

ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO NA FORMA IÔNICA E MOLECULAR DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.)*
Absorption of Nitrogen in Ionic and Molecular Form: by Bean (*Phaseolus vulgaris*
L.) Varieties

Clóvis Lemos Veiga** e Alaides Fappin Ruchek***

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar a capacidade de utilização do nitrogênio, quando suprido na forma mineral e molecular sobre a absorção e fixação simbiótica do nitrogênio. O experimento foi realizado no CENA (Centro de Energia Nuclear da Agricultura), Piracicaba, São Paulo, Brasil, em casa de vegetação, utilizando-se uma solução nutritiva de Hoagland modificada, reduzida a 1/5.

Foram usadas doze cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), dois níveis de nitrogênio e as plantas foram inoculadas com uma mistura de três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

As amostras foram coletadas 40 dias após a germinação e avaliados os seguintes parâmetros: peso de matéria seca da parte aérea, nitrogênio total, peso seco de nódulos e atividades de redutase de nitrato e da nitrogenase.

As plantas desenvolveram-se melhor na solução nutritiva completa do que quando inoculadas; as melhores cultivares para a absorção do nitrogênio na forma iônica e N fixado foram Carioca precoce e Ica pijao; houve uma tendência de Aroana, Carioca e Venezuela 350 para serem boas fixadoras de nitrogênio.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the capacity for nitrogen utilization when supplied in different mineral and molecular forms on N-uptake and symbiotic N-fixation. The experiment was carried out at CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), Piracicaba, São Paulo, Brazil, in a greenhouse in a modified 1/5 Hoagland nutrient solution.

Twelve cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) were used, with two levels of nitrogen. The plants were inoculated with a mixture of three *Rhizobium phaseoli* strains.

The sampling date was 40 days after germination. The following parameters were studied: dry weight of aerial part, total nitrogen, nodules dry weight, ni-

* Parte da Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pelo primeiro autor, como um dos requisitos do Curso de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas.

** Engenheiro Agrônomo, Professor Adjunto do Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

*** Engenheiro Agrônomo, pesquisadora do CENA, Piracicaba, SP.

trate reductase and nitrogenase activities.

Plants grew better in complete nutrient solution than when inoculated; the best cultivars for N-uptake and utilization of N_2 -fixation were Carioca precoce and Ica pijao; there were tendency for Aroana, Carioca and Venezuela 350 to be good N-fixing cultivars and for N-uptake in ionic form.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é absorvido da solução nutritiva, que pode ser a solução do solo, provavelmente, pelo fluxo da massa (MALAVOLTA, 13) podendo ser pela forma nítrica (NO_3^-) ou amoniacal (NH_4^+), porém a maioria das plantas prefere a nítrica à amoniacal (BEEVERS, 1; CROCOMO, 4).

A planta, após a absorção, não incorpora o nitrogênio na forma nítrica, este deverá ser reduzido à forma amoniacal através de uma série de reações enzimáticas, que pode ter lugar nas raízes ou nas folhas. Em feijoeiro, GUTIERREZ & CROCOMO (9) observaram que esta transformação tem lugar principalmente nas folhas. Esta redução é catalizada por duas enzimas, a reductase de nitrato, que reduz o nitrato a nitrito e a reductase de nitrito que reduz o nitrito à amônia.

O nitrogênio então absorvido e reduzido está em condições de ser incorporado às proteínas da planta.

Algumas bactérias simbiotes, especialmente do gênero *Rhizobium*, são capazes de aproveitar o nitrogênio atmosférico e cedê-lo às plantas. A utilização dessas bactérias como intermediárias no aproveitamento de nitrogênio do ar, tem sido feita já de longa data, em culturas de leguminosas (DART, 5). Entretanto, somente há relativamente pouco tempo, RAGGIO et alii (15) observaram incorporação de $^{15}N_2$ em nódulos de feijoeiro sendo demonstrado o sistema fixador desta planta.

