

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FITOTECNIA

TESE DE DOUTORADO

**Efeitos da Extrusão de H^+/OH^- em Plantas de Feijão
Crescidas com Diferentes Fontes de Nitrogênio Sobre o
Início da Formação de Nódulos Radiculares**

Ricardo Antônio Tavares de Macedo

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FITOTECNIA**

**EFEITOS DA EXTRUSÃO DE H^+ / OH^- EM PLANTAS DE FEIJÃO
CRESCIDAS COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE
O INÍCIO DA FORMAÇÃO DE NÓDULOS RADICULARES**

RICARDO ANTÔNIO TAVARES DE MACEDO

Sob a Orientação do Professor
Jorge Jacob Neto

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Outubro de 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

RICARDO ANTÔNIO TAVARES DE MACEDO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM 29/10/2010

Jorge Jacob Neto. D.Sc., UFRRJ
(Orientador)

Silvia Regina Goi. D.Sc., UFRRJ

Vera Lúcia Divan Baldani. D.Sc., Embrapa Agrobiologia

Bruno José Rodrigues Alves. D.Sc., Embrapa Agrobiologia

Jean Luiz Simões Araújo. D.Sc., Embrapa Agrobiologia

AGRADECIMENTOS

Deus, em primeiro lugar, pela combinação de fatores favoráveis ao desenvolvimento, evolução e conclusão deste trabalho, pela luz à mente e força ao corpo para superar os momentos mais críticos.

À família, Janayna Cavati Tavares de Macedo (esposa), Jade Cavati de Macedo (filha) e Vinícius Cavati Tavares de Macedo (filho), por serem os geradores de toda a motivação. Aos pais, irmãos, avós, demais parentes e amigos por toda amizade e apoio prestado.

Ao professor orientador Jorge Jacob Neto pela confiança depositada e companheirismo no transcorrer do curso.

Aos demais orientados do professor Jorge e aos funcionários do Instituto de Agronomia, em especial aos alunos Aldir Carlos Silva, Joice de Jesus Lemos, Sebastião Ferraz Ribeiro Filho, Carlos Vergara Torres Júnior e Ana Karen Afonso Loureiro e às funcionárias Silvana Castelo Branco Geraldo e Elania Rodrigues da Silva, pela fundamental colaboração no dia a dia do laboratório.

Aos integrantes da banca que, mesmo sendo convidados com certa urgência, tiveram fundamental colaboração.

À empresa Algarea S.A., da qual sou funcionário, pelo apoio, estímulo e por conceder momentos preciosos para que eu pudesse estar presente na universidade. Aos integrantes da banca que, mesmo sendo convidados com certa urgência, tiveram fundamental colaboração.

RESUMO

MACEDO, Ricardo Antônio Tavares. **Efeitos da extrusão de H^+/OH^- em plantas de feijão crescidas com diferentes fontes de nitrogênio sobre o início da formação de nódulos radiculares.** 2010. 126f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O feijoeiro pode adquirir nitrogênio da matéria orgânica do solo, de adubos ou da fixação biológica do N_2 atmosférico (FBN). Entretanto, nesta cultura o processo biológico tem apresentado baixa eficiência nas condições de campo. Em função disso, muitos produtores não inoculam as sementes com estirpes eficientes de rizóbio, sendo a adubação a principal fonte de N para esta cultura. Além da ausência da inoculação, altas doses de N aplicadas no solo inibem a nodulação e a FBN. No entanto, as causas para esta inibição não são totalmente esclarecidas, especialmente pelo fato do N ser absorvido na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Considerando que a rizosfera da planta crescida com nitrato é alcalinizada e com amônio é acidificada, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito das alterações de pH rizosférico (pHR), causadas pelo metabolismo destas fontes de N, no início da formação de nódulos. Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com luminosidade média de 400 Lux, fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro) e temperatura de $25^\circ C \pm 2^\circ C$.

As plantas foram crescidas em vasos com areia, solos com baixo (8%) e médio (25%) teor de argila e em solução nutritiva. No 1º ensaio (salinidade) foi verificado que o amônio causou maior elevação da condutividade elétrica da areia (CE), obtendo-se na dose de 60 kgN ha^{-1} o valor de $1.655 \mu\text{S cm}^{-1}$ com amônio e de $1.301 \mu\text{S cm}^{-1}$ com nitrato. No ensaio seguinte foram comparadas 2 cultivares contrastantes quanto à capacidade nodular, que confirmaram a alta (Ouro Negro) e a baixa (Rio Tibagi) capacidade. Como entre as cultivares não ocorreram diferenças expressivas nos valores de pHR, nos demais experimentos avaliou-se apenas a Ouro Negro. Neste ensaio e nos demais o amônio foi a fonte de N que mais acidificou a rizosfera e inibiu a nodulação. Através de análises de regressão para cada fonte de N foi determinada a dose de inibição total da nodulação (nível crítico), pHR nesta dose e a dose onde ocorreu 80% da máxima nodulação (dose de convivência). Em geral, foram observadas as menores doses de NC e de convivência com uso do amônio do que com nitrato.

No ensaio em areia (cv Ouro Negro coletada aos 20 DAE), para amônio e nitrato as doses de convivência foram 13 e 58 kgN ha^{-1} e os valores de pHR 3,95 e 5,59, respectivamente. No ensaio em diferentes tipos de solo (20 DAE), a dose de convivência foi menor com amônio do que com nitrato, sendo no solo com menor teor de argila 18 e 41 kgN ha^{-1} e no solo com maior teor de argila 15 e 27 kgN ha^{-1} , respectivamente. Já os valores de pHR para amônio e nitrato foram 4,69 e 6,08 no solo com menor teor de argila e 4,23 e 4,63 no solo com maior teor de argila, respectivamente. Neste ensaio os neutralizantes aliviaram a acidificação da rizosfera e otimizaram a nodulação. No ensaio com aplicação de N via foliar, o amônio também acidificou a rizosfera e promoveu menor nodulação (pHR 4,15 e 14 nódulos planta⁻¹) em relação ao nitrato (pHR 5,03 e 27 nódulos planta⁻¹). No 6º experimento (20 DAE) a dose de $115 \text{ kgVO}_4 \text{ ha}^{-1}$ permitiu que na mais alta dose de amônio o pHR não sofresse alterações, permitindo também a dose de convivência de 46 kgN ha^{-1} para o amônio. Em todos os ensaios, as mais altas doses de N de todas as fontes suprimiram a nodulação, sugerindo que nestas doses ocorreram fatores inibidores independentes do pH e não mensurados.

Palavras chave: Fontes e doses de nitrogênio, pH da rizosfera, inibição da nodulação.

ABSTRACT

MACEDO, Ricardo Antônio Tavares. **Effects of extrusion of H⁺/OH⁻ in bean plants grown with different nitrogen sources on the early formation of root nodules.** 2010. 126p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Plant Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Bean plants can get nitrogen from soil organic matter, fertilizer or biological fixation of atmospheric N₂ (BNF). However, the biological process in this culture has shown low efficiency under field conditions. As a result, many farmers do not inoculate the seeds with efficient strains of rhizobia, being fertilizer the main source of N to this culture. Besides the absence of inoculation, high doses of N applied to the soil inhibit nodulation and BNF. However, the reasons for this inhibition are not fully understood, especially because the N is uptaken as nitrate (NO₃⁻) and ammonium (NH₄⁺). Whereas the rhizosphere of plants grown with nitrate is alkalized and ammonium is acidified, the aim of this study was evaluate the effect of pH changes in rhizosphere (pHR), caused by the metabolism of these N sources, in start of nodules formation. The experiments were conducted in growth chamber with average brightness of 400 lux, photoperiod of 12/12 hours (light/dark) and temperature 25°C ± 2°C.

Plants were grown in pots with sand, soils with low (8%) and medium (25%) clay content and nutrient solution. In the 1st test (salinity) was found that ammonium had the greatest increase in electrical conductivity of the sand (EC), obtained with a 60 KgN ha⁻¹ the value of 1.655 mS cm⁻¹ with ammonium and 1.301 mS cm⁻¹ with nitrate. In the following assay were compared two contrasting cultivars in capacity of nodulate, which confirmed the high (Ouro Negro) and low (Rio Tibagi) capability. As among cultivars were not significant differences in the values of pHR, in others experiments was evaluated Ouro Negro only. In this assay and in others ammonium was the source of N with more capacity of rhizosphere acidify and inhibit nodulation. Through regression analysis for each N source, was given the dose of total inhibition of nodulation (critical level), pHR at this dose and the dose which was 80% of maximum nodulation (dose of coexistence). In general, was verified the lowest doses of critical level and coexistence using ammonium than with nitrate.

In the sand test (Ouro Negro sampled 20 DAE) for ammonium and nitrate the doses of coexistence was 13 and 58 KgN ha⁻¹ and the values of pHR was 3,95 and 5,59, respectively. In test with different soil types (20 DAE), the dose of coexistence was lower with ammonium than nitrate, being in soil with lower clay content 18 e 41 KgN ha⁻¹ and soil with higher clay content 15 e 27 KgN ha⁻¹, respectively. The values of pHR for ammonium and nitrate were 4,69 and 6,08 in soil with lower clay content and 4,23 and 4,63 in soil with higher clay content, respectively. In this test the neutralizers alleviated acidification of the rhizosphere and nodulation was optimized. In test with leaf application of N, ammonium also more acidify the rhizosphere and promoted less nodulation (pHR 4,15 and 14 nodules plant⁻¹) compared to nitrate (pHR 5,03 and 27 nodules plant⁻¹). In the 6th experiment (20 DAE) the dose of 115 kgVO₄ ha⁻¹ allowed that highest dose of ammonium did not make changes in pHR, allowing also the dose of coexistence of 46 KgN ha⁻¹ for ammonium as source of N. In all tests, the highest N rates from all sources completely inhibited nodulation, suggesting that these doses were the occurrence of others inhibiting factors independent of pH and not measured.

Keywords: Sources and doses of nitrogen, rhizosphere pH, inhibition of nodulation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Importância Agronômica do <i>Phaseolus vulgaris</i> L. no Brasil.....	3
2.2. Demanda nutricional do feijoeiro.....	3
2.3. Dinâmica do nitrogênio no solo.....	4
2.4. Fontes de nitrogênio para a cultura do feijão.....	5
2.4.1. Nitrato como fonte de N.....	6
2.4.2. Amônio como fonte de N.....	6
2.4.3. Fixação Biológica do Nitrogênio Atmosférico (FBN) como fonte de N.....	7
2.4.4. Custo metabólico vegetal para as diferentes fontes de N.....	9
2.5. Vanadato como inibidor da H ⁺ -Atpase (bomba de prótons).....	10
2.6. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão.....	11
2.7. Influência do pH do solo na eficiência da FBN.....	13
2.8. Alga marinha lithothamnium como neutralizante de acidez.....	15
2.9. Definição do ambiente rizosfera.....	16
2.10. Balanço iônico vegetal.....	17
2.11. Inibição da nodulação causada pelo nitrogênio mineral.....	19
2.12. Relações entre balanço iônico e atividade microbológica na rizosfera.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Cultivares de feijão, estirpes de rizóbio e inoculação.....	21
3.2. Local de Crescimento das Plantas.....	21
3.3. Experimentos.....	22
3.3.1. Experimento 1. Avaliação preliminar dos efeitos das soluções com nitrogênio (utilizadas nos experimentos seguintes) na condutividade elétrica do substrato areia.....	22
3.3.2. Experimento 2. Efeito da aplicação de fontes nitrogenadas na nodulação - Efeito do pH da rizosfera do feijoeiro cultivado em areia.....	22
3.3.3. Experimento 3. Inibição da nodulação do feijoeiro cultivado em diferentes tipos de solo: Parte I - Efeito do poder tampão do solo sem correção da acidez; Parte II - Efeito do poder tampão do solo com correção da acidez.....	23
3.3.4. Experimento 4. Liberação de OH ⁻ /H ⁺ na solução nutritiva proveniente do metabolismo de nitrogênio aplicado via foliar aos 4 DAE.....	25
3.3.5. Experimento 5. Liberação de OH ⁻ /H ⁺ na rizosfera e nodulação do feijoeiro suprido com nitrogênio aplicado via foliar aos 4 e 6 DAE - Cultivo em areia.....	25
3.3.6 Experimento 6. Influência da presença de um inibidor da bomba de prótons - Efeito das fontes nitrogenadas no pH da rizosfera e na nodulação do feijoeiro.....	26
3.4. Parâmetros avaliados nos experimentos.....	26
3.4.1. Condutividade elétrica.....	26
3.4.2. Produção de nódulos (número e massa seca).....	26
3.4.3. pH da rizosfera.....	26
3.5. Análises de estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Experimento 1. Avaliação preliminar dos efeitos das soluções com nitrogênio (utilizadas nos experimentos seguintes) na condutividade elétrica do substrato areia.....	28
4.2. Experimento 2. Efeito da aplicação de fontes nitrogenadas na nodulação - Efeito do pH da rizosfera.....	29

4.3. Experimento 3. Inibição da nodulação do feijoeiro cultivado em diferentes tipos de solo: Parte I - Efeito do poder tampão do solo sem correção da acidez; Parte II - Efeito do poder tampão do solo com correção da acidez.....	42
4.4. Experimento 4. Liberação de OH^-/H^+ na solução nutritiva proveniente do metabolismo de nitrogênio aplicado via foliar aos 4 DAE.....	64
4.5 Experimento 5. Liberação de OH^-/H^+ na rizosfera e nodulação do feijoeiro suprido com nitrogênio aplicado via foliar aos 4 e 6 DAE – Cultivo em areia.....	66
4.6. Experimento 6. Influência da presença de um inibidor da bomba de prótons - Efeito das fontes nitrogenadas no pH da rizosfera e na nodulação do feijoeiro.....	67
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1. Nitrogênio <i>versus</i> nodulação.....	85
5.2. Aplicação do nitrogênio via foliar, nodulação e pH da rizosfera.....	90
5.3. Cultivo em areia com a presença do vanadato - inibidor da bomba de próton.....	93
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

Em países como o Brasil, que possui grandes áreas agricultáveis e ao mesmo tempo uma população crescente e com baixa condição sócio-econômica, a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) mostra-se cada vez mais presente em atividades de subsistência, fato comum em diversos países latinos e africanos, sendo na maioria dos casos a principal fonte de proteína na dieta das populações (CIAT, 1990).

Quando se considera a produção de feijão em escala comercial predominam no cenário agrícola nacional as pequenas e médias propriedades, estando as lavouras com certos investimentos restritas apenas a algumas regiões dos Cerrados de Goiás e de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo (YOKOHAMA et al., 1996) onde o manejo de irrigação e adubação tem possibilitado a geração de incrementos na produtividade. A consequência do predomínio de lavouras de feijão com dimensões reduzidas é o baixo nível de tecnificação empregado no cultivo deste cereal, quando comparado a outras culturas de grãos como a soja e o milho, resultando na obtenção de baixos níveis produtivos. No ano de 2008, a área colhida de feijão no Brasil foi de aproximadamente 3,8 milhões de hectares, considerando as três safras anuais, com rendimentos médios pouco superiores a 900 kg de grãos por hectare (FAO, 2010).

No pacote tecnológico necessário à plenitude produtiva da cultura do feijão o manejo da fertilidade do solo é um fator que merece destaque, principalmente considerando a correção da acidez e o fornecimento de nutrientes. Dentre os elementos essenciais aos vegetais, o nitrogênio é o requerido em maior quantidade, podendo no caso do *Phaseolus vulgaris* L. ser obtido pela absorção radicular na forma mineral nítrica e/ou amoniacal ou através da fixação biológica do N₂ atmosférico (FBN) por meio de associação com bactérias simbióticas (rizóbios) introduzidas ao sistema através da inoculação das sementes.

Devido ao fato de o nitrogênio apresentar-se como um insumo de elevado custo para o produtor e da necessidade de serem gerados incrementos na produtividade das lavouras nacionais de feijão, estudos que busquem otimizar a interação entre a fixação biológica de nitrogênio e o uso de nitrogênio mineral são extremamente importantes (FRANCO et al., 2002), especialmente sabendo-se que nesta cultura a magnitude do processo biológico muitas vezes não permite que todo o nitrogênio requerido seja obtido através desta fonte. Nas condições tropicais, por exemplo, a FBN na cultura do feijão tem sido pouco eficiente. Várias hipóteses foram testadas para explicar essa baixa eficiência, entre elas podemos citar o aprimoramento de estudos com estirpes que devem apresentar alta competitividade e efetividade no solo (RAPOSEIRAS et al., 2006), o efeito direto do pH do solo (MORÓN, et al., 2005), temperatura e umidade do solo (HUNGRIA & FRANCO, 1993) e a deficiência mineral, principalmente do fósforo (CHAGAS et al., 2007) e do molibdênio (JACOB-NETO, 1985; JACOB-NETO et al., 1988; JACOB-NETO & FRANCO, 1995).

Nas últimas décadas a pesquisa na área de FBN com feijoeiro concentrou esforços na tentativa de aumentar a sua eficiência, porém não ocorreram grandes avanços tecnológicos capazes de tornar a inoculação das sementes a forma de fornecer todo o nitrogênio que a planta requer, assim como foi obtido na cultura soja. Por esta razão, vários autores têm proposto o uso de nitrogênio mineral complementar ou como fonte única de suprimento do elemento para a planta, especialmente quando se espera produtividades elevadas da cultura (ROSOLEM, 1987; TSAI et al., 1993).

Diversos autores afirmam que doses de nitrogênio normalmente utilizadas nas lavouras de feijão inibem a nodulação e a presença de nódulos funcionais (PUIATTI, 1997), porém, a FBN pode se expressar se forem utilizadas baixas dosagens de N-fertilizante e um balanço adequado dos demais nutrientes, podendo ocorrer um efeito sinérgico ao invés de inibidor (TSAI et al., 1993). A razão pela qual a presença do nitrogênio mineral inibe as

etapas iniciais do processo de formação dos nódulos e a FBN é alvo de muitas discussões entre os pesquisadores. Enquanto os estudos têm sido direcionados aos efeitos da aplicação de nitrogênio mineral em plantas fixando nitrogênio da atmosfera, pouca relevância tem sido dada às diferentes formas de nitrogênio mineral que as plantas conseguem absorver, mais especificamente os íons nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Por se tratar de um ânion e um cátion, respectivamente, ao serem absorvidos promovem diferentes variações eletroquímicas na rizosfera, modificando variavelmente o pH desta região.

De acordo com HINSINGER et al. (2003), a maioria dos processos que contribuem para mudanças no pH da rizosfera ocorre pela liberação de H^+ ou OH^- pela planta para compensar o desbalanço cátion/ânion proveniente da absorção de íons pela raiz, caracterizando o balanço iônico vegetal. Neste caso a absorção do ânion nitrato e do cátion amônio promove a alcalinização e a acidificação, respectivamente (RAVEN et al., 1990; JACOB-NETO, 2003). Como o processo inicial de formação dos nódulos requer a colonização da rizosfera pelo rizóbio e envolve um complexo sistema de trocas de sinais entre a planta hospedeira e o microssimbionte (VARGAS et al., 2002), quaisquer alterações eletroquímicas nesta região são suficientes para modificar a magnitude deste processo, o que representa um impacto direto sobre a FBN. CARVALHO (2003) constatou que a absorção de fontes de nitrogênio de diferentes cargas elétricas influenciou o pH e a colonização de *Fusarium sp* nas raízes de tomateiro cultivado em solução nutritiva. Foi verificado que a fonte nítrica proporcionou os maiores valores no pH da solução e favoreceu o desenvolvimento radicular, com aumentos no número e tamanho dos pêlos radiculares, além da redução da taxa de adesão de conídios e colonização por *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

Baseado em fundamentações desta natureza o presente trabalho parte da hipótese que as variações de pH ocorridas na rizosfera do feijoeiro, devido ao balanço iônico da planta afetado pelo metabolismo de fontes nitrogenadas (nitrato e amônio), exercem influência sobre a colonização e infecção pelo rizóbio e, conseqüentemente, sobre a iniciação da formação de nódulos radiculares. Por se tratar de uma cultura em que o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico é muito instável e errático, este trabalho teve o objetivo de identificar, simultaneamente, a fonte e a dosagem de nitrogênio mineral de maior impacto nas alterações do pH rizosférico e na nodulação do feijoeiro. Foram também determinadas, para cada fonte de nitrogênio, as doses de nitrogênio de inibição total da nodulação, com o valor de pH rizosférico ocorrido nesta dosagem, e a dose de convivência do nitrogênio com a nodulação (dose na qual ocorreu 80% da nodulação máxima).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância Agronômica do *Phaseolus vulgaris* L. no Brasil

Tanto a origem evolutiva como a diversificação primária do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tiveram surgimento a partir da América central e América do Sul (CNPAF, 2007), mas o local exato destas ocorrências ainda é um motivo de muita controvérsia entre os pesquisadores (FREITAS, 2006). Em países como o Brasil, que possuem grandes áreas agricultáveis e ao mesmo tempo uma população crescente e com baixa condição sócio-econômica, a cultura do feijão comum mostra-se cada vez mais presente em atividades de subsistência, sendo em muitos casos a principal fonte de proteína na dieta da população, fato comum em países latinos e africanos (CIAT, 1990).

