudar a sinergia acima mencionada usando-se diferentes fontes de nitrogênio, em duas épocas de desenvolvimento da soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em experimento em casa de vegetação foram estudados em duas épocas (35 e 45 dias após o plantio) de desenvolvimento da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio e da inoculação, usando-se vasos com capacidade de 1,5 kg de solo Podzólico Vermelho Amarelo (Série Itaguaí, Km 47 da antiga Estrada Rio-S. Paulo) com a seguinte análise química: O ppm de fósforo, 54 ppm de potássio, 4,1 mE

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 7 de junho de 1974.

Trabalho executado no Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS), Km 47 Rod. Rio-S. Paulo.

<sup>2</sup> Eng.º Agrônomo, M.S., ex-Chefe da Seção de Solos do IPEACS, Pesquisador B, bolsista, do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), atualmente no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), 13400 Piracicaba, SP.

<sup>3</sup> Eng.º Agrônomo, Ph.D., da Seção de Fitotecnia do IPEACS, Pesquisador A, bolsista, do CNPq, atualmente Coordenador do Banco de Germoplasma de Milho no Instituto de Genética da ESALQ.

de cálcio + magnésio/100 cm<sup>3</sup> de solo, o mE de alumínio/100 cm<sup>3</sup> de solo. Foi feita adubação básica de fósforo (200 ppm), potássio (50 ppm), magnésio e elementos menores.

Em esquema experimental inteiramente casualizado com três repetições foram analisados os seguintes tratamentos: Testemunha (T), T + nitrato de potássio, T + nitrato de amônio, T + sulfato de amônio, e T + uréia. Todos foram repetidos com inoculação, perfazendo o total de 10 tratamentos. As parcelas ficaram constituídas de vasos com três plantas. Foram usadas sementes da cultivar Mineira, desinfectadas em álcool a 95°GL, a fim de eliminar o *Rhizobium* existente em seu tegumento. Os tratamentos com inoculação receberam inoculante (turfa inoculada, 1 g/30 g de semente). Os tratamentos com as diferentes fontes nitrogenadas receberam 150 e 250 ppm de nitrogênio, respectivamente para vasos da primeira e segunda colheita, em doses de 50 ppm, espaçadas de 10 dias, a partir do oitavo dia após o plantio.

Logo após a colheita das plantas, partes das raízes que possuíam nódulos foram separadas sem lavar, e a atividade da nitrogenase analisada incubando-se a amostra em vidros hermeticamente fechados com acetileno (5%), sendo feita a determinação do etileno evoluído em cromatógrafo de gás Perkin Elmer, conforme descrito por Ruschel *et al.* (1974). Foram determinados o número e o peso dos nódulos, bem como o peso seco total e da parte aérea das plantas por vaso. O teor de nitrogênio da parte aérea das plantas foi analisado, usando-se o método semimicro-Kjeldhal modificado, isto é, digestão de ácido sulfúrico + mistura de sais (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub> + Se em pó na proporção de 100:10:1) e destilação do digerido com recebimento do destilado em ácido sulfúrico 0,05 N.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas não inoculadas não apresentaram nódulos, concluindo-se que as diferenças encontradas entre os tratamentos com e sem inoculação foram devidas à fixação simbiótica. No Quadro 1 encontram-se os quadros médios e níveis de significância para as fontes de variação das variáveis analisadas. Com exceção da uréia, as demais fontes de nitrogênio provocaram redução no peso dos nódulos (Quadro 2). Houve também redução no número de nódulos das plantas que receberam adubação nitrogenada. Esta redução foi mais pronunciada para o tratamento no qual a fonte de nitrogênio foi sulfato de amônio, fato já observado por Ruschel *et al.* (1974).

Maior atividade da nitrogenase por grama de nódulos foi observada nos tratamentos que apresentavam menor número de nódulos (sulfato e nitrato de amônio), porém devido ao alto coeficiente de variação desta análise, as diferenças não atingiram níveis de significância estatística. Todavia levando-se em consideração a massa total de nódulos por tratamento, os dados mostram que a nitrogenase foi igualmente ativa nas plantas cultivadas em presença de uréia, sulfato e nitrato de amônio, em níveis semelhantes aos nódulos das plantas testemunhas, sendo aquela atividade somente diminuída quando os nódulos se desenvolveram em solo com adição de nitrato de potássio. Torna-se pois evidente que não houve inibição da atividade da nitrogenase quando o nitrogênio foi adicionado ao solo, e que a mesma pôde ser avaliada em todos os tratamentos.