DOBEREINER & RUSCHEL (6) demonstraram que a associação *Rhizobium*-feijoeiro podia fornecer, economicamente, nitrogênio para a subsistência desta planta, em nossas condições.

Tanto espécies diferentes de leguminosas como variedades e cultivares influem na eficiência da simbiose *Rhizobium*-hospedeiro. Segundo BRILL (3) a maneira mais simples de aumentar a eficiência da simbiose é selecionar espécies de plantas e bactérias, a fim de determinar as combinações mais adequadas. Sabe-se que um dos fatores importantes na atividade da nitrogenase e, conseqüentemente na fixação do nitrogênio, é o fornecimento de energia na forma de produtos sintetizados pela planta. O cruzamento de plantas de alta eficiência fotossintética, talvez fosse uma das maneiras de aumentar a eficiência da fixação do nitrogênio.

Durante o processo de fixação do nitrogênio há evolução de hidrogênio, reação esta catalizada pela nitrogenase, cuja reação, segundo BIDWELL (2) pode ser assim resumida: $H^+ + e^- \rightarrow 1/2 H_2$. Nesta reação há uma perda de 40 a 60% de energia (SCHUBERT & EVANS, 18; SCHRAUZER, 17), sendo esta necessária para a fixação do nitrogênio, reduzindo, portanto, a eficiência da fixação. Esta efi-

ciência pode ser melhorada pela seleção de simbiontes que utilizem convenientemente a energia fornecida pela fotossíntese e que deixem evoluir menor quantidade de hidrogênio ou que reciclem o H_2 evoluído. Mesmo entre cultivares de uma mesma espécie existem diferenças bastante grandes, às vezes, o que é devido a diferenças fisiológicas relacionadas com o metabolismo, determinadas por fatores genéticos (DOBEREINER & ARRUDA, 7; EVANS, 8). A época do ciclo vegetativo e a localidade onde a planta é cultivada também pode influir. Esta última está em função da taxa de luminosidade (MONTUJOS, 14; RUSCHEL & REUZER, 16).

Como ainda há poucos estudos no sentido de selecionar espécies de feijoeiro mais adequadas para a absorção do nitrogênio na forma iônica e molecular, resolveu-se fazer o presente trabalho, levando-se em conta os seguintes objetivos:

- verificar a influência de cultivares no aproveitamento do nitrogênio na forma iônica e molecular;
- avaliar a capacidade de utilização do N mineral e fixado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado com solução nutritiva, em casa de vegetação, nas dependências do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) em Piracicaba, Estado de São Paulo, no ano de 1979.

Foram usadas 12 cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) procedentes da EMBRAPA, segundo a relação abaixo:

- | | |
|----------------------|--------------------------------|
| 1. Porillo sintético | 7. Carioca |
| 2. Aroana | 8. México 309 |
| 3. Moruna | 9. Negro 325 |
| 4. Carioca precoce | 10. Ica pijao |
| 5. 51051 | 11. Composto negro Chimaltengo |
| 6. N-159 | 12. Venezuela 350 |

Foi usada a solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (12) modificada, diluída a 1/5, completa com 42 ppm de nitrogênio e com 10% de concentração do nitrogênio da primeira, ou seja, com 4,2 ppm de N. A solução básica (completa) está na Tabela 1.

Foram usados dois tratamentos: plantas não inoculadas colocadas na solução completa e plantas inoculadas na solução com 10% de nitrogênio.

Usaram-se três estirpes de *Rhizobium phaseoli*: 127 K 17, originária da Cia. Nitragin (EUA), C-05 e C-19, provenientes da Seção de Microbiologia do Solo do CENA.