Com exceção de algumas áreas irrigadas sob pivô nos Cerrados de Goiás, Minas Gerais e Bahia onde são atingidos razoáveis níveis de produtividade (YOKOHAMA et al., 1996), as áreas de produção de feijão no Brasil são constituídas em grande parte por pequenas propriedades, onde o agricultor dificilmente emprega o nível tecnológico requerido pela cultura e, por conseqüência, a produtividade raramente ultrapassa 1000 kg de grãos ha⁻¹ (FAO, 2010).

Partindo do princípio que a expressão de caracteres desejados na planta e a elevação dos seus níveis produtivos são dependentes da associação entre a carga genética e o ambiente onde o genótipo está inserido (PEIXOTO et al., 2002), programas de melhoramento genético de diversas entidades de pesquisa têm há décadas tentado avançar sobre fronteiras para a expansão da cultura no país, através da geração de novas cultivares para as diferentes regiões do Brasil com base na preferência regional pelo tipo comercial de grão. O objetivo geral é a geração e indicação de cultivares mais produtivas, menos sensíveis aos estresses bióticos e abióticos e com características que atendam às exigências dos consumidores.

Apesar da boa capacidade de adaptação em várias regiões do Brasil a cultura do feijão é muito sensível às diversas condições climáticas, edáficas e fitossanitárias (JAUER et al., 2006). Em relação ao clima, fatores como baixa disponibilidade de água (REZENDE et al., 2002) e altas temperaturas (SILVA et al., 2007) podem restringir drasticamente os índices produtivos da cultura, assim como os baixos níveis de fertilidade e a acidez do solo comprometem substancialmente o estabelecimento da cultura no campo e a produtividade em níveis satisfatórios (CNPAF, 2003).

2.2. Demanda Nutricional do feijoeiro

Solos de baixa fertilidade no Brasil destinados ao cultivo de espécies como *Phaseolus vulgaris* L. requerem constantes correções em suas propriedades químicas, através da elevação do pH e do fornecimento equilibrado de nutrientes para que as culturas atinjam níveis desejáveis de produtividade com grãos de qualidade (TEIXEIRA, 2002). O agricultor deve fazer uma análise prévia e cuidadosa para a adequação da adubação para a obtenção da maior eficiência dos fertilizantes e melhor retorno econômico. Portanto, uma recomendação de adubação que atenda a estes princípios deve ser fundamentada em aspectos agrônômicos, tais como, resultados de análise de solo complementada pela análise de planta, análise do histórico da área, conhecimento agrônômico da cultura, exigências da cultivar, comportamento dos fertilizantes no solo, disponibilidade de capital do agricultor para aquisição de fertilizantes, expectativa de produtividade (CNPAF, 2003).

Vários são os fatores que determinam a quantidade de fertilizante nitrogenado a ser aplicada, entre eles a expectativa de rendimento, a época de plantio e a quantidade e tipo de

resíduo existente na superfície do solo. Porém, é comum o uso de 60 a 150 kg N ha⁻¹ com recomendação de aplicação em duas vezes. No caso do fósforo e do potássio aplica-se normalmente de 60 a 120 kgP₂O₅ ha⁻¹ e 30 a 90 kgK₂O ha⁻¹, dependendo das quantidades existentes no solo (CNPAF, 2003). ANDRADE et al. (2004) citam que de acordo com os teores de nutrientes encontrados em diversas partes da planta de feijão sua exigência nutricional para macro e micronutrientes em ordem decrescente é a seguinte: N, K, Ca, Mg, S, P, Fe, Mn, B, Zn e Cu e a exportação pelos grãos: N, K, P, S, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, B e Cu. Em 1 tonelada de grãos a exportação média de nutrientes (kg ha⁻¹) corresponde a 35,5 de N; 4,0 de P; 15,3 de K; 3,1 de Ca; 2,6 de Mg e 5,4 de S.

2.3. Dinâmica do Nitrogênio no Solo

Mesmo em sistemas conservacionistas como o plantio direto, que preconizam a manutenção da palhada no sistema e elevam consideravelmente os teores de carbono e nitrogênio do solo (SÁ et al., 2001), a adubação nitrogenada é indispensável principalmente devido às elevadas quantidades de nutriente exportado do sistema pela colheita das culturas (ALVES et al, 2006). No caso de plantas como o feijoeiro, além das fontes minerais nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺), a FBN aparece como um importante processo para compensar as freqüentes perdas de N no sistema através de diversos eventos ocorridos no solo, assim como a exportação do N nos grãos pela colheita (MEYER, 1997). A Figura 1 a seguir resume o ciclo de N em um sistema de produção agrícola com a planta leguminosa utilizando a FBN como uma das fontes de nitrogênio e as várias formas de perdas de nitrogênio do sistema.

O fornecimento, utilização e perdas do nitrogênio formam um ciclo complexo, denominado “ciclo do N” (HUNGRIA et al., 2001). Conforme o exposto na Figura 1, além dos fertilizantes minerais nitrogenados, a exemplo de uréia e sulfato de amônio que são os mais empregados em lavouras comerciais, as demais fontes de N para a planta de feijão são o solo através da decomposição da matéria orgânica e a fixação biológica do nitrogênio do ar atmosférico (HUNGRIA et al., 1997).

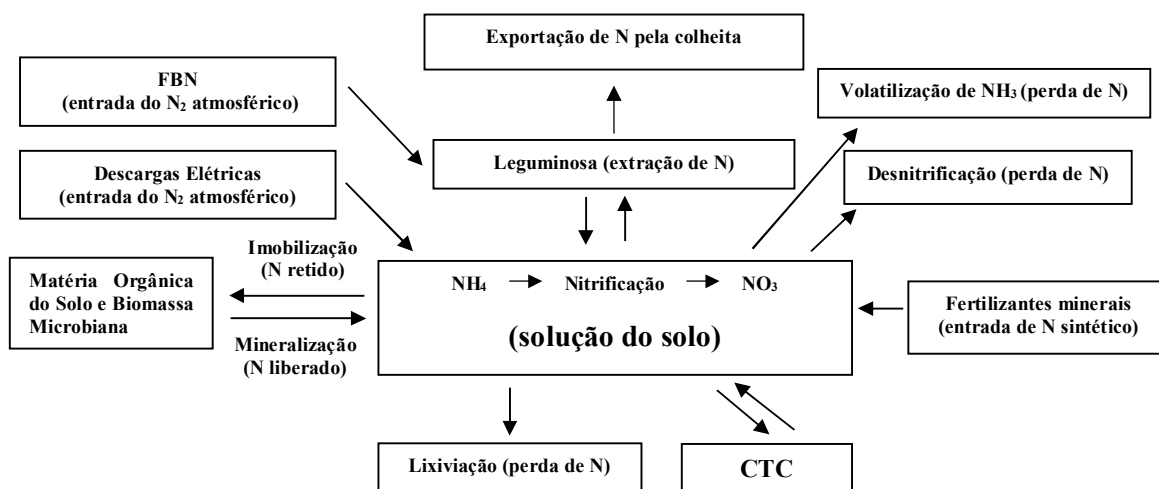


Figura 1. Principais vias de entrada e saída de nitrogênio no solo cultivado com planta fixadora de nitrogênio (adaptado de MACEDO 2003).

A importância do aproveitamento do nitrogênio pelo processo biológico em comparação ao uso de nitrogênio essencialmente sintético representa para o produtor uma forma substancial de viabilizar economicamente a produção. HUNGRIA et al. (1997)

destacam que, tal como ocorre no processo simbiótico com o rizóbio, na produção industrial de fertilizantes nitrogenados o processo transforma o N_2 atmosférico em amônia, só que neste caso em uma síntese química onde são requeridos hidrogênio (derivado de gás de petróleo), catalisador contendo ferro, temperaturas na faixa de 300 a 600°C e altas pressões (200 a 800 atm). O elevado custo da produção química de fertilizantes nitrogenados, onde se estima o gasto de seis barris de petróleo para a produção de uma tonelada de amônia, é embutido nos preços dos fertilizantes e estes consumidos em larga escala nos sistemas produtivos mundiais. Neste contexto, deve-se considerar ainda que a eficiência do aproveitamento do nitrogênio mineral pelas plantas é normalmente inferior a 50% devido às constantes perdas que ocorrem de diferentes formas (Figura 1), o que além de reduzir ainda mais a viabilidade da produção resulta em grandes quantidades de N lançadas livremente no meio ambiente (HUNGRIA et al., 2001).

2.4. Fontes de Nitrogênio para a Cultura do Feijão

Na absorção radicular, o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) são as formas minerais absorvíveis de N do solo. A magnitude da absorção de cada forma de N depende de fatores inerentes à sua dinâmica no solo, onde as concentrações de $N-NO_3^-$ ou de $N-NH_4^+$ vão depender de condições ambientais e fatores inerentes à planta, podendo apresentar alta variabilidade entre as diversas espécies e variedades cultivadas. Uma vez presente no citoplasma celular o amônio deve ser incorporado a esqueletos de carbono provenientes da parte aérea, em um processo intermediado pelo grupo de enzimas do complexo GS/GOGAT com gasto de ATP e poder redutor, evitando a geração de efeitos tóxicos na planta (BRITO & KROZKUCKER, 2002).

O nitrato quando absorvido pode seguir por três vias de acordo com o status metabólico da planta: redução a amônio seguida da assimilação amoniacal na raiz, estocagem no vacúolo para posterior redução e assimilação e translocação para a parte aérea pelo xilema. Após ser absorvido pelas células da folha o nitrato poderá novamente ser reduzido e assimilado ou estocado no vacúolo (SANTOS, 2006).

A absorção, que é caracterizada como a passagem do íon pela plasmalema, ocorre de forma diferente para cada fonte de N presente na solução do solo. O NO_3^- é absorvido ativamente contra um gradiente de potencial eletroquímico da membrana plasmática em um cotransporte (simporte) com prótons (MCCLURE et al., 1990). A concentração de nitrato na solução do solo, em constantes flutuações, encontra-se na faixa de 0,1 a 5 mM e no interior de células exposta ao nitrato na faixa de 5 a 30 mmol L^{-1} (SANTOS, 2006), evidenciando que em condições normais o gasto energético com a absorção do nitrato consome ATP.

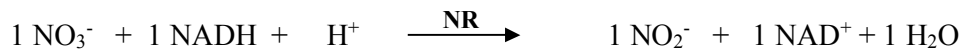
Esta energia necessária para o funcionamento dos transportadores de nitrato é obtida, indiretamente, a partir da energia potencial promovida pela ação da força próton motriz gerada pelas bombas de prótons (H^+ -ATPases) membranares (RODRIGUES, 2005), que libera prótons da membrana para criar um gradiente de potencial eletroquímico entre o exterior e o interior da célula. Como a absorção de nitrato ocorre em um simporte com $2H^+$ liberados pela célula (SANTOS, 2006) e assumindo que para cada H^+ liberado é hidrolisado 1 ATP, considera-se que na absorção de nitrato são gastos 2 ATP para a absorção de 1 nitrato em um processo que alcaliniza o apoplasto e, conseqüentemente, a rizosfera (HINSINGER et al., 2003).

A absorção de NH_4^+ se dá a favor do gradiente de potencial eletroquímico da membrana, em um processo denominado absorção passiva, através de um transportador do tipo uniporte (SANTOS, 2006). Como o influxo de NH_4^+ para o interior da célula vegetal é retardado pela inibição das H^+ -ATPases da membrana plasmática autores como HOWITT &

UDVARDI (2000) concluem que a absorção de NH_4^+ também é dependente das variações nas cargas entre o citossol e o apoplasto, controladas pelas bombas de prótons.

2.4.1. Nitrato como fonte de N

O Nitrato após atravessar a plasmalema pode sofrer a ação da enzima Nitrato Redutase (NR) e da Nitrito Redutase (NiR) para ser assimilado, pode ser armazenado no vacúolo ou pode ser exportado para a parte aérea pelo xilema (SANTOS, 2006). Quando reduzido pela NR passa à forma de nitrito (NO_2^-) ainda no citoplasma, sendo as outras etapas de redução e assimilação ocorridas nos plastídios, como mostrado nas equações abaixo:



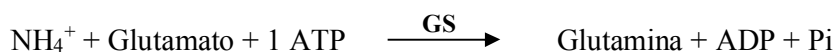
Neste processo 1 NADH (poder redutor) é oxidado a NAD^+ . A NR transfere um íon hidreto do NADH e um próton para o nitrato, produzindo o nitrito. Este produto da redução do nitrato (nitrito) é tóxico, devendo ser rapidamente reduzido através da enzima nitrito redutase (NiR) a forma amoniacal (NH_4^+), no interior dos plastídios.



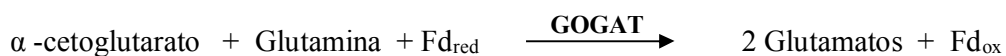
A enzima nitrito redutase transfere seis elétrons de seis átomos de ferredoxina reduzida (Fd_{red}) para o nitrito, produzindo 1 amônio. Em tecidos fotossintetizantes a ferredoxina reduzida é produzida através da fotofosforilação no cloroplasto, enquanto em tecidos não fotossintetizantes ou no escuro a ferredoxina reduzida é gerada a partir do NADPH, proveniente da via das pentoses-fosfato por ação da enzima ferredoxina NADP^+ redutase (SOUZA et al., 2002).

2.4.2. Amônio como fonte de N

A forma assimilável de nitrogênio sendo o íon amônio (NH_4^+), pode no caso do feijão, ser proveniente da solução do solo (absorção direta), da redução do nitrato (mostrada acima) ou da redução do N_2 atmosférico através da FBN (detalhada mais adiante). O amônio é incorporado à estrutura orgânica da planta através da formação inicial de glutamina. A enzima Glutamina Sintetase (GS) incorpora amônio formando a glutamina, através da ligação do NH_4^+ ao grupo carboxílico do glutamato, usando energia fornecida pelo ATP (SOUZA et al., 2002), como pode ser observado na reação a seguir:



O processo de assimilação segue com a ação de outra enzima (GOGAT = Glutamato Oxo-Glutarato Amônio Transferase), que produz dois glutamatos a partir da Glutamina (sintetizada anteriormente pela GS) e do α -cetoglutarato (esqueleto de carbono proveniente da parte aérea), com o gasto de poder redutor (Fd_{red} = ferredoxina reduzida):



Dos 2 glutamatos formados 1 retorna para novamente entrar no processo assimilatório de N, se ligando a outro amônio, e o outro segue para a síntese de outras moléculas orgânicas como as amidas e os ureídeos. Em plantas de feijão a assimilação do nitrogênio ocorre tanto nas raízes quanto nas folhas (SILVEIRA et al., 2001). Neste último caso o amônio é

proveniente da redução na folha do nitrato translocado das raízes (SANTOS, 2006; LAWLOR, 2002) e a atividade do complexo GS/GOGAT ocorre nos cloroplastos. Na raiz a atividade deste complexo se dá nos proplastídios.

OAKS & HIREL (1985) mencionam que na folha a regeneração de energia para as reações de redução e assimilação do nitrogênio ocorre, predominantemente, nos cloroplastos através da produção fotossintética de ATP. Nas células radiculares a oxidação de açúcares ou produtos derivados é a forma de fornecer energia para a regeneração do ATP (SOUZA et al., 2002), indicando que dependendo do órgão onde o nitrogênio é metabolizado o custo energético para a planta poderá ser menor (folha) ou maior (raiz) devido às diferentes necessidades da realização de catabolismo do carbono orgânico para a geração de ATP.

2.4.3. Fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) como fonte de N

A fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico ocorre através da interação entre a planta hospedeira e um grupo de bactérias genericamente denominado rizóbio, onde o microorganismo quebra a tripla ligação do N₂ atmosférico, por meio da enzima nitrogenase e o transforma em amônio, sendo assimilado em aminoácidos e a planta fornece fotoassimilados como fonte de energia para o desenvolvimento e manutenção dos nódulos (MAHON, 1979). As etapas iniciais da FBN ocorrem mediante uma complexidade de processos envolvendo a bactéria e a planta hospedeira, desde trocas de sinais moleculares e alterações fisiológicas e morfológicas até a formação dos nódulos.

No processo de nodulação a planta hospedeira libera compostos, como antocianinas e flavonóides no caso do feijoeiro (ARAÚJO et al, 1996), que fazem com que as bactérias sejam atraídas às raízes por quimiotactismo (DROZDOWICZ, 1991) e colonizem a rizosfera, região ao redor da raiz controlada pela planta onde ocorre intensa absorção de água e nutrientes, constante liberação de compostos pelas raízes e alta atividade microbiológica (DARRAH, 1993). As bactérias se aderem aos pêlos da raiz do feijoeiro e compostos químicos que atuam como sinais moleculares induzem a transcrição de genes de nodulação nas bactérias conduzindo à síntese dos fatores Nod.

Os fatores Nod são moléculas orgânicas de lipoquitoligossacarídeos (LCOs) responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira (LIMPENS & BISSELING, 2003). Estas moléculas induzem a várias respostas na planta, como a intensificação da divisão de células do córtex radicular, deformação dos pêlos radiculares e a transcrição de genes relacionados à nodulação nos pêlos radiculares (FISHER & LONG, 1992; LIMPENS & BISSELING, 2003).

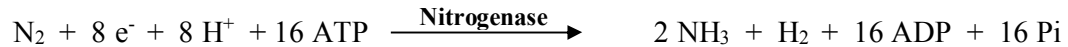
A deformação dos pêlos radiculares faz com que grupos de bactérias sejam envolvidos e degradem regiões da parede celular levando à invaginação da membrana plasmática (plasmalema). No interior do pêlo radicular as bactérias usam o canal formado pela invaginação da plasmalema, dando origem ao cordão de infecção. Este cordão se estende em direção às células em divisão no córtex radicular, onde grupos de bactérias presentes no interior de vesículas membranosas são liberados dentro do citoplasma das células vegetais do primórdio nodular. É também conhecido o processo de infecção radicular pelo rizóbio nas fendas de emergência de raízes laterais (SMIT et al., 1992), verificada em gramíneas como trigo e arroz (WEBSTER et al., 1997) e em amendoim (MORGANTE et al., 2005), porém com menos importância em leguminosas como a soja e o feijão onde estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium leguminosarum* infectam primordialmente os pêlos radiculares (VAN RHIJN & VANDERLEYDEN, 1995). Em condições de estresse, como a ocorrência de toxidez de alumínio, pode ser encontrado a presença de rizóbio nos espaços intercelulares e a formação desordenada de cordão de infecção nas células de raízes de plantas

de feijão, caracterizando um processo anormal de formação de nódulos (JACOB-NETO, 1993).

No processo de formação e crescimento dos nódulos o suprimento de energia, demandada em grandes quantidades, é mantido pela planta a partir do fornecimento de fotoassimilados. A partir do estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias mudam de forma e tamanho e perdem a motilidade, passando a ser denominadas bacteróides, e o suprimento de carboidratos tem a função de fornecer energia e poder redutor aos microorganismos e células corticais, assim como esqueletos de carbono para o transporte do nitrogênio fixado (ALCANTARA & REIS, 2008).