Analisando-se as diferenças entre as duas épocas, observa-se que a atividade da nitrogenase, medida pela evolução do etileno por grama de nódulos, diminuiu para os tratamentos de modo geral com o crescimento da

QUADRO 1. Quadros médios e níveis de significância das análises de variância para as diferentes variáveis estudadas

F. variação	Peso seco da planta	N total da parte aérea	N%	Peso dos nódulos	Número de nódulos	Etileno/g de nód.	Etileno/peso de nód.
Épocas (E)	1.193,53++	570.082++	2,1851	7.301.333++	4.738	17.953++	11.701+
Fontes de N (N)	89,80++	53.159++	0,6949++	203.419++	19.912++	5.976	2.854+
Inoculação (I)	5,92	397.215++	19,2101++	—	—	—	—
E x N	24,99++	4.092	0,4953++	0.122	1.031	1.455	1.477
E x I	10,38	165.532++	4,4553++	—	—	—	—
N x I	2,25	7.518+	0,8330++	—	—	—	—
E x N x I	6,51+	1.573	0,0463	—	—	—	—
Resíduo	1,29	2.515	0,1030	27.733	1.013	7.716	628

+ = significância ao nível de 5% de probabilidade, ++ = idem, 1%.

QUADRO 2. Peso e número de nódulos, e etileno evoluído por grama e por peso total de nódulos de três plantas, medidos aos 35 (1.ª ép.) e (2.ª ép.) dias após o plantio (médias de três repetições)

Tratamentos	Peso de nódulos (mg)			Número de nódulos			Etileno/g de nód. (μl)			Etileno/peso de nód. (μl)		
	1.ª ép.	2.ª ép.	Média*	1.ª ép.	2.ª ép.	Média	1.ª ép.	2.ª ép.	Média	1.ª ép.	2.ª ép.	Média
Testemunha	672	1.729	1.200 a	204	219	212 a	100,7	51,4	76,1	62,5	88,5	75,5 a
KNO <sub>3</sub>	383	1.433	908 b	121	180	150 bc	79,5	24,0	51,7	30,7	33,2	32,0 b
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	299	1.211	755 b	52	64	58 d	113,9	101,0	107,5	34,9	123,1	70,0 a
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	377	1.330	854 b	94	139	116 c	180,2	84,2	132,2	67,0	109,4	88,2 a
Uréia	627	1.589	1.108 a	170	164	167 b	89,6	58,7	74,1	51,9	93,2	74,0 a

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

planta; no entanto, considerando-se o peso dos nódulos por vaso, a atividade da nitrogenase aumentou com o crescimento da planta, devido à maior massa nodular constatada na segunda época.

Independentemente da inoculação, o peso seco e o nitrogênio total e percentual das plantas foram sempre maiores nos tratamentos que receberam adubação nitrogenada, o que era esperado (Quadro 3). Analisando-se o efeito da inoculação, independentemente da adubação nitrogenada, nota-se que não houve diferenças para o peso das plantas cultivadas na presença e ausência de inoculação (Quadros 1 e 3), indicando que o peso seco tomado até os 45 dias de idade da planta não mede o efeito da inoculação em soja. A conclusões semelhantes chegaram Ruschel e Ruschel (1975) trabalhando com feijoeiro. No entanto, para o nitrogênio total e percentual da parte aérea da planta houve efeito positivo da inoculação, observado em todos os tratamentos (Quadros 1 e 3). Este efeito evidencia que a prática da inoculação é responsável pelo enriquecimento do nitrogênio nas plantas mesmo quando cultivadas em solos ricos em nitrogênio, e sugere que a adubação nitrogenada sozinha talvez não supra totalmente as necessidades da soja, o mesmo podendo acontecer com outras leguminosas.

O teor de nitrogênio apresentou tendência decrescente com o desenvolvimento da planta para todos os tratamentos com plantas não inoculadas, porém, para aqueles que receberam inoculação, na média geral, o teor de nitrogênio manteve-se constante entre as duas épocas de colheita (Quadro 3), indicando que a fixação simbiótica é importante para manter o nível de concentração deste elemento na célula ao longo do desenvolvimento da planta. A grande concentração de nitrogênio nas células das plantas inoculadas indica a presença de reservas que seguramente serão responsáveis por um

maior desenvolvimento da planta em seus estádios futuros e conseqüentemente deverão influir no sentido de maior produção de grãos.