Instalação do Experimento

Foram usadas, aproximadamente, 25 sementes de cada cultivar, esterilizadas superficialmente com álcool absoluto por três minutos, e após colocadas em uma

solução de hipoclorito de sódio-comercial a 10% em água durante 10 minutos e a seguir lavadas com água esterilizada até que desaparecesse o cheiro característico do hipoclorito. A metade das sementes assim tratadas foram inoculadas e semeadas em bandejas de plástico, previamente desinfetadas pelo mesmo processo contendo vermiculita esterilizada. A outra metade foi semeada em outra bandeja nas mesmas condições da anterior. Ambas receberam regas, quando necessário, com uma solução isenta de nitrogênio.

Após dez dias da germinação foi realizado o transplante para bandejas contendo solução nutritiva, conforme os tratamentos acima descritos. As plântulas foram extraídas cuidadosamente, das bandejas onde germinaram, e fixadas nos furros da chapa superior das bandejas, por meio de esponjas plásticas, usando-se o espaçamento de 15 cm.

TABELA 1. Composição química da solução estoque e a concentração, usada na solução original, em ml por litro.

Substância química (p.a.)	Molaridade	ml. da sol. estoque por litro da solução
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 M (246g/l)	0,4
KH_2PO_4	1 M (136g/l)	0,2
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	1 M (236g/l)	1,0
KNO_3	1 M (101g/l)	1,0
Solução de micronutrientes (+)		0,2
Solução de Fe-EDTA (++)		0,2

(+) $MnCl_2$ - 1,81g; H_3BO_3 - 2,86g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,22g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,08g; H_2MoO_4 - 0,09g; $CaCl_2$ - 0,02g; H_2O - q.s.p. 1000 ml.

(++) 33,2 g de NaEDTA em 89,2 ml de NaOH 1 N. Adicionar a seguir: 24,9 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dissolvido em água. Arejar durante 12 horas no escuro. Completar a um litro com água.

Amostragem

A amostragem foi realizada 30 dias após o transplante e determinados os seguintes parâmetros: Peso de matéria seca da parte aérea, atividade da redutase de nitrato, atividade da nitrogenase, peso de nódulos e nitrogênio total.

A planta foi cortada na altura do solo, sendo separada a raiz da parte aérea. As raízes foram colocadas em vidros de tampa hermética para a avaliação da atividade da nitrogenase. Após, os nódulos foram separados da raiz, secados e

pesados. A parte aérea foi usada para a determinação da atividade da redutase de nitrato e posteriormente colocadas em sacos de papel, secadas em estufa a 70°C por 24 horas e pesadas.

Análises realizadas

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método da redução do acetileno, descrito por HARDY et alii (10); a atividade da redutase de nitrato pelo método descrito por HARPER (11) e o nitrogênio pelo método do semi-micro Kjeldhal e calculado o nitrogênio total em função do peso da parte aérea.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 apresenta os valores de peso de matéria seca da parte aérea, nitrogênio total e atividade da redutase de nitrato, nos tratamentos onde as plantas foram submetidas à solução completa (sem inoculação) onde se estuda a absorção do nitrogênio na forma iônica (NO_3^-). Por estes dados verifica-se que as cultivares Carioca precoce e Ica pijao apresentaram os maiores valores de peso de matéria seca da parte aérea, sendo correspondido, com os valores de nitrogênio total. Isto indica que estas cultivares são boas conversoras de nitrogênio em matéria seca. Venezuela 350 e 51051 foram as que obtiveram menor peso de matéria seca e de nitrogênio total, por não terem caráter de boas conversoras de nitrogênio, quando oferecido desta forma. Isto já fora observado por DOBEREINER & AR-RUDA (7) e EVÂNS (8).

No tratamento com inoculação, não houve diferenças significativas para peso de matéria seca e nitrogênio total. A causa disto deve ter sido o coeficiente de variação que foi muito alto, neste tratamento. A fixação de nitrogênio exige maior quantidade de energia do que processo de absorção iônica. Este fato levou ao aparecimento de maiores diferenças individuais entre as repetições, redundando no aumento do coeficiente de variação.