A quantidade de carboidratos fornecidos pela planta hospedeira aos nódulos tem influência direta na eficiência da FBN (VANCE & HEICHEL, 1991), especialmente em plantas de alta eficiência fotossintética e com elevada capacidade de fornecimento de carbono à FBN no período em que o processo apresenta a maior demanda.

A equação geral da FBN ocorrida no interior dos nódulos apresentada por diversos autores (FISCHER & NEWTON, 2002; MOAT et al., 2002; GILLER & WILSON, 1993; SCHULZE, et al., 1994; MARSCHNER, 1995; PIMENTEL, 1998;) é a seguinte:



Cada molécula de amônio fixado biologicamente necessita de 8 ATP, 4 elétrons e 4 H⁺, uma vez que uma molécula de amônio é formada a partir 1N do N₂ atmosférico. Dos produtos da fotossíntese a sacarose aparece como a principal fonte de energia para os nódulos, sendo enzimaticamente metabolizada a dicarboxilados, como malato, succinato, fumarato, aspartato e oxaloacetato (YURGEL & KAHN, 2004), que suprirão a demanda energética dos bacteróides no processo de FBN. Além destes, outros açúcares, como glicose, inositol, arabinose e frutose também podem servir de fonte de carbono para os microssimbiontes (ALCANTARA & REIS, 2008).

A nitrogenase possui dois componentes protéicos estruturais, a Fe-proteína (homodimérica), codificada pelo gen nifH, e a Mo-Fe proteína (tetramérica), codificada por nifD e nifK, (MYLONA, et al., 1995). Na reação são usados 6e⁻ para reduzir N₂ a NH₃⁺ e posteriormente 2e⁻ para reduzir H⁺ ao gás H₂. A Fd_{ox} é reduzida com o gasto de 16 ATP passando a forma reduzida (Fd_{red}), na unidade homodimérica da nitrogenase, que reduz a unidade tetramérica e por fim esta reduz o N₂ a NH₃⁺.

No interior dos nódulos a produção de ATP se dá primordialmente pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (SCHUBERT, 1986) através do consumo de malato (GRAHAM & VANCE, 2000) e succinato que entram diretamente neste ciclo para serem metabolizados (ALCANTARA & REIS, 2008). A Leghemoglobina (hemoglobina das leguminosas) é a controladora dos teores oxigênio nos nódulos, cujos níveis ótimos requerem uma concentração não muito elevada, o que ocasionaria a oxidação da nitrogenase e perda da eficiência dos processos de redução do N₂, e nem muito baixo, que reduziria a síntese aeróbica de ATP no ciclo de Krebs (SCHUBERT, 1986). O primeiro produto da fixação do N₂ é a amônia, que é convertida a amônio e este transferido do bacteróide através da membrana peribacteroidal para o simplasto da planta hospedeira. Os passos seguintes para as reações de assimilação do nitrogênio fixado biologicamente seguem a mesma forma do amônio absorvido pela raiz, em processos mediados pelas enzimas assimilatórias glutamina sintetase (GS) e glutamato sintetase no complexo GS/GOGAT.

2.4.4. Custo metabólico vegetal para as diferentes fontes de N

Os esqueletos de carbono derivados da fotossíntese e a energia química na forma de ATP e poder redutor (NADH) provenientes da fotofosforilação e da respiração celular, processos que ocorrem no cloroplasto e na mitocôndria, respectivamente, constituem a base energética para o metabolismo do nitrogênio na planta (BLOOM et al., 1992). Os processos metabólicos para as diferentes formas de nitrogênio utilizadas pela planta requerem diferentes níveis de consumo de energia. Após absorvido o nitrato necessita ser reduzido duas vezes antes de ser convertido a amônio sendo esta a forma de nitrogênio assimilável pela planta.

O fato de o nitrato ter que ser reduzido com gasto de NADH sugere que esta seja a fonte de nitrogênio que representa um maior custo metabólico à planta em relação ao amônio, que já se apresenta na forma reduzida. Para a redução do nitrato nas raízes SOUZA et al. (2002) destacam que a energia para a regeneração de NADH utilizado na ativação das enzimas Nitrato Redutase e Nitrito Redutase provém da oxidação de açúcares no citossol de células das raízes, o que significa um gasto direto de carbono. Neste caso, a utilização de nitrogênio na forma de amônio proporciona um menor catabolismo de carboidratos na raiz, sendo esta fonte de N mineral uma economia de carbono para a planta em relação à forma nítrica (BLACQUIÈRE, 1987).

Estas argumentações são mais relevantes para plantas que reduzem grandes quantidades de nitrato nas raízes. Como em plantas leguminosas consideráveis quantidades de nitrato são reduzidas nas folhas, onde a energia metabólica é produzida nos cloroplastos durante a etapa fotoquímica da fotossíntese (SANTOS, 2006), estima-se que para estas plantas exista uma expressiva economia de carbono. Comparando as fontes minerais nitrato e amônio em *Phaseolus vulgaris* L. ZERIHUN et al. (1998) mencionam que os custos metabólicos para a conversão das formas inorgânicas de N em aminoácidos são menos expressivos do que os custos envolvidos no consumo de fotossintatos para a síntese de proteínas. Com o uso de nitrato e amônio foram consumidas 2,387 e 1,773 gramas de glicose por grama de proteína produzida, respectivamente, mostrando que a demanda energética para a síntese protéica foi maior com o nitrato do que com o amônio.

Segundo SASAKAWA et al. (1986) é de alto interesse que nos estudos de balanço de carbono, para a geração de ATP e poder redutor, em plantas sob diferentes fontes de N seja feita não só a comparação entre plantas supridas com nitrato e amônio, mas também a inclusão de comparações entre plantas noduladas e não noduladas. A elevada demanda energética da FBN exige que a planta fixando N forneça uma elevada quantidade de carbono na forma de fotoassimilados para os nódulos (NEVES & HUNGRIA, 1987; PIMENTEL, 1998), onde os custos energéticos envolvidos na FBN estão associados com a formação e manutenção dos nódulos (MAHON, 1979), incorporação do amônio em aminoácidos e translocação dos compostos orgânicos para a parte aérea (PATTERSON & LARUE, 1983). Na cultura da soja, estes autores verificaram um custo energético de 5,8 mgC/mgN fixado biologicamente, enquanto RYLE et al. (1984), nesta mesma cultura, detectaram um custo respiratório médio de 11 mgC/mgN fixado (durante a fase de desenvolvimento vegetativo da planta e início da fase reprodutiva) e de 12,5 mgC/mgN fixado (durante a fase de enchimento de grãos).

SCHULZE et al. (1999) determinaram em plantas de ervilha noduladas (*Pisum sativum*) uma taxa de respiração de 134 mg de C durante um período de 14 dias somente para manter a redução do N₂ atmosférico. Isto representou 176% acima do total de incremento de carbono na matéria seca da raiz, cuja incorporação foi de 76 mg de carbono nesses 14 dias. Ainda nesta cultura VOISIN et al. (2003) verificaram que a FBN promoveu um custo metabólico de 4.0 a 6.7 gC/gN, de acordo com a fenologia da planta, evidenciando que a

magnitude da FBN está relacionada à produção de fotoassimilados pela planta e ao suprimento destes ao processo simbiótico.

A ocorrência de custos no metabolismo do N_2 atmosférico superiores aos custos do metabolismo do nitrogênio do solo está atribuído à demanda de energia adicional para a produção e manutenção dos nódulos (MAHON, 1979). Comparando os custos metabólicos da FBN e do nitrato (fonte mineral de maior demanda energética) em feijão caupi (*Vigna Unguiculata* L.) ATKINS et al. (1980) constataram nas plantas noduladas e sem adubo mineral as maiores taxas de produção e translocação de fotoassimilados da parte aérea para as raízes, e conseqüentemente consumo destes para a produção de energia usada na assimilação do nitrogênio atmosférico em relação às plantas adubadas com nitrato. As plantas noduladas apresentaram taxas respiratórias nas raízes (atividade metabólica) na ordem de 366 mgC/planta no período de 46 a 56 DAP, enquanto as plantas crescidas com 10mM de NO_3 respiraram 296 mgC/planta e as plantas com 20mM de nitrato respiraram 241 mgC/planta. As diferenças entre as taxas de respiração radicular entre plantas de tremoço branco noduladas e plantas adubadas com nitrato foram medidas por PATE et al. (1979), que verificaram as maiores taxas de perdas de CO_2 nas plantas noduladas (833 a 1.056 mgC/planta) em relação às plantas crescidas em solução nutritiva com 5 mM de nitrato e não inoculadas (624 mg C/planta).

Embora a FBN pareça representar um maior “custo” para as plantas, estas possuem um aparato fisiológico que utiliza recursos primários abundantes na natureza, tais como CO_2 atmosférico, água e luz solar para a síntese de energia, principalmente nas formas de carbono metabolizável, ATP e NADH. Além disso, as plantas possuem capacidade de ajustar a produção de fotoassimilados para satisfazer o requerimento pelos nódulos e pela FBN sem permitir decréscimos na disponibilidade de carbono para o desenvolvimento dos órgãos colhidos (MAURY et al, 1993; SKOT et al., 1986).

2.5. Vanadato como Inibidor da H^+ -Atpase (Bomba de Prótons)

Estudos envolvendo a dinâmica do processo de absorção celular do nitrogênio mineral, especialmente os que envolvem os efeitos associados a este processo, têm utilizado em diversas ocasiões o ortovanadato (HVO_4^{-2}) como inibidor das H^+ -ATPases (bomba de prótons). As bombas de H^+ são enzimas transmembranares que possuem capacidade de hidrolisar o ATP para produzir energia e um gradiente eletroquímico na membrana. Este gradiente está diretamente envolvido em mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal, como o de transporte de prótons e, conseqüentemente, a energização do sistema de translocação de íons pela membrana, que é fundamental para absorção de nutrientes com o nitrogênio (RODDA et al., 2006).

SKLENAR et al. (1994) relatam que o vanadato de sódio em baixas concentrações (5 μ M) pode inibir a ATPase em células animais e em fungos, enquanto maiores concentrações (50 μ M) podem causar o mesmo efeito em células de plantas superiores. Segundo estes autores no tecido vegetal este efeito estaria provavelmente atribuído à influência deste elemento na disponibilidade de ATP para o funcionamento do sistema de extrusão de prótons promovido pelas H^+ -ATPases.

O vanadato inibe a atividade da classe de ATPase ligada ao transporte de íons por formar compostos intermediários durante as reações dependentes de ATP (O'NEILL & SPANSWICK, 1984). A inibição ocorre porque o HVO_4^{-2} é um íon análogo ao HPO_4^{-2} e compete com o fósforo do ATP pelo sítio de fosforilação do ácido aspártico da enzima (SANTOS, 2006). Como as H^+ -ATPases são dirigidas pela hidrólise de ATP, na presença do ortovanadato é formado um intermediário aspartilfosfato em seu ciclo de reação (GARRIDO

& BALDANI, 2005), porém sem a geração da energia suficiente para a plena ativação da bomba de prótons como a ocorrida na hidrólise do ATP.

A aquisição de ambas as formas de nitrogênio mineral (NO_3^- e NH_4^+) pela planta necessita da atividade da H^+ -ATPase. Na absorção de NH_4^+ HOWITT & UDVARDI (2000) destacam que o influxo na célula vegetal é retardado pela inibição das H^+ -ATPases da membrana plasmática, sendo o equilíbrio de cargas entre o citoplasma e ao apoplasto compensado mediante a excreção de H^+ pela ATPase. A liberação de H^+ devido ao metabolismo do amônio promove acidificação da rizosfera (JACOB NETO, 2003; HINSINGER, 2003), porém na presença do vanadato normalmente não se verifica a acidificação desta região (SANTOS, 2006). No caso do nitrato a absorção no mecanismo simporte com um próton (NO_3^-/H^+) exige a atividade da ATPase para que seja mantida polarizada a membrana plasmática (MCCLURE et al., 1990).

2.6. Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura do Feijão

Nos últimos anos os avanços tecnológicos permitiram a elevação da eficiência do processo simbiótico em diversas plantas cultivadas com destaque para a cultura da soja. Para esta cultura, no Brasil, não são mais recomendados fertilizantes nitrogenados uma vez que a FBN é capaz de suprir as necessidades de nitrogênio da planta (VARGAS & HUNGRIA, 1997), podendo a FBN sustentar produções de até 4 toneladas por hectare sem o uso de adubos nitrogenados. A capacidade de produzir nódulos e de fixar nitrogênio atmosférico em leguminosas são eventos distintos e complexos com respostas muito variáveis, como no caso da planta de feijão comum. Geralmente, no campo as estirpes nativas ou selecionadas de rizóbio para esta cultura são ineficientes e incapazes de suprir as necessidades de N da cultura durante todo o ciclo de crescimento da planta (ARAUJO, et al., 1996; HUNGRIA & FRANCO, 1993).

Nos últimos 40 anos a pesquisa na área de FBN com feijoeiro concentrou esforços na tentativa de otimizar sua eficiência, porém não ocorreram grandes avanços tecnológicos que tornassem a inoculação uma forma de fornecer todo o nitrogênio que a planta requer para o seu suprimento, assim como ocorre na soja. Por esta razão vários autores, mais recentemente, têm proposto o uso de nitrogênio complementar ou como fonte única de suprimento do elemento para a planta, especialmente quando se espera produtividades elevadas da cultura (ROSOLEM, 1987; TSAI et al., 1993).

Uma das razões para a limitação da FBN no feijoeiro está vinculada à dificuldade em introduzir em condições de campo estirpes de bactérias eficientes e ao mesmo tempo com alta competitividade com as estirpes nativas do solo. Estas além de apresentarem boas adaptações às condições ambientais locais, que permite alta capacidade em nodular mesmo sob condições ambientais adversas (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; GRAHAM et al., 1994; HUNGRIA et al., 2000), possuem eficiência para a FBN inferior à estirpe desejada e introduzida pela inoculação (JUNIOR & REIS, 2008). Na maioria dos solos brasileiros onde se cultiva o feijoeiro existe uma grande população naturalizada de rizóbio capaz de nodular a cultura, demonstrada em diversos levantamentos de nodulação espontânea (HUNGRIA et al., 1997).

É importante ressaltar que no campo a eficiência da FBN no feijão é influenciada não somente pela estirpe de rizóbio, mas também pela interação entre os simbiontes. Isto evidencia a necessidade de se considerar em programas de melhoramento que visem melhorias na FBN nesta cultura características intrínsecas à planta hospedeira, onde se destaca a buscas por variedades de feijão mais eficientes e com maior especificidade ao rizóbio de interesse. A planta de feijão estabelece associação com uma gama muito grande de estirpes de rizóbio, caracterizando a promiscuidade da planta (PERRET et al., 2000, in JUNIOR & REIS,

2008), que culmina com a formação de nódulos com estas estirpes, geralmente de baixa eficiência.

A promiscuidade da planta de feijão associada à baixa competitividade das estirpes selecionadas e inoculadas são dois pontos de alta relevância para a ineficiência da FBN nesta cultura (JUNIOR & REIS, 2008), uma vez que o sucesso do processo simbiótico está diretamente relacionado à preferência da planta pelas bactérias mais eficientes e de genótipos de plantas que apresentem boas respostas ao microorganismo.

Embora a grande biodiversidade microbiológica nativa das condições tropicais pareça insatisfatória para que a FBN se expresse eficazmente no feijoeiro em condições de campo, para os programas de pesquisa este ambiente representa um importante reservatório de genes de interesse para o melhoramento das estirpes desejáveis (MENNA, 2006). Diante deste cenário diversos trabalhos mais recentes têm sido desenvolvidos com o uso de tecnologias moleculares no intuito de investigar na grande diversidade de estirpes de rizóbio nativas de solos tropicais brasileiros que possuam boa capacidade para estabelecer o processo simbiótico com o feijoeiro (MOSTASSO et al., 2002). HUNGRIA et al. (2000) com uso de PCR isolaram nos Cerrados estirpes de bactérias para a cultura do feijão competitivas e com tolerâncias a fatores adversos como as altas temperaturas. AGUILAR et al. (1998) verificaram em isolado nativos de vários países a presença do gene *nifH*, responsável pela codificação da nitrogenase, com o uso da metodologia *nifH*-PCR. A presença deste gene em isolados nativos permite a conservação de organismos fixadores de nitrogênio, possivelmente, tolerantes aos fatores ambientais adversos, como altas temperaturas, baixa precipitação, acidez e altas concentrações de alumínio no solo.

Além das hipóteses referentes aos organismos simbioses, planta e rizóbio, outras linhas de pesquisa buscam melhorar a eficiência da FBN no feijão priorizando a influência de fatores climáticos e edáficos sobre o processo. Algumas condições climáticas, como acidez, temperatura e baixa disponibilidade de água, são apontadas como fatores ambientais de alto impacto sobre a efetividade da FBN (HUNGRIA et al., 1993). No solo a baixa concentração de nutrientes como fósforo e molibdênio pode restringir de maneira drástica o funcionamento do processo simbiótico. O fósforo, presente na molécula de ATP, fornece energia para o metabolismo vegetal e sob deficiência no solo é apontado como um dos maiores limitantes para a produtividade do feijão, especialmente em plantas fixando nitrogênio (VADEZ et al., 1999), além de limitar também o metabolismo do nitrogênio mineral (GNIAZDOWSKA & RYCHTER, 2000).

A nutrição nitrogenada associada à presença de molibdênio disponível para a planta é também um aspecto de ampla abordagem pelos pesquisadores (JACOB-NETO, 1985; JACOB-NETO & FRANCO, 1995; JACOB-NETO & FRANCO, 1989; JACOB-NETO & ROSSETO, 1998). Este micronutriente é essencial ao metabolismo do nitrogênio por participar da composição das enzimas nitrogenase e nitrato redutase, atuando ativamente no processo simbiótico e no metabolismo do nitrogênio em geral (JACOB-NETO, 1985). Uma hipótese levantada por JACOB NETO (1985) para a baixa efetividade da FBN no feijoeiro seria uma provável queda da atividade da nitrogenase durante a floração devido à deficiência de molibdênio, entretanto isso não foi provado neste trabalho. As importantes funções no sistema enzimático da fixação biológica de nitrogênio sugerem que plantas dependentes de simbiose quando deficientes em Molibdênio ficam também carentes de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 1996). A disponibilidade destes nutrientes e de outros, também essenciais à fisiologia da planta, possui relação direta com o pH do solo, onde principalmente a acidez afeta não só a dinâmica nutricional da planta como também influencia o processo simbiótico direta ou indiretamente através de seus fatores associados (MORÓN et al., 2005). Este assunto será detalhado no tópico seguinte.

2.7. Influência do pH do Solo na Eficiência da FBN

Estudos que busquem tornar adequado o ambiente para uma interação positiva entre os genótipos de rizóbio e de feijão introduzidos, passam inicialmente pela necessidade do entendimento das suas necessidades e sensibilidades em relação aos eventos abióticos de maior influência (BROUGHTON et al., 2000; HUNGRIA & VARGAS, 2000) onde a acidez do solo é considerada por pesquisadores em FBN em leguminosas nodulantes uma das condições ambientais mais indesejáveis aos simbiossantes, à eficiência da interação e à produtividade vegetal (JACOB NETO, 1985; WATKIN, et al., 1997; VARGAS & GRAHAM, 1988; GRAHAM & VANCE, 2000, ANDRADE et al., 2002).

A acidez do solo provoca deficiência nos teores de nutrientes como cálcio, magnésio, fósforo e molibdênio (FRANCO & DAY, 1980; JACOB NETO, 1985; PEREIRA & BLISS, 1987; RANGEL et al. 2005;), além de favorecer a geração de níveis tóxicos de alumínio (JACOB NETO, 2003) e manganês (DOBEREINER, 1966), sendo este conjunto de fatores altamente limitante ao estabelecimento da leguminosa e à sobrevivência do rizóbio em condições de campo (RIBEIRO JÚNIOR et al., 1987; MIGUEL & MOREIRA, 2001). De maneira generalizada os solos ácidos limitam a absorção e a translocação de nutrientes, a redução progressiva no crescimento da parte aérea e a produção de massa seca do sistema radicular (BEUTLER et al., 2001), prejudicando os eventos associados a este órgão da planta como a formação de nódulos e a fixação biológica de nitrogênio.