As Fig. 1 e 2 representam de forma gráfica os efeitos da inoculação e adição de nitrogênio ao solo, tomando-se a média dos tratamentos. A Fig. 1 sugere que a inoculação sozinha é suficiente para elevar o teor de nitrogênio da planta a níveis superiores aos alcançados quando a planta é adubada com fertilizantes nitrogenados. Na Fig. 2 o efeito aditivo da inoculação e adubação nitrogenada é evidenciado no aumento do nitrogênio to-

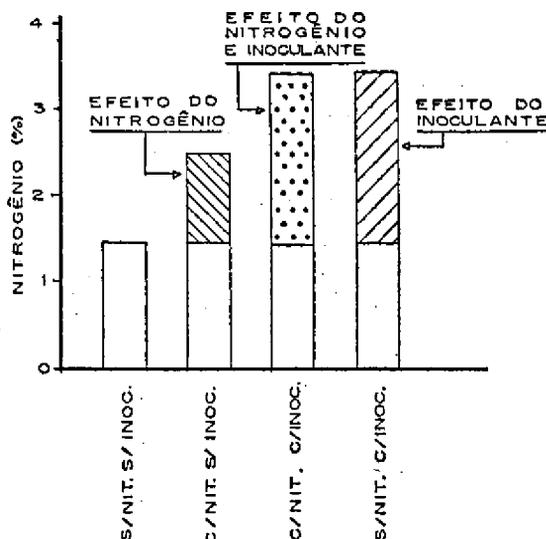


FIG. 1. Efeitos, isolados e conjunto, do inoculante e do nitrogênio aplicado como fertilizante, no teor de nitrogênio da parte aérea da planta.

QUADRO 3. Peso seco das plantas, e nitrogênio total e percentual da parte aérea de três plantas, medidos aos 35 (1.ª ép.) e 45 (2.ª ép.) dias após o plantio (médias de três repetições)

Tratamentos	Peso seco da planta (g)			N total da p. aérea (mg)			Nitrogênio		
	1.ª ép.	2.ª ép.	Média	1.ª ép.	2.ª ép.	Média	1.ª ép.	2.ª ép.	Média
Testemunha s/inoc.	9,03	11,46	10,25	113,13	125,07	119,10	1,55	1,30	1,42
c/inoc.	8,07	13,33	10,70	210,50	489,87	350,18	3,07	3,77	3,42
Média geral*			10,47b			234,64b			2,42b
KNO <sub>3</sub> s/inoc.	11,76	24,30	18,03	284,33	441,93	363,13	2,75	2,00	2,37
c/inoc.	11,40	20,63	16,02	342,20	638,93	490,57	3,37	3,33	3,35
Média geral			17,02a			426,85a			2,86a
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> s/inoc.	10,20	21,13	15,67	298,30	426,33	362,32	3,25	2,17	2,71
c/inoc.	11,57	20,67	16,12	292,67	636,00	464,33	3,15	3,32	3,23
Média geral			15,89a			413,32a			2,97a
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> s/inoc.	11,17	21,93	16,55	287,37	360,60	323,98	2,92	1,77	2,34
c/inoc.	12,00	20,03	16,02	360,53	649,33	504,93	3,35	3,46	3,41
Média geral			16,26a			414,46a			2,87a
Uréia s/inoc.	11,17	23,26	17,22	300,90	379,60	340,25	3,18	1,78	2,48
c/inoc.	11,33	20,13	15,73	366,53	658,30	512,42	3,65	3,52	3,58
Média geral			16,47a			426,33a			3,03a

\* Médias gerais seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

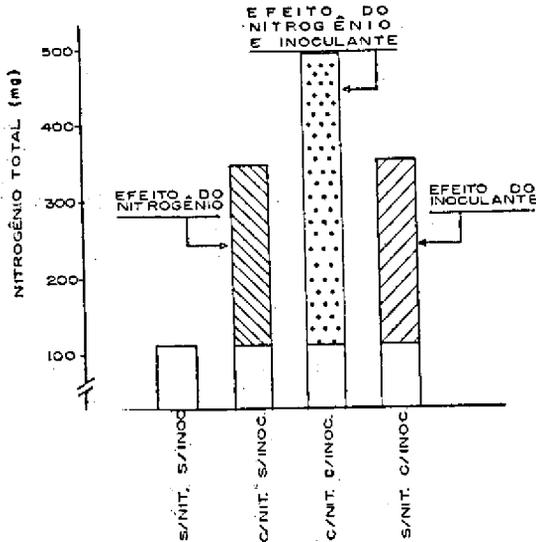


FIG. 2. Efeitos, isolados e conjunto, do inoculante e do nitrogênio aplicado como fertilizante, no peso total de nitrogênio da parte aérea da planta.

tal da planta, comprovando que os dois mecanismos de obtenção de nitrogênio da soja funcionam simultaneamente, complementando-se na soma de suas forças numa interação ideal que resulta em níveis maiores de nitrogênio da planta.