Com relação à atividade da redutase de nitrato, os dados apresentados mostram que esta enzima é induzível (BIDWEL, 2; BEEVERS, 1; CROCOMO, 4), por isto, o tratamento de maior dosagem de nitrogênio apresentou maior teor de nitrato reduzido. A cultivar Carioca precoce apresentou maior atividade desta enzima indicando sua boa capacidade na incorporação do nitrogênio.

As cultivares Aroana e Moruna apresentaram os maiores valores de peso de nódulos (Tabela 3), indicando sua boa capacidade para fixadoras de nitrogênio simbioticamente. Estes dados estão perfeitamente correlacionados com a atividade da nitrogenase dando a idéia que estes nódulos estavam com alta fixação de nitrogênio. Embora não haja relação direta com o peso de matéria seca, justifica-se este fenômeno com o fato que são muitos os eventos independentes destes parâmetros que levam à formação da matéria orgânica.

TABELA 2. Valores de peso de matéria seca (g), nitrogênio total (mg), atividade da redutase de nitrato (moles de $\text{NO}_2^-/\text{pl/h}$), de 12 cultivares de feijoeiro submetidas a duas concentrações de nitrogênio (42 e 4,2 ppm) e colhidas aos 40 dias após a germinação (30 dias após o transplante). Médias de três repetições.

Cultivares	Peso de matéria seca (g/pl)		Nitrogênio total (mg)		Atividade da redutase ($\text{m NO}_2^-/\text{pl}$)	
	42 ppm	4,2 ppm	42 ppm	4,2 ppm	42 ppm	4,2 ppm
Porrillo sintético	1,94 d*	0,52 a	76,86 ef	12,43 a	31,60 c	8,20 a
Aroana	1,84 d	0,62 a	81,90 def	10,03 a	57,56 d	10,17 a
Moruna	1,56 f	0,56 a	74,50 fg	16,50 a	33,93 de	7,60 a
Cartoca precoce	3,62 a	0,74 a	168,73 a	19,03 a	167,44 a	5,45 a
51051	1,18 h	0,36 a	44,36 h	12,50 a	15,75 e	5,53 a
N-159	1,86 d	0,68 a	83,90 def	16,30 a	26,70 e	10,74 a
Cartoca	1,17 h	0,72 a	50,33 h	18,76 a	43,39 de	6,73 a
México 309	2,06 c	0,65 a	91,53 d	17,03 a	30,14 e	3,75 a
Negro 325	2,38 c	0,55 a	109,16 c	13,56 a	34,83 de	8,80 a
Ica pijao	3,09 b	0,84 a	135,06 b	16,23 a	74,93 c	9,52 a
Composto chimalongo	1,74 f	0,61 a	86,20 de	15,33 a	117,96 b	4,76 a
Venezuela 350	1,44 g	0,77 a	65,03 g	19,70 a	33,53 de	6,51 a
C. V. (%)	1,71	34,90	3,96	29,50	15,07	37,22
DMS - Tukey 5%	0,10	0,65	1,03	1,42	25,43	8,75

* * Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 3. Valores de peso de nódulos em mg/pl e da atividade em mol de C_2H_4 /pl/ha de 12 cultivares de feijoeiro colhidas 30 dias após o transplante (médias de três repetições).

Cultivares	Peso de nódulos (g/pl)	Ativ. nitrogenase (mole de C_2H_4 /pl/ha)
Porrillo sintético	34,80 bc	2,24
Aroana	40,90 b	1,79
Moruna	81,53 a	2,73
Carioca precoce	28,96 c	1,41
51051	24,70 cd	1,03
N-159	25,66 c	0,63
Carioca	21,33 cd	1,06
México 309	18,40 d	1,46
Negro 325	36,36 b	1,09
Ica pijao	17,16 d	0,93
Comp.negro Chimaltenço	27,66 c	0,59
Venezuela 350	23,36 c	0,63