A planta de feijão possui potencial para fixar eficientemente o nitrogênio através do processo simbiótico com o rizóbio, porém em solos com condições adversas, onde se destaca a acidez excessiva e os efeitos associados, a produtividade do feijoeiro fixando o nitrogênio atmosférico tende a sofrer limitações substanciais (JACOB NETO, 1985).

Para a planta de feijão, os prejuízos causados pela acidez do solo estão relacionados ao estabelecimento da cultura no campo, crescimento (ANDRADE et al., 2002) e rendimento de grãos. FILHO & SILVA (2000) verificaram que a produtividade do feijão irrigado cultivado no Cerrado de Goiás com o uso de calcário incrementou significativamente a disponibilidade e a absorção de nutrientes pela planta, sendo a dose de 3 t ha⁻¹ capaz de corrigir o pH do solo e suficiente para elevar a produtividade em 19,3%. Para a planta hospedeira a plenitude nutricional significa uma possibilidade para a participação com efetividade no processo simbiótico com o rizóbio, o que em contrapartida indica que as condições hostis proporcionadas pela acidez do solo à planta afetam decisivamente a sua relação com o microorganismo e comprometem a FBN.

Em relação à nutrição moliébdica e partindo do princípio que a disponibilidade e absorção do molibdênio pelo feijoeiro são dependentes do pH do solo e, ainda, que este elemento é altamente limitante ao processo simbiótico nesta cultura, FRANCO & DAY (1980) estudaram o efeito do nutriente sobre a FBN no feijoeiro. Ao associar este efeito à aplicação de calcário, os autores constataram que as respostas da planta à aplicação de molibdênio beneficiando a FBN e as taxas de crescimento vegetal somente ocorreram com o uso do corretivo de acidez, que elevou o pH para a faixa de 5,3 a 6,0.

Além de influenciar a FBN através da ação sobre planta, a acidez do solo causa impacto de forma direta e, muitas vezes, deletéria sobre o microorganismo fixador de nitrogênio, onde o grau de sobrevivência no solo possui uma relação proporcional à eficiência do processo simbiótico (ANDRADE et al., 2002). O alumínio tóxico, encontrado livre na solução do solo em condições ácidas, além de prejudicar o sistema radicular da planta hospedeira (JACOB NETO, 2003) altera diretamente a taxa de crescimento do rizóbio (MARSCHNER, 1991), inclusive para as estirpes que apresentam tolerância a certos níveis de acidez. STRALIOTTO & RUMJANECK (1999) mencionam que a toxidez de alumínio só se

torna importante com o pH 5,0 ou mais baixo, prejudicando mesmo as plantas e rizóbios tolerantes a estes níveis de pH.

MARSCHNER (1991) mostrou que os impactos da acidez do solo sobre a nodulação podem ocorrer diretamente pela ação direta do H⁺ em excesso, altas concentrações de manganês e alumínio, baixas concentrações de cálcio, redução da adsorção do rizóbio à superfície das raízes e redução da sobrevivência do rizóbio no solo, ou por efeitos indiretos, como as mudanças na conformação dos pêlos radiculares e raízes laterais. Mesmo em leguminosas onde a FBN se expressa de forma altamente eficiente, como é o caso da cultura da soja que depende da FBN para a aquisição de todo nitrogênio requerido pela planta, a correção da acidez representa uma atividade indispensável no manejo da lavoura. MIGUEL & MOREIRA (2001) verificaram que nesta cultura estirpes de *Bradyrhizobium* sp. toleram leves condições de acidez no inoculante turfoso, entretanto, no campo a acidez do solo é um fator limitante para o estabelecimento da cultura e para a FBN, também verificado por OLIVEIRA & PAVAN (1996); MACEDO (2003).

Para muitos autores é importante que o impacto das condições ácidas do solo seja analisado através da combinação das suas diversas conseqüências ao ambiente de crescimento dos simbioses. WATKIN et al. (1997) avaliou os efeitos do pH associado a níveis de fósforo e de cálcio sobre o crescimento e sobrevivência de seis estirpes de *Rhizobium leguminosarum* e verificaram que as condições de acidez foram as mais representativas para prejudicar a taxa de crescimento das estirpes, sendo a faixa de pH entre 4,3 e 4,6 considerada o ponto crítico para a limitação da sobrevivência. CAMPANHARO (2006) reforça esta idéia mencionando que no impacto da acidez do solo sobre a produção de nódulos e sobre a FBN devem ser incluídos problemas ocorridos na região da rizosfera, como a sinalização entre a bactéria e a planta hospedeira, o crescimento de raízes e pêlos radiculares devido à ação do alumínio, a infecção do *Rhizobium*, além de aspectos nutricionais devido à insuficiência de molibdênio. Em um estudo feito na rizosfera de diversas espécies vegetais, MARSCHNER et al. (2004) verificaram que as variáveis que mais influenciaram a dinâmica da população de bactérias nesta região foi o pH do solo e a disponibilidade de fósforo no meio de crescimento.

Ainda considerando o ambiente rizosférico, é importante ressaltar que a acidez no meio de crescimento vegetal afeta severamente a iniciação da nodulação e a FBN. Efeitos da acidez do solo no processo inicial de formação de nódulos foi verificado por ANGELINI et al. (2003) quando avaliaram a interação entre o rizóbio e plantas de amendoim (*Arachis Hypogaea* L.). Foi verificado que com pH 7,0 os flavonóides testados induziram a expressão dos genes *nodC*, enquanto em meio ácido houve extrema redução da indução de produção destes genes, especialmente em isolados sensíveis à acidez.

É importante ressaltar também a influência dos valores elevados de pH (alcalinidade) na nodulação e na FBN em leguminosas, especialmente pelo fato de que nesta tese foram utilizadas altas doses de nitrato, fonte de nitrogênio que alcaliniza a rizosfera ao ser metabolizado pela planta. ZAHRAH (1999) destaca que além da acidez, salinidade, temperatura, falta d'água, fertilizantes, metais pesados, presença do nitrogênio disponível e de pesticidas, a alcalinidade do solo é um dos fatores ambientais de maior impacto no processo de fixação biológica de nitrogênio.

A influência da alcalinidade do solo na FBN está principalmente relacionada à indisponibilidade de nutrientes (PONGSILP & NUNTAGIJ, 2007) e aos danos provocados à superfície radicular, tendo como principal impacto negativo a redução da formação de pêlos radiculares (TANG & ROBSON, 1993). Estes autores verificaram em seu trabalho que para algumas espécies de *Lupinus* (tremoço) o aumento de pH de 6 para 10 inibiu totalmente a nodulação. Em uma publicação mais recente TANG et al. (2006) verificaram, ainda em plantas de plantas de tremoço, que o aumento do pH causou uma acentuada redução na

disponibilidade de ferro. Para estes autores, estas foram as principais causas para a severa redução de 80% da produção de nódulos radiculares.

Embora a acidez seja um dos principais fatores ambientais prejudiciais à FBN e a elevação do pH do solo seja fundamental para elevar a população de rizóbio no solo (YANG et al., 2001), é importante considerar que a alta alcalinidade também compromete o processo simbiótico, sendo incomum, por exemplo, verificar a presença de rizóbios ativos no solo com pH acima de 10,5 (BHARDWAJ, 1975).

2.8. Alga Marinha *Lithothamnium* como Neutralizante de Acidez

Nesta tese foi feito um experimento com a avaliação da influência de carbonatos de calcário de rocha e de um produto proveniente de fragmentos fossilizados de algas do gênero *lithothamnium* no pH rizosférico de plantas supridas com nitrato e amônio. Estas algas coralináceas (rhodophytas) estão compreendidas no grupo das articuladas ou geniculadas e das não articuladas ou não geniculadas, sendo neste último grupo incluídas as algas pertencentes ao gênero *Lithothamnium*. Este gênero compreende centenas de espécies de algas e foi estabelecido por Philippi em 1837, quando demonstrou de forma clara e definitiva que os representantes Nullipores (poros pouco visíveis) de algas coralináceas incrustantes eram plantas (HORTA, 2002). Já a família corallinaceae foi criada em 1812 por Lamouroux ainda tendo como base o antigo sistema de classificação de Linnaeus (HORTA, 2002).

A deposição dos carbonatos ocorre ao longo de todo o talo da alga, cujo hábito de crescimento possui caráter crostoso com talo prostrado e filamentos crescendo em crostas. Nas algas do gênero *Lithothamnium* os fragmentos dos talos normalmente se desprendem e crescem envolvendo pequenos detritos no fundo do mar, tais como fragmentos minerais, pedaços de conchas de moluscos, etc. formando concreções com uma estrutura arredondada denominada rodolito, nódulo, entre outras denominações, que são em sua maioria constituídas por algas não geniculadas (HARVEY & WOELKERLING, 2007). O termo maërl é utilizado para designar as várias espécies de algas vermelhas que possuem esqueletos carbonáticos rígidos.

O processo de impregnação dos carbonatos, predominantemente de cálcio em relação ao de magnésio, ocorre pela deposição de cristais de calcita (cristal hexagonal romboédrico) em uma região extracelular, mais precisamente entre paredes celulares. O processo de calcificação está diretamente relacionado ao processo fotossintético (LOBBAN & HARRISON, 1994) promovido pela alga por meio dos pigmentos de cor purpúrea, principalmente a ficoeritrina. Assim como nos tecidos clorofilados e fotossintetizantes das plantas, o pigmento da alga também se encontra localizado nos cloroplastos e estes presentes na película viva superficial dos nódulos. A partir do depósito de sais inorgânicos em seu tecido, provenientes da água do mar, a alga morre e perde a coloração purpúrea característica do organismo vivo (DIAS, 2000).

O atrito dos rodolitos devido às freqüentes e fortes correntes marinhas associados à fragilidade física dos nódulos faz com que ocorram constantes fragmentações e sejam formadas extensas bancadas de biosedimentos, sendo estes os principais materiais utilizados como matéria prima para a fabricação de produtos para diversas finalidades. As bancadas de biosedimentos de *lithothamnium* no Brasil são encontradas desde o norte do Rio de Janeiro até a foz do Rio Amazonas (DIAS, 2000).

Como estas algas contêm diversos elementos minerais e podem possuir mais de 95% de sua massa seca constituída por carbonatos (BLUNDEM et al., 1997) tornou-se possível a utilização do produto derivado de sua moagem na nutrição de plantas e animais, na neutralização da acidez do solo (ALVES et al., 1999a; ALVES et al., 1999b; ALVES et al., 2001), no tamponamento de ambientes ácidos e no tratamento de água (DIAS, 2000). O

lithothamnium possui uma estrutura física microporosa com a presença de 40 a 50% de porosidade (DIAS 2000), o que representa uma superfície específica substancialmente elevada se comparada à estrutura física de materiais provenientes de rochas terrestres, como as rochas calcárias e fosfáticas. Em outras palavras, pode-se dizer que as partículas frágeis e porosas da alga possuem uma elevada área de contato quando comparadas às estruturas cristalinas dos materiais provenientes da moagem de rochas terrestres. Devido à alta reatividade em meio ácido, em função da natureza porosa, e rapidez na elevação do pH de soluções ácidas (MACEDO et al., 2006) estima-se que haja considerável facilidade na liberação dos nutrientes da alga.

Como constituintes orgânicos se destacam as galactanas sulfatadas presentes na matriz da parede celular das algas, que são polissacarídeos que possuem a galactose como monossacarídeo majoritário na cadeia principal (BILAN & USOV, 2001). Já foram também detectados diversos aminoácidos presentes na composição do lithothamnium, tais como Arginina (130 ppm), Tirosina (100 ppm), Glicina (95 ppm), Lisina (95 ppm), Alanina (75 ppm), Fenilamina (60 ppm), Isoleucina (45 ppm), Serina (35 ppm), Leucina (25 ppm), Valina (10 ppm), resultados provenientes de aminograma realizado pela Embrapa CTAA em 1995.

2.9. Definição do Ambiente da Rizosfera

No início do século passado o fitopatologista alemão Lorenz Hiltner definiu a rizosfera como um compartimento do solo influenciado pela atividade da raiz, considerando o solo rizosférico particularmente importante para a supressão de certas doenças de solo (NEUMANN & RÖHMELD, 2006). Mais recentemente uma definição de maior amplitude conceitua a rizosfera como uma zona de solo imediatamente ao redor das raízes que é diretamente afetada pelas mesmas (DARRAH, 1993). Esta região, interface entre a planta e o solo, é constituída de intensa depleção de água e nutrientes, presença de diversos compostos de carbono derivados das raízes, alta biomassa e atividade biológica (DARRAH, 1993), além de grandes variações de pH promovidas pela planta (ALLEN et al., 1988).

A atividade microbiológica expressivamente superior à observada em regiões do solo mais distantes das raízes é explicada pela busca dos microorganismos a este ambiente com altas quantidades de compostos orgânicos liberados pelas raízes em um fenômeno denominado rizodeposição (KUZYAKOV et al., 2002; CHENG et al., 1996, KUZYAKOV & DOMANSKI, 2000). Neste fenômeno a quantidade de carbono liberado na rizosfera pode atingir níveis superiores a 40% da taxa de CO₂ fixado em plantas anuais e chegar a 70% em espécies florestais (LYNCH & WHIPS, 1990).

As raízes podem alterar as características químicas da solução do solo, porém é na região ao redor das raízes que ocorrem as primeiras e mais expressivas variações, principalmente por ser uma região de intensa depleção de água e nutrientes e que recebe uma grande quantidade de compostos orgânicos provenientes da exsudação radicular (DEUBEL et al., 2000). O conjunto de aparatos e mecanismos fisiológicos das plantas pode influenciar a rizosfera fisicamente, através de alterações na estrutura, temperatura e disponibilidade de água e nutrientes, quimicamente pelas variações de pH, potencial redox, concentração de nutrientes, exsudatos de raízes, desintoxicação de alumínio e alelopatia, e biologicamente, em virtude das associações com microorganismos que colonizam a região rizosférica (FAGERIA & STONE, 2006).

A disponibilidade de nutrientes na rizosfera é controlada pela combinação de efeitos relacionados às propriedades do solo, características das plantas e pelas interações entre as raízes e os microorganismos que colonizam esta região (JONES et al. 2004). O aumento da disponibilidade de ferro, por exemplo, se destaca como uma importante contribuição da

complexidade química existente na rizosfera vegetal, onde a planta excreta fitosideróforos que agem na solubilização e mobilização do íon (REICHMAN & PARKER, 2005).

Em relação à atividade microbiológica da rizosfera MANTELIN & TOURAINE (2004) destacam que a influência da microflora rizosférica é tão importante que assume um papel crucial no entendimento de questões relacionadas ao aspecto nutricional e ao desenvolvimento da planta. Estudos que buscam avaliar a magnitude das interações entre plantas e microorganismos consideram que na rizosfera está a chave para o entendimento de como a planta age no sentido de tanto repelir organismos nocivos quanto atrair os benéficos, destacando neste último grupo os fungos micorrízicos (BOUWMEESTER et al., 2007), bactérias fixadoras de nitrogênio (ANGELINI et al., 2003) e bactérias promotoras de crescimento (MANTELIN & TOURAINE, 2004).

Como a presente tese avaliou o efeito das variações do pH rizosférico do feijoeiro, causadas por diferentes fontes de nitrogênio, na iniciação da nodulação, é importante ressaltar que o nitrogênio é o principal elemento mineral causador de alterações no pH da rizosfera. Este fato se deve à alta demanda vegetal pelo elemento e às formas nitrato e amônio, metabolizáveis pela planta, que promovem a elevação e a redução do pH rizosférico, respectivamente (HAUSSLING et al., 1985).

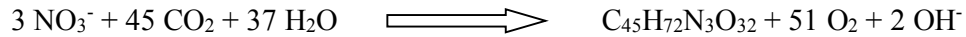
2.10. Balanço Iônico Vegetal

O balanço iônico vegetal está fundamentado na necessidade da compensação das cargas elétricas e da regulação do pH celular da planta, cujas variações estão relacionadas ao influxo de íons de diferentes cargas. O controle do pH citoplasmático, para que seja mantido em valores próximos a 7,3, é realizado por um sistema denominado “pH-stat”. Este sistema conta com a manutenção do pool de ácidos orgânicos que são carboxilados ou descarboxilados no interior da célula e está associado às trocas de prótons com o meio externo com decisiva participação das H^+ -ATPases (HINSINGER et al., 2003).

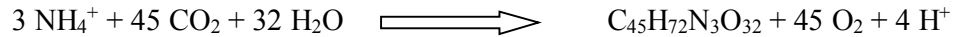
Assim sendo, a geração da acidificação ou alcalinização da rizosfera é diretamente influenciada pelo processo de absorção de íons pelas raízes e ocorrem mediante absorção desigual de nutrientes catiônicos (NH_4^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Na^+) em relação aos aniônicos (NO_3^- , Cl^- , SO_4^- , $H_2PO_4^-$), quando expressos em equivalências de cargas (HAYNES, 1990). Como o nitrogênio é demandado em grandes quantidades pela planta e o único nutriente mineral absorvido tanto na forma de cátion (NH_4^+) quanto de ânion (NO_3^-) este elemento exerce um papel preponderante sobre a acidificação e a alcalinização da rizosfera, respectivamente (RODRIGUEZ et al., 2008). Isto porque o influxo de íons de diferentes cargas nas células da raiz promove a necessidade do efluxo de H^+ ou OH^- na rizosfera para que seja compensado o desbalanço cátion-ânion ocorrido na planta (HINSINGER et al., 2003), promovendo acidificação ou alcalinização desta região, respectivamente (JACOB NETO, 2003; RAVEN et al., 1990; CARVALHO et al., 2005). Se no processo metabólico da célula da planta for computado o efeito de carga do S e do P, no processo assimilatório, a planta libera na rizosfera 1,22 mol de H^+ por mol de NH_4^+ , 0,22 mol de H^+ por mol NH_3^+ ou uréia e 0,78 mol de OH^- por mol de NO_3^- (RAVEN, 1988; ALLEN et al., 1988).

Abaixo seguem as equações do balanço iônico vegetal para o metabolismo das fontes de nitrogênio NO_3^- , NH_4^+ e N_2 (RAVEN, 1988; JACOB NETO, 2003).

* Nitrato (NO_3^-) como fonte de nitrogênio e alcalinização do pH.



* Amônio (NH_4^+) como fonte de nitrogênio e acidificação do pH.



* Nitrogênio atmosférico (N_2) como fonte de nitrogênio e acidificação do pH.



Em relação às fontes minerais de nitrogênio as equações mostram que ao absorver o nitrato a planta libera OH^- na rizosfera elevando o pH desta região, enquanto a absorção de amônio libera H^+ e acidifica o meio externo às raízes. KIRKBY & KNIGHT (1977) destacam ainda que a absorção de nitrato na presença do CO_2 respiratório do meio radicular pode possibilitar a excreção de OH^- através da liberação de bicarbonato (HCO_3^-) no meio externo, também promovendo a alcalinização da rizosfera, comum em plantas aquáticas.

Quando as plantas estão sob o fornecimento de nitrato, forma de nitrogênio mais abundante nos solos, e as quantidades de ânions absorvidos superam as quantidades de cátions e existe um excesso de produção de OH^- no citoplasma resultante da redução do nitrato a planta estrategicamente reduz a alcalinidade celular através da conversão das hidroxilas em ácidos orgânicos (carboxilatos), tais como o málico, oxálico e urônico (RAVEN & SMITH, 1976; KIRKBY & MENGEL, 1967). No modelo proposto por BEN ZIONI et al. (1971) para a cultura da soja crescida com NO_3^- o malato sintetizado na folha, produzido com o uso da OH^- resultante da redução do nitrato, é transportado através do floema acompanhado de K^+ para ser descarboxilado na raiz. Este HCO_3^- pode ser liberado na rizosfera elevando o pH no ambiente externo às raízes (TOURAINÉ et al., 1992), entretanto no modelo de BEN ZIONI et al. (1971) o HCO_3^- produzido na raiz é trocado por um novo nitrato que é transportado para a parte aérea pelo xilema, também na presença de K^+ , estabelecendo-se assim um processo de redução de nitrato na parte aérea controlado pela absorção de nitrato nas raízes.