#### REFERÊNCIAS

- Allos, H.F. & Bartholomew, W.V. 1955. Effects of available nitrogen on symbiotic fixation. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 19: 182-184.
- Allos, H.F. & Bartholomew, W.V. 1959. Replacement of symbiotic fixation by available nitrogen. *Soil Sci.* 87:61-66.
- Broeshart, H. & Axmann, H. 1972. Preliminary field and greenhouse trials on nitrogen fertilization and symbiotic nitrogen fixation with beans and clover. *In Use of isotopes for study*
- of fertilizer utilization by legumes crops. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Hardy, R.W.F., Holstein, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assays for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation. *Pl. Physiol.*, Lancaster, 43:1185-1207.
- Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Fry, K.T. & Holstein, R.D. 1971. Bionitrogen fixation: A key to world protein in biological nitrogen fixation in nature and agricultural habitats. *Pl. Soil* (Special volume), p. 561-590.
- Kock, B. & Evans, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Pl. Physiol.*, Lancaster, 4:1748-1749.
- Norman, A.G. & Krampitz, L.O. 1946. The nitrogen nutrition of soybeans. 2: Effect of available soil nitrogen on growth and nitrogen fixation. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 10:191-196.
- Pate, J.S. & Dart, P.J. 1961. Nodulation studies in legumes. 4: The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Pl. Soil* 15:329-346.
- Roughly, R.J. & Dart, P.J. 1971. Reduction of acetylene by nodules of *Trifolium subterraneum* as affected by root temperature, *Rhizobium* strain and host cultivar. *Arch. Mikrobiol.* 69:171-179.
- Ruschel, A.P. & Ruschel, R. 1975. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. *Pesq. agropec. bras.*, Sér. Agron., 10:11-17.
- Ruschel, A.P., Ruschel, R., Almeida, D.L. & Suhel, A.R. 1974. Influência do nitrogênio mineral e orgânico na fixação simbiótica de nitrogênio em soja. *Pesq. agropec. bras.*, Sér. Agron., 9:125-129.
- Schinghmer, E.A., Evans, H.J. & Dowson, M.D. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of  $N_2$  fixation. *Pl. Soil* 93:192-212.
- Stewart, W.D.P. 1966. *Nitrogen fixation in plants*. Athlone Press, Univ. London.
- Thornton, G.D. 1948. Greenhouse studies of nitrogen fertilization of soybeans and *Lespedeza* using isotopic nitrogen. *Soils Fertil. Abstr.* 11:130.
- Van Schreven, D.A. 1958. Some factors affecting the uptake of nitrogen by legumes, p. 137-163. *In* Hallsworth, E.C. (ed.) *Nutrition of legumes*. Butterworths, London.
- Van Schreven, D.A. 1959. Effects of added sugar and nitrogen on nodulation legumes. *Pl. Soil* 11:93-112.
- Vincent, J.M. 1965. Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legume, p. 384-435. *In* Bartholomew, W.V. & Clark, F.E. (eds) *Soil nitrogen*. Am. Soc. Agron., Madison, Wisconsin.
- Walker, T.W., Adams, A.F.R. & Orchiston, H.D. 1956. Fate of labeled nitrate and ammonium nitrogen when applied to grass and clover separately and together. *Soil Sci.* 81:339-351.

ABSTRACT.- Ruschel, A.P.; Ruschel, R. [Synergism of nitrogen uptake from soil and symbiotic nitrogen fixation increasing nitrogen in soybean plant (*Glycine max*)]. Sinergia da absorção de nitrogênio do solo e da fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico dirigida para o aumento total da soja (*Glycine max*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia* (1975) 10, 37-40 [Pt, en] Centro de Energia Nuclear, ESALQ, Cx. Postal 96, Piracicaba, SP, Brazil.

The effect of inoculation and different sources of nitrogen (potassium nitrate, ammonium sulphate, ammonium nitrate and urea) on nodulation, i.e., the number and weight of nodules, the symbiotic N-fixation and the amount of N, total and percentual, in the soybean plant (*Glycine max* (L.) Merrill) was studied.

Nodular weight decreased with addition of ammonium sulphate, ammonium nitrate and potassium nitrate to soil. This effect was not observed with urea. Although the number of nodules decreased with addition of these nitrogen sources, no inhibition of nitrogenase activity was noted. The plant dry weight measured at 45 days indicated no differences due to inoculation; however, inoculation proved effective as far as increase in total and percentual N in plant tops in all treatments under study. The increase in total nitrogen indicated a synergism of inoculation and nitrogen fertilization. Inoculation maintained a constant level of nitrogen in the plant throughout plant growth.

*Additional index words:* Nodulation, nitrogenase, nitrogen fertility.