C. V. (%) 20,8

DMS (Tukey 5%) 8,0

CONCLUSÕES

Baseados nos dados obtidos neste experimento e nas condições em que foi conduzido, pode-se tirar as seguintes conclusões:

- 1) Houve um efeito diferencial entre as cultivares estudadas, no que se refere ao aproveitamento do nitrogênio na forma iônica (NO_3^-);
- 2) As cultivares indicadas para absorção de nitrogênio, na forma iônica são Carioca e Ica pijao;
- 3) Houve uma tendência para as cultivares Aroana, Carioca e Venezuela serem boas fixadoras de nitrogênio;
- 4) Por apresentarem alto aproveitamento do nitrogênio nas duas formas em que lhe foi oferecido, considera-se como melhores cultivares: Carioca precoce e Ica pijao.

LITERATURA CITADA

1. BEEVERS, L. *Nitrogen metabolism in plants*. London, Edward Arnold, 1976, 333 p.
2. BIDWELL, R.G.S. *Plant Physiology*. New York, MacMillan, 1974, p: 173-206.
3. BRILL, W. Biological nitrogen fixation. *Sci. Amer.*, 236(3):68-81, 1977.
4. CROCOMO, O.J. Assimilação do nitrogênio pelas plantas. In: FERRI, M.G. coord. *Fisiologia Vegetal*. São Paulo, EDUSP, 1979, p:179-207.
5. DART, P.J. The infection process. In: QUISPÉL, A. coord. *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, North Holland, 1974, p. 382-396.
6. DOBEREINER, J. & A.P. RUSCHELL. *Fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico em feijão*. I. Influência do solo e da variedade. Rio de Janeiro, Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola. 1961, 16 p. (Comunicado técnico 10).
7. DOBEREINER, J. & N.B. DE ARRUDA. Interrelação entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja (*Glycine max* (L)). *Pesq. Agropec. Bras.*, 2: 475-487, 1967.
8. EVANS, H.J. *Enhancing biological nitrogen fixation*. Washington, National Science Foundation, 1975. 32 p.
9. GUTIERREZ, L.E. & O.J. CROCOMO. Atividade de enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio em raízes de feijoeiro durante o desenvolvimento. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, 7ª, Caxambú, 19 a 22 de abril de 1978. São Paulo, SBPq. C-14.
10. HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, K.E. & BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Phys.*, 43:1185-1207, 1968.
11. HARPER, J.E.; NICHOLAS, J.C. & HAGEMAN, R.H. Seasonal and canopy variation in nitrate reductase activity of soybean leaves. *Plant Physiol.*, 49:448-450, 1972.
12. HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. Sta. Circ.* 347. 1950.
13. MALAVOLTA, E. Absorção e transporte de ions. In: FERRI, M.G. coord. *Fisiologia Vegetal*. São Paulo, EDUSP, 1979. v. 1. p.: 77-95.

14. MONTOJOS, J.C. & MAGALHÃES, A.C. Growth analysis of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Pintado under varying conditions of solar radiation and nitrogen application. *Plant and Soil*, 35:217-233, 1971.
15. RAGGIO, M.N. & TORREY, J.G. The inoculation of isolated leguminous roots. *Amer. J. Bot.*, 44(4):325-334, 1959.
16. RUSCHEL, A.P. & REUZER, H.W. Desenvolvimento de nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em variedades de soja, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. *Pesq. Agropec. Bras.*, Ser. Agron., 8:25-256, 1973.
17. SCHRAUZER, G.N. Nitrogenase model systems and the mechanism of biological nitrogen reduction: advances since 1974. In: NEWTON, W.; POSTGATE, J.R.; C. RODRIGUES BARRUECO, eds. *Recent developments in nitrogen fixation*. Londres, Academic Press, 1977, p.:109-118.
18. SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, 73(4):1207-1211, 1976.