Em relação às plantas fixando o N_2 atmosférico os menores valores de pH também são explicados pela necessidade da planta em manter o pH intracelular. Ao assimilar biologicamente o N_2 atmosférico, que apesar de ser uma molécula de carga neutra, as plantas absorvem do solo mais cátions do que ânions e, conseqüentemente, liberam na rizosfera excessos de cargas positivas em relação às negativas, gerando acidificação neste ambiente (ALLEN et al., 1988; TANG et al., 1997; JARVIS & ROBSON, 1983) assim como na rizosfera de plantas supridas com amônio (HINSINGER et al., 2003). Para as plantas leguminosas AUGUILAR & VAN DIEST (1981) ressaltam que a taxa de absorção de cátions será superior à de absorção de ânions quando estas adquirirem nitrogênio proveniente da atmosfera através do processo de FBN em quantidades superiores às quantidades de nitrato adquiridas pelas raízes.

A disponibilidade temporal e espacial das fontes minerais de nitrogênio nitrato e amônio no solo é altamente heterogênea e o metabolismo pelas plantas destas formas inorgânicas de nitrogênio alteram variavelmente o pH e o potencial redox da rizosfera (BLOOM et al., 2003). As alterações no pH da rizosfera em função do fornecimento destas fontes de nitrogênio são capazes de proporcionar variações químicas e biológicas de importância agrônômica. RUAN et al. (2000), por exemplo, verificaram que a acidificação da

rizosfera devido à utilização de amônio causou maior concentração de Alumínio e Manganês na raiz e na parte aérea de *Cammelia sinensis* L. Neste mesmo trabalho foi avaliado o efeito das fontes amônio e nitrato na absorção de fósforo proveniente de fonte de baixa solubilidade (rocha fosfática) e de maior solubilidade ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), onde verificou-se que somente as plantas nutridas com amônio geraram reduções no pH da rizosfera capazes de promover a dissolução do fósforo da rocha fosfática e otimizar o uso deste fósforo pela planta.

Em um solo contaminado com zinco MONSANT et al. (2008) mostraram que as diferentes fontes de nitrogênio podem alterar a disponibilidade e a extração do elemento pela espécie vegetal *Thlaspi caerulescens*. Foi verificado que com o uso de nitrato houve elevação do pH da rizosfera e maior concentração de zinco na parte aérea das plantas quando comparadas às plantas crescidas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e uréia, que reduziram o pH rizosférico e absorveram menores quantidades de zinco.

2.11. Inibição da Nodulação Causada pelo Nitrogênio Mineral

É amplamente conhecido, há várias décadas, o efeito inibidor do nitrogênio sobre a nodulação e a FBN, mas as hipóteses propostas se somam sem chegar a uma conclusão generalizada sobre o mecanismo de inibição (JACOB et al., 1998). Das teorias estudadas destacam-se a limitação de carboidratos para as raízes e nódulos de plantas supridas com N (DENISON & HARTER, 1995; TANNER & ANDERSON, 1964); redução da difusão de oxigênio para os nódulos devido à presença do nitrato (VESSEY & WATERER, 1992); influência do N sobre a deformação dos pêlos radiculares (TRUCHET & DAZZO, 1982); inibição da divisão de células corticais e da formação do cordão de infecção (HEIDSTRA et al., 1997); ação do nitrito, intermediário na redução do nitrato à amônio, como inibidor da nitrogenase (GIBSON & PAGAN, 1977); efeito do nitrato sobre a redução da atividade da nitrogenase (STREETER, 1985); possível efeito salino sobre as etapas iniciais da nodulação (ZAHARAN, 1999); nitrato em altas concentrações promovendo competição por NADH entre a enzima nitrato redutase e as reações de redução do bacteróide (HECKMANN et al., 1989); redução da produção de fator NOD pelo rizóbio (DUSHA et al., 1989); queda da síntese e liberação de flavonóides pela planta (BANDYOPADHYAY, et al., 1996); supressão da infecção dos pêlos radiculares, levando a não formação de nódulos (WAHAB et al., 1996; KOHLS & BAKER, 1989).

Um exemplo prático é o trabalho de ABAIDOO et al. (1990), onde foi verificado que o nitrogênio mineral reduziu significativamente o número e a massa seca de nódulos das leguminosas feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine Max* L.), sendo as maiores reduções de massa seca nodular observadas no feijoeiro. Além da existência de diferenças entre diferentes espécies de leguminosas quanto à capacidade de tolerar o efeito inibidor do nitrogênio na nodulação, é comum serem encontradas na mesma espécie variações entre estirpes de bactérias quanto a esta tolerância, tal como verificado por GIBSON & HARPER (1985) quando comparou a tolerância de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* ao nitrogênio na cultura da soja.

Grande parte dos pesquisadores que avaliaram os processos inibitórios à nodulação em leguminosas, promovidos pela presença de nitrogênio disponível e pelo pH inadequado, enfatizaram de forma dissociada o impacto destes dois importantes fatores na nodulação. Neste sentido, pouca atenção tem sido dada ao efeito integrado destes dois fatores sobre o processo inibitório de nodulação. Considerando que as formas absorvíveis de nitrogênio pelas plantas (nitrato e amônio) alteram o pH da rizosfera e estas variações de pH são capazes de influenciar a iniciação da nodulação, esta tese buscou associar o efeito de nitrato e amônio nas alterações do pH rizosférico e a influência destas alterações na nodulação do feijoeiro.

2.12. Relações Entre Balanço Iônico e Atividade Microbiológica na Rizosfera

A estrutura das comunidades de microorganismos de rizosfera sensíveis às variações de pH, pode ser influenciada pelas alterações eletroquímicas desta região provocadas pelo metabolismo vegetal de diferentes fontes de nitrogênio (RÖMHELD, et al. 1986). Esta hipótese tem levado alguns pesquisadores a relacionar o suprimento de nitrato e amônio a efeitos que tenham dependência ou relações diretas do pH com a população de microorganismos de importância agrícola.

Trabalhando com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, CARVALHO (2003) verificou que a absorção do nitrato pelo tomateiro elevou o pH da solução nutritiva e promoveu a redução da taxa de adesão de conídios e da colonização radicular pelo fungo, indicando que este organismo foi sensível aos altos valores de pH ocorridos na rizosfera. Em plantas de feijão, cultivares Ouro Negro e Diamante Negro, LEMOS (2010) também verificou que a adubação com o uso do nitrato reduziu a infecção radicular do fungo *Fusarium oxysporum*. Na interação entre planta e fungo micorrízico, HAWKINS & GEORGE (2002) mencionaram que o amônio provocou efeitos deletérios à colonização das raízes pelos fungos, estando este fato relacionado às reduções acentuadas no pH da rizosfera causadas por esta fonte de nitrogênio. Segundo estes autores a acidez da rizosfera esteve ligada principalmente à redução da germinação dos esporos, à colonização e ao crescimento das hifas.

A acidificação da rizosfera promovida pelo metabolismo de amônio pela planta prejudica a atividade de bactérias fixadoras de nitrogênio como o rizóbio, que tipicamente prefere ambientes mais alcalinos (MARSCHNER, 1998). Assim sendo, diversos estudos têm avaliado a atividade de bactérias na rizosfera de plantas supridas com nitrogênio de diferentes fontes. Neste sentido, SODERBERG & BAATH (2004) verificaram que a atividade microbiológica decresceu com o aumento da concentração das fontes amoniacais, que também causaram acidificação rizosférica. Com o aumento da concentração de nitrato a atividade bacteriana na rizosfera foi incrementada.

Em plantas de trigo, SMILEY (1978) observou menor atividade do fungo patógeno *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* na rizosfera de plantas cultivadas com amônio em relação às plantas crescidas com nitrato. Nesta mesma espécie vegetal MARSCHER et al. (1998) verificaram um estímulo à colonização da rizosfera pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* 2-79RLI promovido pelo amônio, verificado somente nas plantas que não tiveram controle do pH da solução nutritiva. Estes autores associaram este fato à retenção de exsudatos causada pela alta concentração de H⁺ no apoplasto e na rizosfera.

No trabalho de MAHMOOD et al. (2005) foi avaliada a influência das fontes de nitrogênio nitrato e amônio na atividade de bactérias na rizosfera. Apesar de terem sido observadas quedas acentuadas no pH de plantas supridas com amônio em relação às supridas com nitrato, estes autores atribuíram a maior atividade bacteriana na rizosfera de plantas crescidas com a fonte amoniacal devido à maior quantidade de exsudatos liberados nas plantas crescidas com esta fonte de nitrogênio, também verificado por MAHMOOD et al. (2002). É importante lembrar que o nitrato é um nutriente que também eleva consideravelmente a proliferação radicular e produção de exsudatos pelas raízes na rizosfera (PATERSON et al., 2006).

Estudos com bactérias simbióticas nodulantes também estão incluídas neste contexto. CHENG et al. (2004) comparou as espécies de alfafa *Medicago sativa* e *Medicago murex*, onde foi verificado que a espécie que mais acidificou a rizosfera foi também a que apresentou a menor capacidade de produção de nódulos, concluindo estes autores que a rizosfera mais ácida foi menos favorável à sobrevivência e crescimento do microorganismo fixador de nitrogênio *Sinorhizobium medicae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados 6 experimentos objetivando avaliar o efeito do pH rizosférico, em função do metabolismo de diferentes fontes de N, na nodulação do feijoeiro. A inclusão de variáveis como aplicação de N via foliar (experimentos 4 e 5) e fornecimento de vanadato às raízes (experimento 6) visaram isolar o efeito do pH da rizosfera, pelo metabolismo do N, de outras possíveis causas, como por exemplo, um possível efeito salino no ambiente radicular promovido pelas mais elevadas doses de N.

3.1. Cultivares de Feijão, Estirpes de Rizóbio e Inoculação

As sementes utilizadas em todos os ensaios foram padronizadas por tamanho e inoculadas com inoculante turfoso produzido pela Embrapa Agrobiologia contendo em torno de 10^8 células g^{-1} das estirpes BR-322 e BR-520 de *Rhizobium tropici*, recomendadas para *Phaseolus vulgaris* e consideradas adequadas aos solos tropicais por possuir tolerância a altas temperaturas, acidez moderada do solo e boa competitividade (SOUZA et al., 2003). A inoculação das sementes foi feita em todos os experimentos e tratamentos e sempre no mesmo dia da semeadura. Foi feita uma pasta de inoculante com água destilada, sendo esta pasta aplicada de forma a recobrir toda a superfície das sementes. Em seguida as sementes foram conduzidas à secagem na sombra sob temperatura ambiente.

No 2º experimento foi feita a comparação entre as cultivares Ouro Negro e a Rio Tibagi, que são contrastantes quanto à capacidade de produzir nódulos (KUBOTA et al., 2008). A cultivar Ouro Negro é considerada de alto potencial para a nodulação, FBN e produção de grãos (MERCANTE et al., 1992) em relação à Rio Tibagi, que normalmente apresenta baixa resposta à inoculação. Como entre as duas cultivares não foram encontradas diferenças expressivas nos valores de pH rizosférico, nos experimentos seguintes ao 2º foi estudada apenas a cultivar Ouro Negro.

3.2. Local de Crescimento das Plantas

Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento (Figura 1) instalada no Laboratório de Química da Rizosfera do Instituto de Agronomia da UFRRJ com fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro) sob iluminação com lâmpadas incandescentes e fluorescentes e taxa de luminosidade média de 400 Lux. As paredes da câmara foram revestidas com papel alumínio para concentrar a incidência luminosa sobre o dossel das plantas e a temperatura foi constantemente controlada na faixa de $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ com o uso de condicionador de ar.



Figura 2. Câmara de crescimento utilizada em todos os experimentos para o cultivo do feijoeiro.

3.3. Experimentos

Em cada um dos experimentos descritos a seguir, foram comentados os objetivos específicos de sua instalação e suas relações com a hipótese central deste trabalho.

3.3.1. Experimento 1. Avaliação preliminar dos efeitos das soluções com nitrogênio (utilizadas nos experimentos seguintes) na condutividade elétrica do substrato areia.

Este experimento foi planejado para estudar se o efeito da salinidade das soluções completas com as fontes nitrogênio, que seriam utilizadas nos experimentos seguintes deste trabalho de tese, poderia atingir níveis de toxidez comumente encontrado na literatura, especialmente no substrato areia que foi utilizado na maioria dos ensaios. O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, no esquema fatorial 5 x 2 com os seguintes tratamentos, 5 doses de nitrogênio (0, 60, 120, 240, e 480 Kg ha⁻¹) e 2 fontes de nitrogênio (KNO₃ como fonte de nitrato e (NH₄)₂SO₄ como fonte de amônio), em potes com 230 g de areia sem o cultivo de plantas.

Os cálculos de massa de fertilizantes aplicados por hectare foram feitos considerando uma camada de 20 cm de solo por hectare com massa de 2.000.000 de quilogramas, sendo a densidade considerada igual a 1 (um). A fertilização de base, para todos os nutrientes menos o nitrogênio, foi feita através de aplicações de 0,5 mL por vaso da solução de K₂SO₄ (0,5 M) e 1 mL por pote das soluções de CaCl₂.2H₂O (0,5 M), MgSO₄.7H₂O (0,5 M), NaH₂PO₄.2H₂O (0,5 M), resultando nas massas de 170 kg de K ha⁻¹, 174 kg de Ca ha⁻¹, 104 kg de Mg ha⁻¹ e 135 kg de P ha⁻¹.

Para os micronutrientes foi aplicado 1 mL por pote da solução estoque de micronutrientes, que foi preparada de acordo com a metodologia proposta por JACOB NETO (2003) com a seguinte composição: 2.302 mg/L de FeCl₃.6H₂O; 1.289 mg/L de EDTA; 31 mg/L de H₃BO₃; 67,6 mg/L de MnSO₄.H₂O; 45,92 mg/L de ZnSO₄.7H₂O; 9,96 mg/L de CuSO₄.5H₂O; 9,51 mg/L de CoCl₂.6H₂O e 121 mg/L de Na₂Mo₄.2H₂O, resultando nas massas finais de 3.011 g ha⁻¹ de Fe; 41 g ha⁻¹ de B; 191 g ha⁻¹ de Mn; 91 g ha⁻¹ de Zn; 22 g ha⁻¹ de Cu; 17 g ha⁻¹ de Co e 417 g ha⁻¹ de Mo.

As adubações com macro e micronutrientes foram as mesmas utilizadas nos experimentos seguintes, sendo as aplicações dos nutrientes, inclusive nitrogênio, sempre realizadas no início do experimento. As forças iônicas das soluções foram adaptadas de JACOB NETO (2003) para os teores de cálcio, magnésio e fósforo, porém o balanço de cargas foi mantido. As medições de condutividade elétrica (CE) e pH foram realizadas 14 dias após a aplicação das soluções nos potes.

3.3.2. Experimento 2. Efeito da aplicação de fontes nitrogenadas na nodulação - Efeito do pH da rizosfera do feijoeiro cultivado em areia

Com objetivo de estudar se as modificações do pH da rizosfera devido à aplicação de diferentes fontes de N alterava a produção inicial de nódulos do feijoeiro, foi realizado um experimento em um fatorial inteiramente casualizado com 2 cultivares de feijão (Ouro Negro - alto potencial para a nodulação e Rio Tibagi - baixo potencial para a nodulação), 6 doses de nitrogênio (0, 15, 30, 60, 120 e 240 kg ha⁻¹), 3 fontes de nitrogenadas (KNO₃, (NH₄)₂SO₄ e NH₄NO₃) e com 4 repetições, em potes de 230 g de areia sem drenagem. As sementes, que foram padronizadas por tamanho, no momento do plantio foram inoculadas, posicionadas na região central do vaso e cobertas por uma camada de 1 cm do substrato areia.

O desbaste foi feito aos dois dias após a emergência (6 dias após a semeadura) visando manter a plântula mais saudável de cada vaso e a mais uniforme em relação às demais. A

irrigação foi feita constantemente através da aplicação de água destilada em quantidades suficientes para manter o substrato apenas úmido. As adubações de macro e micronutrientes foram realizadas de acordo com o experimento 1. Foram realizadas duas coletas, uma aos 10 e a outra aos 20 dias após a emergência (DAE), compreendendo o momento da iniciação da nodulação e da fase de nódulos maduros, respectivamente. Foram avaliados, nas duas épocas de coleta, a nodulação (número e massa seca de nódulos) e o pH rizosférico do feijoeiro. As metodologias utilizadas para as avaliações dos efeitos do nitrogênio na nodulação encontram-se descritas no item 3.4.



Figura 3. Características morfológicas das plantas nas coletas realizadas aos 10 e 20 dias após a emergência.

3.3.3. Experimento 3. Inibição da nodulação do feijoeiro cultivado em diferentes tipos de solo: Parte I - Efeito do poder tampão do solo sem correção da acidez; Parte II - Efeito do poder tampão do solo com correção da acidez.

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar se solos com a presença de argila, portanto com maior poder tampão e capacidade de seqüestrar OH^- ou H^+ em relação à areia e com pH natural (Parte I) ou corrigido (Parte II), poderiam alterar o efeito da fonte nitrogenada de modificar o pH da rizosfera e influenciar a nodulação do feijoeiro.

Parte I. O experimento foi instalado em um fatorial inteiramente casualizado com duas fontes de nitrogênio nitrato (KNO_3) e amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), seis doses de nitrogênio (0, 30, 60, 120 e 240 kg N ha^{-1}) e 2 tipos de solos (baixo e médio teor de argila). As análises físicas e químicas destes solos encontram-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os solos com baixo teor de argila (8%) e com médio teor de argila (25%) utilizados neste experimento foram retirados da camada subsuperficial de um Planossolo e de um Argissolo, respectivamente, no setor de horticultura da UFRRJ (RAMOS, 1970). Após a secagem ao ar os solos foram passados em uma peneira com malha de 2 milímetros. Na montagem do ensaio o volume de solo usado foi de 230 gramas por vaso, assim como no experimento em areia. Os demais procedimentos como inoculação, adubação com nitrogênio e demais nutrientes, manutenção da umidade, desbaste, etc., foram iguais aos do experimento 2 em areia (item 3.3.2).

Tabela 1. Percentuais das frações granulométricas presentes nos solos utilizados no experimento 3 (dados obtidos no laboratório de física do solo/Depto. de solos/UFRRJ).

Solo	Argila	Silte	Areia	Areia fina	Areia grossa
Baixo teor de argila	8	6	86	3	83
Médio teor de argila	25	16	59	2	57

Para o cultivo em solo, a adubação considerou os teores de nutrientes existentes neste substrato apresentados na Tabela 2. Esta adubação foi composta pelo fornecimento de potássio através da aplicação, em cada vaso de 230 gramas, de 0,15 mL da solução de K₂SO₄ (0,5M) para resultar na massa de 50 kg de K₂O ha⁻¹ e pela aplicação de 1 mL da solução estoque de micronutrientes, descrita no experimento 1. Foram realizadas duas avaliações, aos 10 e 20 dias após a emergência das plantas, sendo avaliada a nodulação (número e massa seca de nódulos) e o pH rizosférico do feijoeiro.

Tabela 2. Resultados da análise química dos solos usados no experimento 3 (dados obtidos no laboratório de solos/Depto. de solos/UFRRJ).

Tipo de solo	pH H ₂ O	Ca + Mg	Ca	Mg	Al	H + Al	Na	K	P	Corg	M.O.S.	V	S	T
		Cmolc / dm ³						ppm		%				
Baixo teor de argila	5,2	3,7	2,1	1,6	0,3	1,4	0,1	25,7	22,3	0,5	0,9	72,3	3,8	5,2
Médio teor de argila	5,0	4,7	3,0	1,8	0,2	2,7	0,2	32,7	16,7	0,8	1,3	64,3	4,9	7,6

Parte II. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial com 2 fontes de nitrogênio (KNO₃ e (NH₄)₂SO₄), 5 doses (0, 30, 60, 120 e 240 kg ha⁻¹), 2 tipos de solos, os mesmos do Ensaio 1 (baixo e teor médio de argila) e 3 neutralizantes (controle sem neutralizante, calcário e o pó da alga Lithothamnium) com 4 repetições. O pó da alga Lithothamnium é resultante da moagem de fragmentos mortos e carbonatados da alga encontrados em vastas jazidas situadas ao longo de praticamente toda costa brasileira em profundidades que variam de 12 a 20 metros. A coleta para fins comerciais é permitida de forma sistematizada desde que seja controlada e sob licença ambiental do IBAMA, Ministério do Meio Ambiente, DNPM e demais órgãos governamentais.

O processo industrial da alga envolve a secagem, moagem (50% passante na peneira 400 mesh) e o ensacamento, resultando em um produto com PRNT igual a 98%. A sua composição química média é de 32% de cálcio, 2,5% de magnésio, 0,2% de enxofre, 0,2% de cloro, 0,1% de ferro, 5 ppm de molibdênio, além de outros elementos traços. Este produto está devidamente registrado no Ministério da Agricultura sob o número RJ-06180 10000-8 e é comercializado para uso agrícola pela empresa Algarea S.A., cedente do produto para este trabalho de pesquisa, registrada neste mesmo órgão sob o número EP RJ 06180-8.

O calcário de rocha utilizado é do tipo dolomítico e possui características físico-químicas, como a granulometria e o PRNT, semelhantes às do pó da alga. As adubações foram realizadas como no ensaio 1. Devido à existência das informações de nodulação e pH rizosférico da coleta feita aos 10 dias após a emergência, provenientes do ensaio I, no ensaio II optou-se pela coleta das plantas somente aos 20 dias após a emergência, sendo realizado as

mesmas determinações do ensaio 1, a nodulação (número e massa seca de nódulos) e o pH rizosférico do feijoeiro.

3.3.4. Experimento 4. Liberação de OH^-/H^+ na solução nutritiva proveniente do metabolismo de nitrogênio aplicado via foliar aos quatro dias após emergência

Com o objetivo de estudar se a aplicação de fontes nitrogenadas via foliar nas plantas de feijão poderia alterar o pH da solução nutritiva, via liberação de OH^- / H^+ pelas raízes, este experimento foi instalado em solução nutritiva em um delineamento inteiramente casualizado com 5 fontes de nitrogênio (sem N, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 e uréia - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) e 4 repetições. Após a realização do teste de toxidez, devido à aplicação direta de N nas folhas, foi determinada a concentração de 1,35% de N para todas as fontes, correspondente à concentração de nitrogênio em uma solução 3% de uréia, dose considerada de baixa toxidez ao feijoeiro (ALMEIDA, 2000).

As sementes da cultivar Ouro Negro foram inoculadas e germinadas em areia lavada, posteriormente as plântulas aos 4 dias após a emergência foram fixadas em placas circulares de isopor e colocadas em vasos com 300 mL com a solução nutritiva ionicamente balanceada e constantemente aerada com o uso de compressores de aquário. Neste mesmo dia foi feita a aplicação única do nitrogênio através de pulverização nas folhas cotiledonares que se já encontravam completamente abertas. As plantas foram isoladas completamente com algodão e papel alumínio no processo de pulverização foliar para não cair N na solução nutritiva.

A solução nutritiva foi composta por 0,5 mM de K na forma de K_2SO_4 ; 0,5 mM de Ca na forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM de Mg na forma de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM de P na forma de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 μM de Fe na forma de FeNa-EDTA ; 0,5 μM de B na forma de H_3BO_3 ; 0,4 μM de Mn na forma de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16 μM de Zn na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 μM de Cu na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,04 μM de Co na forma de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 μM de Mo na forma de $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Esta solução nutritiva foi adaptada da metodologia proposta por JACOB NETO (2003). Apesar da elevação da concentração de cálcio, magnésio e fósforo para 0,5 mM o equilíbrio de cargas da solução foi conservado. As leituras de pH da solução nutritiva foram feitas nos tempos de 14, 24, 40, 64, 88, 112, 136, 160 e 280 horas após a aplicação da solução nitrogenada do respectivo tratamento nas folhas.

3.3.5. Experimento 5. Liberação de OH^-/H^+ na rizosfera e nodulação do feijoeiro suprido com nitrogênio aplicado via foliar aos quatro e seis DAE – Cultivo em areia

Após a realização do experimento 4, onde foi verificado que a aplicação foliar poderia ser usada para separar o efeito do contato direto das fontes nitrogenadas com as raízes da extrusão de OH^-/H^+ na rizosfera via metabolismo foliar, este experimento foi realizado no substrato areia com a aplicação do nitrogênio também através das folhas do feijoeiro. Os demais procedimentos experimentais foram exatamente iguais ao do experimento anterior, com exceção da dosagem nitrogênio que foi dividida em duas pulverizações foliares aplicadas na concentração de 0,67%, aos 4 e 6 dias após emergência. A adubação da areia com os demais nutrientes foi a mesma da realizada nos experimentos 1 e 2. A coleta foi realizada aos 10 DAE, sendo analisada a nodulação (número e massa seca de nódulos) e o pH da rizosfera do feijoeiro.

3.3.6. Experimento 6. Influência da presença de um inibidor da bomba de prótons - Efeito das fontes nitrogenadas no pH da rizosfera e na nodulação do feijoeiro

Considerando que a inativação da bomba de prótons na célula com a aplicação do vanadato e, conseqüentemente, a minimização da absorção de nitrato e amônio influenciando a extrusão de OH^-/H^+ pela raiz, podem ser associados ao processo de nodulação do feijoeiro, este experimento teve o objetivo de estudar esta interação. Foi instalado com o delineamento experimental inteiramente casualizado em um esquema fatorial do tipo $2 \times 4 \times 4$, com 2 fontes de nitrogênio (KNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 4 doses de nitrogênio (0, 60 e 120 e 240 kgN ha^{-1}) e 4 doses de vanadato (0, 115, 230 e 460 $\text{kgVO}_4 \text{ ha}^{-1}$ aplicados como Na_3VO_4 e 4 repetições, na cultivar Ouro Negro.

O vanadato foi aplicado no plantio juntamente com a adubação com macro e micronutrientes, que foram aplicados seguindo os mesmos procedimentos do experimento 1. As dosagens de vanadato correspondem, respectivamente, às concentrações aproximadas de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mM de soluções nutritivas freqüentemente utilizadas em experimentos onde se promove a inibição da ATPase de células vegetais e foram obtidas da aplicação de 0,5, 1,0 e 2,0 mL por vaso com 230 gramas de areia de uma solução 1 M de Na_3VO_4 transformando por hectare como descrito anteriormente. Foram realizadas duas coletas de plantas aos 10 e 20 DAE, sendo avaliada a nodulação (número e massa seca de nódulos) e o pH da rizosfera do feijoeiro.

3.4. Parâmetros Avaliados nos Experimentos

3.4.1. Condutividade elétrica

Foi utilizada a metodologia proposta por CAMARGO, et al. (1996) em extrato aquoso em uma proporção 1:1 entre a porção mineral (areia) e a água. O extrato foi feito através de agitação de 2 minutos e repouso por 48 horas. No momento da leitura foi feita uma nova agitação de aproximadamente 1 minuto e a leitura feita com o condutivímetro DIGIMED DM 31.

3.4.2. Produção de nódulos (número e massa seca)

Após a retirada das plantas dos vasos para a coleta de material mineral (areia e solo) para avaliação do pH da rizosfera (descrição no item seguinte), as raízes foram cuidadosamente lavadas com água corrente para não prejudicar os nódulos. A avaliação do número de nódulos foi realizada logo em seguida, enquanto os nódulos apresentavam-se bem frescos. A contagem dos nódulos foi feita sob uma lupa circular provida de lâmpada fluorescente sobre um pano preto. Os nódulos visíveis foram contados, retirados com bisturi, acondicionados em pequenos envelopes de papel, desidratados em estufa a 65°C e pesados em balança de precisão para a determinação da massa seca.

3.4.3. pH da rizosfera

As plantas foram retiradas do vaso plástico e erguidas pelo caule para a retirada da areia e do solo das regiões mais distantes das raízes (região não rizosférica). Com movimentos leves foi retirado o excesso da fração mineral existente, permanecendo apenas a pequena porção aderida às raízes (areia ou solo da região da rizosfera), sendo esta extraída através de agitação leve dentro de um copo plástico evitando choques com as paredes internas do copo e possíveis danos aos nódulos. Foi feita a avaliação de pH em água, onde o extrato aquoso foi

preparado conforme a metodologia da EMBRAPA em uma proporção 1:2,5 entre areia (ou solo) e água, com 10 gramas de material e 25 mL de água deionizada. O extrato foi feito através de agitação de 2 minutos e repouso por 2 horas. No momento da leitura foi realizada nova agitação de aproximadamente 1 minuto e a leitura feita com o peagâmetro manual SCHOTT-HANDYLAB 1.

3.5. Análises de estatística

Para todos os experimentos foi feita análise da variância no programa SAEG, sendo que nos experimentos em esquema fatorial foram realizadas análises das fontes de variação isoladamente, seguidas dos desdobramentos das interações quando significativas. No programa SAEG foram também realizadas as análises de regressão para o fator dose de nitrogênio e os testes de média Tukey e Scott-Knott, ambos com 5% de significância.

Para cada experimento foi montada uma tabela com análise da variância dos dados de cada parâmetro avaliado. Nas tabelas estão apresentados os valores da probabilidade ($Pr > F$) seguindo a distribuição de Snedecor, encontrados pela análise das variâncias. As análises foram realizadas assumindo distribuição normal e homogênea dos dados, realizada pelo teste de Lilliefors e teste de Cochran e Bartlett. Em seguida, serão apresentadas duas tabelas com dados também provenientes da ANOVA, uma com a significância estatística das fontes de variação isoladas e outra com o desdobramento das interações duplas e triplas ocorridas entre fatores, nos casos em que estas foram estatisticamente significativas. As interações triplas entre fatores só serão apresentadas quando forem necessárias para explicar um determinado efeito. Nos experimentos que possuem duas épocas de amostragem (10 e 20 dias após a emergência) foram feitas análises dos dados separadamente para cada época, utilizando o teste Tukey 5% para comparação.

O efeito das doses de nitrogênio sobre o número de nódulos planta⁻¹ foi avaliado através de análises da variância na regressão no SAEG, onde para cada curva de regressão o modelo de melhor ajuste foi selecionado de acordo com a significância na análise de variância na regressão e com o valor R^2 . O modelo de regressão de melhor ajuste foi utilizado para determinar, por substituição do valor de x na equação, o nível crítico referente à dose de nitrogênio de inibição total da nodulação do feijoeiro, assim como o valor de pH da rizosfera ocorrido nesta dose de nível crítico.

A dose de nitrogênio de convivência com a nodulação foi determinada através do uso das mesmas equações de regressão utilizadas para a determinação da dose de nível crítico de cada fonte de nitrogênio, em dados não transformados. Esta dose de convivência também foi obtida através da substituição do valor de x no modelo de regressão de melhor ajuste, gerado para cada fonte de nitrogênio. Esta dose correspondeu ao nível de nitrogênio onde ocorreu 80% da máxima nodulação, obtida predominantemente na dose zero de nitrogênio.

4. RESULTADOS

Para facilitar o entendimento, os resultados dos seis experimentos serão somente apresentados neste tópico, sendo todos discutidos no tópico seguinte (discussão).

4.1. Experimento 1. Avaliação Preliminar dos Efeitos das Soluções com Nitrogênio (Utilizadas nos Experimentos Seguintes) na Condutividade Elétrica do Substrato Areia.

Foram avaliados neste experimento os efeitos de diferentes dosagens de nitrogênio, fornecidas através das fontes nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), nos níveis de salinidade da areia e no pH do meio. Os dados da Tabela 3 mostram que o aumento das doses de nitrogênio provocou elevação progressiva e estatisticamente significativa da condutividade elétrica (CE) da areia até a dose de 480 kg N ha^{-1} , fato verificado nas duas fontes de nitrogênio testadas.

O amônio (fonte de N catiônica) proporcionou maiores valores de CE, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao nitrato (fonte de N aniônica), nas doses de 60, 120 e 240 kg N ha^{-1} , não ocorrendo diferenças significativas entre as duas fontes de nitrogênio nas doses de 0 e 480 kg N ha^{-1} . Portanto, doses mais elevadas de nitrogênio, podem elevar a condutividade elétrica do meio de crescimento, causando efeitos deletérios ao crescimento das plantas. Contudo, isto ocorreu nas duas fontes de N, não permitindo, portanto atribuir os efeitos de toxidez que geralmente ocorrem nas raízes crescidas com amônio unicamente ao efeito salino desta fonte.

Para o parâmetro pH da areia não houve efeito significativo das fontes de variação fonte de N e dose de N, no entanto a interação entre estes dois fatores foi significativa. O desdobramento da interação mostrou que em ambas as fontes de nitrogênio o aumento das dosagens não afetou expressivamente o pH. Somente na dose de 240 kg N ha^{-1} na forma de nitrato foi verificado um acréscimo significativo no valor do pH em relação à maior dose do experimento (480 kg N ha^{-1}). No entanto, este efeito parece estar associado a algum fator não controlado, como a insensibilidade do método analítico utilizado, uma vez que para esta fonte de N as doses inferiores a 240 kg N ha^{-1} promoveram valores de pH iguais ao da dose de 480 kg N ha^{-1} . Entre as fontes de nitrogênio verificou-se que somente na dose de 240 kg N ha^{-1} houve diferença entre elas, sendo na fonte nítrica encontrado um valor de pH superior ao da fonte amoniacal (Tabela 3).

Tabela 3. Dados médios, valores da probabilidade ($\text{Pr} > \text{F}$) e desdobramentos das interações para pH e condutividade elétrica da areia ($\mu\text{S cm}^{-1}$), sem cultivo de plantas. Experimento 1.

Avaliações	CE da areia ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		pH da areia	
	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NO_3^-	N- NH_4^+
0	1114 Ad	1114 Ad	4,44 Aab	4,44 Aa
60	1301 Bcd	1655 Ac	4,41 Aab	4,55 Aa
120	1606 Bbc	1916 Ac	4,48 Aab	4,59 Aa
240	1790 Bb	2297 Ab	4,76 Aa	4,35 Ba
480	2919 Aa	3132 Aa	4,28 Ab	4,42 Aa
Pr > F				
Fonte N	0,0001		NS*	
Dose N	0,0001		NS	
Fonte N x dose N	0,0304		0,0153	
CV%	8,0085		3,9103	

*NS = Não significativo.

Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

4.2. Experimento 2. Efeito da Aplicação de Fontes Nitrogenadas na Nodulação - Efeito do pH da Rizosfera.

Neste experimento em areia foi avaliada a nodulação e as alterações do pH da rizosfera de duas cultivares de feijoeiro na presença das mesmas fontes de nitrogênio utilizadas no experimento anterior, com a inclusão do nitrato de amônio (NH_4NO_3) que é uma fonte eletricamente neutra, nas doses de 0, 15, 30, 60, 120 e 240 kgN ha^{-1} .

Número de nódulos - experimento II

Os dados do experimento juntamente com os valores $\text{Pr} > \text{F}$ obtidos das análises de variância estão apresentados na Tabela 4, onde pode ser observado que em ambas as épocas de avaliação (10 e 20 dias após a emergência) ocorreu efeito estatisticamente significativo para todas as fontes de variação avaliadas (fonte de N, dose de N e cultivar). Para as interações entre os fatores dos experimentos observa-se que todas foram significativas aos 20 DAE e apenas a interação cultivar x fonte de N não foi significativa aos 10 DAE. Os coeficientes de variação dos dados das coletas aos 10 DAE (12,85%) e aos 20 DAE (20,28%) encontram-se dentro de uma variação esperada para experimentos que envolvem contagem de nódulos. Os dados médios mostrados na Tabela 4 são originais, porém a análise de variância foi feita nos dados transformados ($\sqrt{x+1}$).

Tabela 4. Média do número de nódulos planta⁻¹ em duas cultivares de feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de nitrogênio e avaliado em diferentes épocas. Resultados da ANOVA ($\text{Pr} > \text{F}$) realizada em dados transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 2.

Época de coleta	10 DAE						20 DAE					
	Ouro Negro			Rio Tibagi			Ouro Negro			Rio Tibagi		
Cultivar	N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ ⁺
Fonte de N	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ ⁺
Dose N (kg ha^{-1})												
0 (FBN)	14	19	10	4	12	4	97	57	61	19	21	27
15	7	9	11	4	2	0	79	42	27	32	20	7
30	5	8	4	0	0	0	131	8	39	48	3	5
60	0	0	0	0	0	0	53	3	27	22	0	22
120	1	0	0	0	0	0	14	0	7	18	0	5
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pr > F												
Fonte N	0,0001						0,0001					
Dose N	0,0001						0,0001					
Cultivar	0,0001						0,0001					
Fonte x dose	0,0001						0,0001					
Cultivar x dose	0,0001						0,0001					
Cultivar x fonte	NS						0,0001					
Fon. x dos. x cult.	0,0001						0,0202					
CV%	12,856						20,285					

NS = Não significativo.

As comparações dos efeitos individuais das fontes de variação que atuaram no experimento mostraram que aos 10 DAE com o uso do amônio como fonte de N foram verificados os maiores números de nódulos, seguido do nitrato e nitrato de amônio, sendo estas diferenças sempre significativas (Tabela 5). Aos 20 DAE verificou-se que plantas com nitrato tiveram maior nodulação. Comparando as cultivares, verificou-se que a maior

produção de nódulos ocorreu de forma significativa na cultivar Ouro Negro nas duas épocas de amostragem (também mostrado na Figura 4), com a nodulação sendo mais efetiva aos 20 DAE em relação à primeira época de amostragem.

Tabela 5. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹. Avaliações aos 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	Nº nódulos planta ⁻¹
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	3 a
	N-NH ₄ ⁺	4 b
	N-NH ₄ NO ₃	2 c
Cultivar	Ouro Negro	5 a
	Rio Tibagi	1 b
Época de coleta		20 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	Nº nódulos planta ⁻¹
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	43 a
	N-NH ₄ ⁺	13 c
	N-NH ₄ NO ₃	19 b
Cultivar	Ouro Negro	36 a
	Rio Tibagi	14 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Os desdobramentos das interações significativas ocorridas entre as fontes de variação do experimento estão apresentados na Tabela 6. O efeito do fator dose de nitrogênio na nodulação será explicado através das análises de regressão realizadas separadamente para cada fonte de N e cultivar (Tabela 7), onde foi determinada a significância e o nível crítico referente à dose de inibição total da nodulação. Considerando as interações aos 20 dias após a emergência entre fonte de N x dose de N e cultivar x dose de N, ficou claro que independente da fonte e da cultivar a partir da dose de 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio começou a ocorrer uma diminuição expressiva da nodulação chegando à inibição total da nodulação na dose de 240 Kg ha⁻¹ de nitrogênio.

A interação fonte de N x dose de N mostra que plantas crescidas com nitrato tiveram maior nodulação em relação às plantas com amônio desde a dose zero de N até 120 kgN ha⁻¹. Entre os fatores dose de N x cultivar, verificou-se superioridade significativa da cultivar Ouro Negro em relação à Rio Tibagi em todas as doses de nitrogênio onde a nodulação ocorreu expressivamente (0 a 60 kgN ha⁻¹). Na interação entre cultivar x fonte de N ficou evidenciado que a cultivar Ouro Negro foi sempre significativamente superior a cultivar Rio Tibagi, independente da fonte de nitrogênio (Tabela 6), sendo observado que o amônio foi a fonte de N que mais prejudicou a nodulação em relação às demais fontes.

Tabela 6. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹. Avaliações 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE				
Fonte N / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	9 b	6 a	3 b	0 a	1 a	0 a
N-NH ₄ ⁺	16 a	6 ab	4 a	0 a	0 a	0 a
N-NH ₄ NO ₃	7 c	6 b	2 b	0 a	0 a	0 a
Cultivar / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
Ouro Negro	14 a	9 a	6 a	0 a	0 a	0 a
Rio Tibagi	7 b	2 b	0 b	0 a	0 a	0 a
Época de coleta		20 DAE				
Fonte N / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	58 a	56 a	90 a	38 a	16 a	0 a
N-NH ₄ ⁺	39 b	31 b	6 c	2 b	0 c	0 a
N-NH ₄ NO ₃	44 ab	17 c	22 b	25 a	6 b	0 a
Cultivar / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
Ouro Negro	72 a	49 a	59 a	28 a	7 a	0 a
Rio Tibagi	22 b	20 b	19 b	15 b	8 a	0 a
Cultivar / fonte N	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ NO ₃	
Ouro Negro	62 Aa		18 Ca		27 Ba	
Rio Tibagi	23 Ab		7 Cb		11 Bb	

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Um dos principais objetivos deste trabalho foi o de verificar o efeito das fontes e das doses de nitrogênio no aparecimento e desenvolvimento de nódulos de plantas de feijoeiro. Entretanto, como o ensaio foi planejado através do delineamento experimental inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos no esquema fatorial com três fatores e diferentes níveis dentro de cada fator, efeitos importantes do ponto de vista biológico podem estar sendo confundidos.

Com o objetivo de avaliar isoladamente o efeito das cultivares testadas em relação à capacidade de produzir nódulos foi feita uma análise dos dados (teste Tukey 5%) de todos os tratamentos sem nitrogênio mineral, portanto com as plantas dependentes apenas do nitrogênio atmosférico. Estes dados estão apresentados na Figura 4 e comprovam a superioridade em produzir nódulos da cultivar Ouro Negro em relação à Rio Tibagi aos 10 e aos 20 dias após a emergência. Embora seja conhecido na literatura o contraste entre estas cultivares em relação à capacidade de produzir nódulos, não existem trabalhos que comparem a nodulação destas cultivares avaliando a inibição da nodulação concomitantemente às variações no pH da rizosfera de plantas supridas com diferentes fontes e doses de nitrogênio, como avaliado nesta tese.

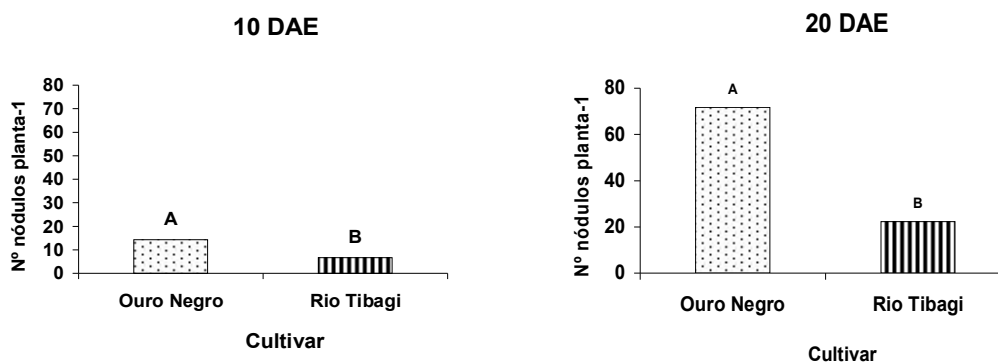


Figura 4. Resultados do teste de médias (Tukey 5%) para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹ de feijão, cultivares Ouro Negro e Rio Tibagi, em duas épocas de coleta. Avaliação feita somente em plantas crescidas sem nitrogênio mineral.

Anteriormente na Tabela 4, foi encontrado pelos dados da probabilidade da hipótese formulada ser verdadeira ($Pr > F$) pela análise da variância que a interação tripla foi estatisticamente significativa. Embora matematicamente esta significância possa sugerir a existência de relações simultâneas importantes entre as três fontes de variação analisadas, do ponto de vista biológico se torna complicada esta análise, visto que, por exemplo, soma-se o efeito de duas cultivares com características completamente diferentes.

Dentro da hipótese do trabalho, foram comparadas as médias entre si, visto que os três fatores, fonte de nitrogênio, dose de nitrogênio e cultivar, exercem efeito sobre elas. As possíveis diferenças entre elas foram, então, analisadas utilizando o teste de média Scott Knott (5%). Assim, somente neste experimento e apenas no parâmetro número de nódulos por planta, com interação tripla significativa, foi feito este teste de média comparando todas as combinações possíveis, com uma análise para cada época de amostragem (Tabelas 7 e 8).

Analisando os dados da cultivar Ouro Negro aos 10 dias após a emergência (Tabela 7) foi verificado que existiu diferença de forma estatisticamente significativa pelo teste Scott Knott 5%, do tratamento sem adubação de nitrogênio (19 nódulos planta⁻¹), para os demais 35 valores da combinação entre doses de nitrogênio e cultivares. É necessário ressaltar que no nível zero de adubação, os valores podem ser considerados repetições dentro de cada cultivar, pois não havia nenhuma outra fonte de variação. Portanto, é difícil de explicar as diferenças estatísticas de valores que ocorreram dentro de cada cultivar sem adubação nitrogenada. O teste geral novamente caracterizou a diferença de capacidade de nodulação que ocorre entre as duas cultivares, provando a maior capacidade noduladora da cultivar Ouro Negro em relação à cultivar Rio Tibagi, como também caracterizou a Figura 4.

De forma geral, ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento sem adubação nitrogenada e os tratamentos com adubação, seja nitrato ou amônio, com as diferenças mais pronunciadas, começando na dosagem de 30 kgN ha⁻¹. Para a fonte considerada neutra em termos de carga, o nitrato de amônio, na cultivar Ouro Negro a dose utilizada de 15 kgN ha⁻¹ não diferiu do nível zero. Só começou a ocorrer diferenças a partir de 30 kgN ha⁻¹. Essa época de amostragem é importante ser analisada cuidadosamente, pois o sistema radicular do feijoeiro e o processo de formação de nódulos ainda estão no início de suas formações.

Na avaliação feita aos 20 dias após a emergência (Tabela 8) foi verificada a maior nodulação na cultivar Ouro Negro com o uso do nitrato na dose de 30 kgN ha⁻¹, sendo esta dose diferente estatisticamente de todos valores em outras combinações, indicando claramente um efeito benéfico desta fonte e dose na nodulação do feijoeiro. Esta fonte só inibiu completamente a nodulação na dose de 240 kgN ha⁻¹. A fonte amônio começou a prejudicar o

processo de nodulação já nas doses iniciais. Na cultivar Rio Tibagi, que apesar de possuir menor capacidade de nodulação, o efeito da fonte e dose de nitrogênio foi semelhante, sendo o maior número de nódulos obtido com nitrato na dose 30 kgN ha⁻¹. As maiores doses de nitrogênio em todas as fontes de nitrogênio inibiram a nodulação das plantas de feijoeiro aqui testadas.

Tabela 7. Teste de média para o número de nódulos planta⁻¹ influenciado por todos os tratamentos do experimento, simultaneamente, aos 10 dias após a emergência. Análise realizada em dados transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 2.

Cultivar	Ouro Negro			Rio Tibagi			
	Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃
Dose N (kg ha ⁻¹)							
0		14 B	19 A	10 C	4 F	12 C	4 F
15		7 E	9 D	11 C	4 F	2 G	0 H
30		5 F	8 D	4 F	0 H	0 H	0 H
60		0 H	0 H	0 H	0 H	0 H	0 H
120		1 G	0 H	0 H	0 H	0 H	0 H
240		0 H	0 H	0 H	0 H	0 H	0 H

Médias seguidas de mesmas letras nas linhas e colunas não diferem estatisticamente entre si (teste Scott Knott 5%).

Tabela 8. Teste de média para o número de nódulos planta⁻¹ influenciado por todos os tratamentos do experimento, simultaneamente, aos 20 dias após a emergência. Análise realizada em dados transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 2.

Cultivar	Ouro Negro			Rio Tibagi			
	Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃
Dose N (kg ha ⁻¹)							
0		97 B	57 D	61 D	19 F	21 F	27 F
15		79 C	42 E	27 F	32 E	20 F	7 H
30		131 A	8 H	39 E	48 E	3 I	5 I
60		53 D	3 I	27 F	22 F	0 J	22 F
120		14 G	0 J	7 H	18 F	0 J	5 I
240		0 J	0 J	0 J	0 J	0 J	0 J

Médias seguidas de mesmas letras nas linhas e colunas não diferem estatisticamente entre si (teste Scott Knott 5%).

Outra estratégia utilizada para facilitar a interpretação biológica do efeito das doses de nitrogênio na nodulação foi a realização de análises da variância na regressão para este fator. Foi também determinado o nível crítico para a dosagem de nitrogênio de inibição total da nodulação e a dose de nitrogênio capaz de inibir apenas 20% da nodulação (dose de convivência). Estas análises de regressão foram feitas isoladamente para cada fonte de nitrogênio, cultivar e época de amostragem (Tabela 9).

Análises de regressão para número de nódulos – experimento II

Para este experimento em areia, nas análises de regressão, feitas com os dados não transformados, o modelo de equação polinomial de 3ª ordem foi, na maioria dos casos, o mais adequado para explicar os efeitos das doses de nitrogênio afetando a produção de nódulos do feijoeiro. Após a determinação do modelo da curva de regressão, a determinação do nível crítico das doses de nitrogênio foi feita utilizando a respectiva equação para encontrar a dose de N correspondente ao número de nódulos igual a zero e a dose que inibisse 20% da nodulação máxima (dose de convivência).

Nota-se na Tabela 9 que para todas as fontes de nitrogênio e em ambas as cultivares houve uma expressiva diferença nos valores de nível crítico do nitrogênio em função das épocas de coleta. Os níveis críticos para dose de N diferenciaram-se entre as cultivares avaliadas, sendo os menores níveis obtidos na cultivar Rio Tibagi em relação à Ouro Negro, estando de acordo com a Figura 4. Isto comprova que nesta cultivar a sensibilidade ao nitrogênio foi maior e a nodulação foi facilmente prejudicada. Por este tipo de análise, comparando o efeito da fonte nitrogenada, verifica-se que aos 20 dias após emergência em ambas as cultivares a utilização da fonte amônio foi a mais prejudicial à nodulação do feijoeiro.

Na cultivar Ouro Negro, aos 20 DAE, por exemplo, para se atingir o nível de toxidez da fonte amônio capaz de inibir totalmente a nodulação, foi necessário adicionar 81 kgN ha⁻¹. Para a fonte nitrato esta dose foi de 139 kgN ha⁻¹. Os valores de nitrato de amônio foram próximos aos do nitrato. Aos 10 dias após a emergência, as diferenças entre as fontes nitrogenadas foram pequenas, especialmente na cultivar Ouro Negro. Na cultivar Rio Tibagi as diferenças foram um pouco mais acentuadas, com fonte amoniacal sendo muito mais prejudicial à nodulação em relação ao nitrato.

Comparando os resultados das análises utilizando o teste Tukey 5%, obtidos com a análise de variância normal, com os dados das análises de regressão para o parâmetro número de nódulos, pode ser visto que são similares. Entretanto, os valores exatos das doses que inibem a nodulação não podem ser calculados precisamente pela análise convencional. É importante ressaltar que nas análises de regressão feitas para todas as fontes de nitrogênio, cultivares e épocas de coleta, além das probabilidades obtidas na ANOVA ($Pr > F$) terem sido altamente significativas, praticamente todas as curvas tiveram valores de “R²” superiores a 75%. Como a interpretação do valor R² refere-se à proporção de variação da variável do eixo y (número de nódulos) explicada pela variação da variável do eixo x (dose de nitrogênio), estes resultados indicam que mais de 75% das quedas na produção número de nódulos do feijoeiro puderam ser explicadas pelo aumento das doses de nitrogênio.

As maiores diferenças entre as doses de convivência, dose capaz de reduzir em 20% a nodulação do feijoeiro, obtida para cada fonte de nitrogênio, também foram verificadas aos 20 dias após a emergência, sendo a necessário 58 kg ha⁻¹ de nitrogênio, para reduzir em 20% a nodulação (Tabela 9). Nesta época foi verificado novamente que, das fontes de N testadas, o amônio foi a que promoveu o maior efeito inibidor à nodulação, sendo observadas as menores doses de convivência em ambas as cultivares. As doses de convivência obtidas com o uso da fonte nitrato de amônio aos 20 DAE foram intermediárias às observadas no nitrato e no amônio (Tabela 9). Os resultados aos 10 DAE mostraram pequenas diferenças entre as fontes de nitrogênio.

Tabela 9. Obtenção das doses de NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 para a inibição total (nível crítico) e para a redução de 20% da nodulação (dose de convivência) em duas cultivares de feijoeiro avaliado em diferentes épocas. Análises de regressão realizadas em dados não transformados. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE					
Cultivar	Ouro Negro			Rio Tibagi			
Fonte de N	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NH_4NO_3	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NH_4NO_3	
Equação da regressão	$y = -0,000009x^3 + 0,0038x^2 - 0,4233x + 13,889$	$y = -0,0001x^3 + 0,0043x^2 - 0,5207x + 18,36$	$y = -0,000005x^3 + 0,0022x^2 - 0,2979x + 11,968$	$y = -0,000003x^3 + 0,0013x^2 - 0,1524x + 4,7497$	$y = -0,00001x^3 + 0,0042x^2 - 0,4252x + 10,207$	$y = -0,000003x^3 + 0,0012x^2 - 0,1182x + 2,7143$	
R ² (%)	93,31	86,14	86,37	75,51	94,00	75,03	
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	
Dose de N para nodulação = zero.	64 kg ha ⁻¹	65 kg ha ⁻¹	73 kg ha ⁻¹	49 kg ha ⁻¹	34 kg ha ⁻¹	33 kg ha ⁻¹	
Dose de N para redução de 20% da nodulação.	7 kg ha ⁻¹	8 kg ha ⁻¹	9 kg ha ⁻¹	7 kg ha ⁻¹	5 kg ha ⁻¹	5 kg ha ⁻¹	
Época de coleta		20 DAE					
Cultivar	Ouro Negro			Rio Tibagi			
Fonte de N	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NH_4NO_3	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NH_4NO_3	
Equação da regressão	$y = 0,00005x^3 - 0,014x^2 + 0,2896x + 97,587$	$y = 0,0025x^2 - 0,792x + 47,62$	$y = 0,0013x^2 - 0,5195x + 51,015$	$y = 0,00002x^3 - 0,008x^2 + 0,5625x + 24,091$	$y = -0,00001x^3 + 0,0059x^2 - 0,7023x + 23,33$	$y = -0,000005x^3 + 0,0019x^2 - 0,233x + 18,594$	
R ² (%)	78,65	82,01	77,57	77,05	82,38	65,86	
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	
Dose de N para nodulação = zero.	139 kg ha ⁻¹	81 kg ha ⁻¹	173 kg ha ⁻¹	146 kg ha ⁻¹	63 kg ha ⁻¹	132 kg ha ⁻¹	
Dose de N para redução de 20% da nodulação.	58 kg ha ⁻¹	13 kg ha ⁻¹	21 kg ha ⁻¹	55 kg ha ⁻¹	8 kg ha ⁻¹	20 kg ha ⁻¹	

Massa seca de nódulos – experimento II

Para o parâmetro massa seca de nódulos, neste e nos demais ensaios, foi feita a análise da variância fatorial (Tabela 10) e foram realizados os desdobramentos das interações significativas através do teste Tukey com 5% de significância (Tabela 12). Nos desdobramentos das interações foram mostradas somente as significâncias dos efeitos das fontes de nitrogênio e das cultivares de feijoeiro testadas.

As análises da variância apresentadas na Tabela 10, referentes às duas épocas de avaliação da massa seca de nódulos planta⁻¹ de feijão, mostram que todas as fontes de variação e interações entre fatores apresentaram significância estatística (Pr > F). Assim como aconteceu na avaliação do número de nódulos, a massa seca também apresentou coeficientes de variação dentro de uma variação esperada para a produção de nódulos, sendo de 4,74% para a amostragem aos 10 dias após a emergência e de 9,77% para a coleta aos 20 dias após a emergência. A Tabela 10 mostra que o aumento das doses de nitrogênio afetaram fortemente e progressivamente a produção de massa seca de nódulos, tal como verificado para o parâmetro número de nódulos (Tabela 4). Também ocorreu forte inibição da produção de massa seca de nódulos a partir da dose de 30 kgN ha⁻¹ aos 10 dias após a emergência e de 60 kgN ha⁻¹ aos 20 dias após a emergência, especialmente na cultivar Rio Tibagi. Os dados mostrados na Tabela 10 são originais, porém a análise da variância foi feita nos dados transformados ($\sqrt{x+1}$).

Tabela 10. Média da massa seca de nódulos (mg planta⁻¹) em duas cultivares de feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de nitrogênio e avaliado em diferentes épocas. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 2.

Época de coleta	10 DAE						20 DAE					
Cultivar	Ouro Negro			Rio Tibagi			Ouro Negro			Rio Tibagi		
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃
Dose N (kg ha ⁻¹)												
0	1,740	4,005	1,323	0,258	1,281	0,408	20,50	21,10	21,76	15,78	10,65	9,67
15	0,175	0,861	0,500	0,089	0,018	0,000	11,95	10,78	2,86	7,91	7,38	0,72
30	0,078	0,188	0,042	0,000	0,000	0,000	16,27	2,36	5,68	4,71	0,03	0,90
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7,56	0,16	2,65	1,85	0,00	1,22
120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,16	0,00	0,26	0,15	0,00	0,12
240	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pr > F												
Fonte N	0,0001						0,0001					
Dose N	0,0001						0,0001					
Cultivar	0,0001						0,0001					
Fonte x dose	0,0001						0,0001					
Cultivar x dose	0,0001						0,0001					
Cultivar x fonte	0,0001						0,0014					
Fon. x dos x cult	0,0001						0,0001					
CV%	4,7442						9,777					

Comparando as médias das fontes nitrogenadas do experimento II foi verificado que a fonte de amônio proporcionou o maior ganho de massa nodular na primeira época de coleta (Tabela 11). Já aos 20 dias após a emergência com o uso do nitrato foram encontrados os maiores valores de massa seca de nódulos. As cultivares foram diferentes significativamente nas duas épocas de amostragem, com menor produção de massa de nódulos na cultivar Rio Tibagi em relação à Ouro Negro (Tabela 11).

Tabela 11. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro massa seca de nódulos (mg planta⁻¹). Avaliações aos 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 2.

Época de coleta	10 DAE	
Fonte de variação (FV)	Tratamento	MS nódulos (mg planta ⁻¹)
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	0,195 b
	N-NH ₄ ⁺	0,529 a
	N-NH ₄ NO ₃	0,189 b
Cultivar	Ouro Negro	0,495 a
	Rio Tibagi	0,114 b
Época de coleta	20 DAE	
Fonte de variação (FV)	Tratamento	MS nódulos (mg planta ⁻¹)
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	7,32 a
	N-NH ₄ ⁺	4,37 b
	N-NH ₄ NO ₃	3,82 b
Cultivar	Ouro Negro	6,95 a
	Rio Tibagi	3,39 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Os dados das interações duplas para o parâmetro massa seca de nódulos que foram significativamente diferentes encontram-se na Tabela 12. Foi verificado aos 10 DAE que a massa seca de nódulos das plantas crescidas com amônio foi estatisticamente diferente das plantas com nitrato e nitrato de amônio no tratamento das plantas somente inoculadas. Assim como aconteceu com o número de nódulos, estas diferenças não podem ser explicadas visto que estas plantas na verdade não receberam adubação nitrogenada. Nas demais interações entre fonte de N x dose de N não foram encontradas diferenças entre as fontes de nitrogênio, diferente do encontrado para o número de nódulos na Tabela 6, onde foram encontradas diferenças entre as fontes de nitrogênio na dose 15 e 30 kgN ha⁻¹.

Ainda nesta coleta, a interação cultivar x dose de nitrogênio a cultivar Ouro Negro apresentou maior produção nodular somente até a dosagem de 15 kgN ha⁻¹, sendo não significativo nas dosagens superiores de nitrogênio. Foi observado na cultivar Ouro Negro maior massa de nódulos na dose zero, sendo superior às doses de 15 e 30 kgN ha⁻¹ e nas doses superiores não houve produção de nódulos. Na cultivar Rio Tibagi a produção de massa seca de nódulos foi menor. Na interação cultivar x fonte de nitrogênio foi verificado, ainda aos 10 dias após a emergência, que a cultivar Ouro Negro apresentou maior massa de nódulos em relação à Rio Tibagi em todas as fontes de nitrogênio testadas. Entre as fontes de nitrogênio não foram observadas variações significativas na cultivar Rio Tibagi, e na cultivar Ouro Negro a fonte amônio foi diferente das outras fontes testadas (Tabela 12).

Na avaliação realizada aos 20 dias após a emergência (Tabela 12) a interação fonte de N x dose de N mostrou maior produção de massa seca de nódulos com o nitrato, seguida do nitrato de amônio e por último o amônio. Somente na dose de 15 kgN ha⁻¹ houve mesma produção nodular com o uso do amônio em relação ao nitrato. Com relação à interação cultivar x dose de nitrogênio foram verificados os maiores valores na cultivar Ouro Negro em relação à Rio Tibagi até a dose 60 kgN ha⁻¹, não sendo verificados efeitos significativos nas doses superiores. Para a interação cultivar x fonte de N foi verificado que houve significância entre as cultivares em todas as fontes de nitrogênio, com a cultivar Ouro Negro superior à Rio Tibagi. Entre as fontes de nitrogênio, com a aplicação de nitrato foram obtidos os maiores valores de massa de nódulos em quando comparado às demais fontes de N em ambas as cultivares.

Tabela 12. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro massa seca de nódulos (mg planta^{-1}). Avaliações 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE					
Fonte N / dose N (kg ha^{-1})	0	15	30	60	120	240	
N-NO ₃ ⁻	0,999 b	0,132 a	0,039 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	
N-NH ₄ ⁺	2,643 a	0,440 a	0,094 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	
N-NH ₄ NO ₃	0,866 b	0,250 a	0,021 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	
Cultivar / dose N (kg ha^{-1})	0	15	30	60	120	240	
Ouro Negro	2,356 a	0,512 a	0,103 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	
Rio Tibagi	0,649 b	0,036 b	0,000 a	0,000 a	0,000 a	0,000 a	
Cultivar / fonte N	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ NO ₃		
Ouro Negro	0,332 Ba		0,842 Aa		0,311 Ba		
Rio Tibagi	0,058 Ab		0,217 Ab		0,068 Ab		
Época de coleta		20 DAE					
Fonte N / dose N (kg ha^{-1})	0	15	30	60	120	240	
N-NO ₃ ⁻	18,14 a	9,93 a	10,49 a	4,71 a	0,66 a	0,00 a	
N-NH ₄ ⁺	15,88 b	9,08 a	1,20 c	0,08 c	0,00 b	0,00 a	
N-NH ₄ NO ₃	15,72 b	1,79 b	3,29 b	1,94 b	0,19 ab	0,00 a	
Cultivar / dose N (kg ha^{-1})	0	15	30	60	120	240	
Ouro Negro	21,12 a	8,53 a	8,10 a	3,46 a	0,47 a	0,00 a	
Rio Tibagi	12,03 b	5,34 b	1,88 b	1,02 b	0,09 a	0,00 a	
Cultivar / fonte N	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ NO ₃		
Ouro Negro	9,57 Aa		5,73 Ba		5,54 Ba		
Rio Tibagi	5,07 Ab		3,01 Bb		2,11 Bb		

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

pH da rizosfera – experimento II

As variações do pH da região da rizosfera promovidas pelas fontes de nitrogênio mineral, consideradas neste trabalho como uma das causas da inibição da nodulação das plantas de feijão, foram avaliadas aos 10 e aos 20 dias após a emergência. A Tabela 13 mostra que na análise da variância realizada na primeira época de amostragem todas as fontes de variação isoladas foram significativas, assim como as interações fonte de N x dose de N e cultivar x fonte de N. Na ANOVA da segunda coleta a fonte de variação cultivar não foi significativa e todas as interações apresentaram significância.

Os dados mostrados na Tabela 13 são originais, porém a análise da variância foi feita nos dados transformados por log de x nos dados de ambas as épocas de amostragem. Para as doses de N foram observados valores de pH rizosférico muito próximos em todas as dosagens, com uma tendência geral de elevação do pH em função do aumento das dosagens (Tabela 13) em ambas cultivares e nas duas avaliações. Na segunda avaliação realizada aos 20 dias após a emergência, o efeito das fontes e doses foram muito mais significativos, alterando realmente o pH da rizosfera.

Tabela 13. Média do pH da rizosfera de duas cultivares de feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de nitrogênio e avaliado em diferentes épocas. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados transformados por Log de x. Experimento 2.

Época de coleta	10 DAE						20 DAE					
Cultivares	Ouro Negro			Rio Tibagi			Ouro Negro			Rio Tibagi		
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NH ₄ NO ₃
Dose N (kg ha⁻¹)												
0	6,33	6,28	6,31	6,31	6,28	6,27	4,41	4,24	4,24	4,36	4,35	4,37
15	6,46	6,35	6,41	6,52	6,20	6,17	4,99	4,08	4,28	4,77	4,01	4,39
30	6,49	6,23	6,51	6,50	6,24	6,15	4,99	4,09	4,45	4,98	4,06	4,21
60	6,45	6,19	6,49	6,48	6,22	6,21	5,33	3,95	4,29	5,62	3,97	4,16
120	6,55	6,18	6,48	6,60	6,15	6,21	5,74	3,81	4,28	5,95	3,77	4,11
240	6,66	6,11	6,26	6,69	6,06	6,21	5,98	3,62	4,26	6,45	3,54	4,38
Pr > F												
Fonte N				0,0001						0,0001		
Dose N				0,0309						0,0001		
Cultivar				0,0001						NS		
Fonte x dose				0,0001						0,0001		
Cultivar x dose				NS						0,0001		
Cultivar x fonte				0,0001						0,0003		
Fon. x dos. x cult.				0,0001						0,0001		
CV%				0,579						1,6093		

NS = Não significativo.

A análise das médias das fontes de variação isoladas (Tabela 14) mostra que o nitrato foi a fonte de N que promoveu os maiores valores de pH da rizosfera aos 10 DAE, diferente estatisticamente das outras fontes amônio e nitrato de amônio, embora não tenha havido diferenças entre as duas ultimas fontes. Nesta interação, os valores de pH da rizosfera da cultivar Ouro Negro foram superiores estatisticamente dos valores obtidos na cultivar Rio Tibagi. Aos 20 dias após a emergência, as diferenças entre as fontes de nitrogênio foram mais marcantes, com os maiores valores de pH verificados na fonte nitrato (pH 5,30) seguido pelo nitrato de amônio (pH 4,28) e os menores valores obtidos com o uso do amônio, que gerou como média geral do experimento o valor de pH igual a 3,96.

Tabela 14. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliações aos 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE	
Fonte de variação (FV)	Tratamento	pH rizosfera	
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	6,50 a	
	N-NH ₄ ⁺	6,21 b	
	N-NH ₄ NO ₃	6,13 b	
Cultivar	Ouro Negro	6,37 a	
	Rio Tibagi	6,30 b	
Época de coleta		20 DAE	
Fonte de variação (FV)	Tratamento	pH rizosfera	
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	5,30 a	
	N-NH ₄ ⁺	3,96 c	
	N-NH ₄ NO ₃	4,28 b	

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Na Tabela 15 estão as interações significativas realizadas aos 10 DAE. Embora as interações tenham sido significativas, nos desdobramentos dos fatores não foram verificados efeitos estatisticamente significativos (Tabela 15). Para as amostragens feitas aos 20 DAE, no desdobramento da interação entre fonte de N e cultivar foi verificado efeito significativo apenas entre as fontes de nitrogênio, onde no nitrato ocorreram os maiores valores de pH em relação às demais fontes. Pode ser observado que na dosagem de 30 kgN ha⁻¹ de nitrato, que foi onde foram encontrados os maiores números de nódulos foi encontrado também o maior valor de pH, significando efeito positivo do aumento do pH da rizosfera. Esta significância ocorreu quando se comparou o efeito da fonte de N dentro das duas cultivares avaliadas.

Na interação entre dose de N e cultivar não ocorreu nenhum efeito significativo entre as variáveis. Na interação fonte de N x dose de N foram observadas diferenças significativas do pH da rizosfera com o aumento das doses de nitrogênio fornecido somente na forma de nitrato. Para mostrar o efeito biológico das doses de nitrogênio proveniente das fontes nitrato e amônio sobre o pH rizosférico foram feitas análises de regressão para cada uma destas fonte de nitrogênio, em cada cultivar e em cada época de coleta (Tabela 16).

Tabela 15. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliações 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE				
Fonte N / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	6,32 a	6,49 a	6,50 a	6,47 a	6,58 a	6,68 a
N-NH ₄ ⁺	6,28 a	6,28 a	6,24 a	6,21 a	6,17 a	6,09 a
N-NH ₄ NO ₃	6,29 a	6,29 a	6,33 a	6,35 a	6,35 a	6,24 a
Cultivar / fonte N	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ NO ₃	
Ouro Negro	6,49 Aa		6,22 Aa		6,41 Aa	
Rio Tibagi	6,52 Aa		6,19Aa		6,20 Aa	
Época de coleta		20 DAE				
Fonte N / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	4,39 a	4,88 a	4,99 a	5,48 a	5,85 a	6,22 a
N-NH ₄ ⁺	4,30 a	4,05 a	4,08 b	3,96 b	3,79 b	3,58 b
N-NH ₄ NO ₃	4,31 a	4,34 a	4,33 ab	4,23 b	4,20 b	4,32 b
Cultivar / dose N (kg ha ⁻¹)	0	15	30	60	120	240
Ouro Negro	4,30 a	4,45 a	4,51 a	4,52 a	4,61 a	4,62 a
Rio Tibagi	4,36 a	4,39 a	4,42 a	4,58 a	4,61 a	4,79 a
Cultivar / fonte N	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺		N-NH ₄ NO ₃	
Ouro Negro	5,24 Aa		3,97 Ba		4,30 Ba	
Rio Tibagi	5,36 Aa		3,95 Ba		4,27 Ba	

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Análises de regressão para pH da rizosfera – experimento II

Analisando separadamente cada fonte de nitrogênio através de análises de regressão, isoladamente dentro de cada fonte de N, cultivar e época de coleta (Tabela 16), verificaram-se em todos os casos alta significância estatística na ANOVA ($Pr > F$) e valores de “R²” superiores a 50% na coleta aos 10 dias após a emergência e maiores que 90% e 80%, para nitrato e amônio, respectivamente, nas plantas coletadas aos 20 dias após a emergência. Para cada caso analisado foi selecionado o modelo de regressão de melhor ajuste. Neste caso, o modelo de regressão linear foi utilizado para a obtenção do valor de pH rizosférico ocorrido na dose de nível crítico do nitrogênio para inibição total da nodulação do feijoeiro obtido na Tabela 9.

Os dados da Tabela 16 mostram que aos 10 DAE para ambas as cultivares as doses de nível crítico (NC) das duas fontes de nitrogênio tiveram poucas diferenças entre si e causaram pouca influência no pH da rizosfera, estando em todos os casos em valores superiores a 6,0. Aos 20 dias após a emergência foi verificado, nas duas cultivares, que a dose de nível crítico de nitrato necessário para inibir a nodulação foi substancialmente superior à dose de nível crítico para amônio.

Para a fonte nitrato a dose de nível crítico na cultivar Ouro Negro foi de 139 kgN ha⁻¹ e na Rio Tibagi de 146 kgN ha⁻¹, que proporcionaram valores de pH rizosférico de 5,59 e 5,91, respectivamente. Para a fonte amônio a dose de nível crítico na cultivar Ouro Negro foi de 81 kgN ha⁻¹ e na Rio Tibagi de 63 kgN ha⁻¹, gerando valores de pH da rizosfera de 3,95 e 4,00, respectivamente. Embora as doses altas de ambas as fontes de N tenham inibido a nodulação, o que será discutido mais adiante, os resultados deste experimento sugerem a

existência de uma relação entre as variações de pH da rizosfera do feijoeiro, causada pela fonte de nitrogênio mineral, e a inibição da nodulação. Este fato foi ainda mais marcante na avaliação feita aos 20 dias após a emergência com o uso de amônio, cuja dose de inibição total da nodulação foi também causadora de uma expressiva acidificação da rizosfera.

Tabela 16. pH rizosférico ocorrido na dose de N (NO_3^- e NH_4^+) de inibição total da nodulação (nível crítico) em duas cultivares de feijoeiro avaliado em diferentes épocas. Análises de regressão realizadas em dados não transformados. Experimento 2.

Época de coleta		10 DAE			
Cultivar	Ouro Negro		Rio Tibagi		
Fonte de N	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NO_3^-	N- NH_4^+	
Equação da regressão	$y = 0,0011x + 6,4054$	$y = -0,0008x + 6,2864$	$y = 0,0012x + 6,4292$	$y = -0,0008x + 6,2593$	
R ² (%)	60,74	60,77	54,29	57,46	
Pr > F	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	
pH na dose de NC do N de inibição da total da nodulação.	6,48	6,23	6,49	6,23	
Dose de NC das fontes de N	64 kg ha ⁻¹	65 kg ha ⁻¹	49 kg ha ⁻¹	34 kg ha ⁻¹	

Época de coleta		20 DAE			
Cultivar	Ouro Negro		Rio Tibagi		
Fonte de N	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NO_3^-	N- NH_4^+	
Modelo da curva	$y = 0,0057x + 4,7999$	$y = -0,0024x + 4,1468$	$y = 0,0081x + 4,7319$	$y = -0,0028x + 4,1716$	
R ² (%)	94,72	82,62	97,60	84,17	
ANOVA (Pr > F)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	
pH na dose de NC do N de inibição da total da nodulação.	5,59	3,95	5,91	4,00	
Dose de NC das fontes de N	139 kg ha ⁻¹	81 kg ha ⁻¹	146 kg ha ⁻¹	63 kg ha ⁻¹	

4.3. Experimento 3. Inibição da nodulação do feijoeiro cultivado em diferentes tipos de solo: Parte I - Efeito do poder tampão do solo sem correção da acidez; Parte II - Efeito do poder tampão do solo com correção da acidez.

Parte I. Número de nódulos – experimento III

Foi verificado que, assim como ocorreu na areia, nas plantas crescidas em solo na avaliação aos 10 dias após a emergência, foi observado a inibição total da nodulação na dose de 240 kgN ha⁻¹, em ambos os tipos de solo e fontes de nitrogênio (Tabela 17). Neste experimento, a análise da variância mostrou que o único efeito estatisticamente significativo foi verificado para a fonte de variação dose de N, não sendo significativas as interações duplas e com apenas a interação tripla entre fonte x dose x solo, significativa. Isto pode indicar que o efeito do poder tampão exercido pela argila e/ou outros elementos presente no solo, como a matéria orgânica, obscurece o efeito da comparação entre fontes nesta fase inicial de desenvolvimento de nódulos.

O que ficou claro foi o efeito das doses de nitrogênio influenciando o número de nódulos, que será apresentada através de análises de regressão. Entretanto, nesta época de avaliação, comparando as análises de variância deste experimento com as do experimento 2, resultados das plantas crescidas somente no substrato areia (Tabela 4) com os obtidos com solos (Tabela 17), verificou-se que eles foram completamente diferentes. No substrato areia, aos 10 dias após a emergência praticamente todos os efeitos das fontes de variação e as interações entre elas foram altamente significativas.

Tabela 17. Média do número de nódulos planta⁻¹ de feijão crescido com diferentes fontes e doses de nitrogênio e em dois tipos de solo. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 10 DAE e transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 3 (parte I).

Tipo de solo	Baixo teor de argila		Médio teor de argila	
	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺
Dose N (kg ha ⁻¹)				
0	6	6	4	4
30	4	4	2	4
60	1	1	2	1
120	2	0	1	1
240	0	0	0	0
Pr > F				
Fonte N	NS			
Dose N	0,0001			
Solo	NS			
Fonte N x dose N	NS			
Fonte N x solo	NS			
Dose N x solo	NS			
Fon N x dose N x solo	0,0384			
CV%	20,096			

NS = Não significativo.

Como no experimento 2 (em areia) foram feitas comparações entre resultados da primeira e segunda coleta, no presente experimento, excepcionalmente para o parâmetro número de nódulos, os dados dos tratamentos controles do Ensaio II (20 DAE), de plantas sem neutralizantes, foram analisados. A análise de variância destes dados demonstrou que ocorreu diferença estatisticamente significativa para as fontes de variação, com exceção apenas da interação entre fonte e dose de nitrogênio (dados não tabelados). Estes resultados são praticamente iguais aos da avaliação encontrados no experimento 2 nesta mesma época. Ao desdobrar foi observado que ocorreu maior número de nódulos nas plantas crescendo no solo com menor teor de argila.

Parte I. Análise de regressão para número de nódulos- experimento III

Na Tabela 18 estão apresentados os dados das análises de regressão para a variável dose de nitrogênio para as diferentes fontes nos dois tipos de solo testados. A Tabela mostra os níveis críticos de cada fonte de N, que é a dose onde ocorreu a inibição total da nodulação, e a dose de nitrogênio de convivência com a nodulação. Nota-se que aos prevaleceu o modelo linear (1ª ordem) para explicar com alta significância (Pr > F) a maioria dos efeitos das dosagens na nodulação do feijoeiro, principalmente no solo com baixo teor de argila onde também foram obtidos os maiores valores de “R²”. Para os dois tipos de solo o nitrato gerou

doses de nível crítico superiores às doses obtidas com o amônio, sendo esta diferença mais expressiva no solo com baixo teor de argila.

A dose de convivência seguiu com tendências semelhantes às dos níveis críticos. No solo com baixo teor de argila a dose de convivência para o amônio foi de 15 kgN ha⁻¹ e para o nitrato foi de 44 kgN ha⁻¹, mostrando que, neste solo, o amônio exerceu maior efeito inibidor à nodulação. No solo com médio teor de argila, as diferenças entre as duas fontes de nitrogênio foram menos marcantes, mostrando um possível efeito do tamponamento pela argila, encontrada em maior concentração neste solo. Os resultados aos 10 dias após a emergência deste experimento em solo diferenciaram-se expressivamente dos observados no experimento em areia. Na areia, além de terem sido observadas menores doses de convivência, foram também verificadas inexpressivas diferenças entre as fontes de nitrogênio.

Tabela 18. Obtenção das doses de NO₃⁻ e NH₄⁺ para a inibição total (nível crítico) e para a redução de 20% da nodulação (dose de convivência) do feijoeiro crescido em diferentes tipos de solo. Análises de regressão realizadas em dados coletados aos 10 DAE e não transformados. Experimento 3 (parte I).

Tipo de solo	Baixo teor de argila		Médio teor de argila	
	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺
Fonte de N				
Modelo da curva	y = -0,019x + 4,2062	y = 0,0002x ² - 0,0829x + 5,9269	y = -0,0135x + 2,8188	y = -0,0177x + 3,2938
R ² (%)	60,68	88,60	50,37	51,91
Pr > F	0,0005	0,0001	0,0005	0,0003
Dose de N para nodulação = zero.	218 kg ha ⁻¹	91 kg ha ⁻¹	208 kg ha ⁻¹	186 kg ha ⁻¹
Dose de N para redução de 20% da nodulação.	44 kg ha ⁻¹	15 kg ha ⁻¹	42 kg ha ⁻¹	38 kg ha ⁻¹

Parte I. Massa seca de nódulos – experimento III

Na análise da variância para o atributo massa seca de nódulos de plantas de feijão coletadas aos 10 dias após a emergência (Tabela 19) no Ensaio I, houve efeito significativo apenas para as fontes de variação dose de nitrogênio e tipo de solos e todas as interações entre os fatores do experimento foram não significativas.

Tabela 19. Média da massa seca de nódulos (mg planta^{-1}) do feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de nitrogênio e em dois tipos de solo. Resultados da ANOVA ($\text{Pr} > \text{F}$) realizada em dados coletados aos 10 DAE e transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 3 (parte I).

Tipo de solo	Baixo teor de argila		Médio teor de argila		
	Dose N (kg ha^{-1})	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NO_3^-	N- NH_4^+
0		0,798	1,271	0,437	0,534
30		0,189	0,274	0,184	0,242
60		0,085	0,065	0,047	0,049
120		0,417	0,000	0,008	0,021
240		0,000	0,000	0,000	0,000
Pr > F					
Fonte N		NS			
Dose N		0,0001			
Solo		0,0354			
Fonte N x dose N		NS			
Fonte N x solo		NS			
Dose N x solo		NS			
Fon N x dos N x solo		NS			
CV%		10,767			

NS = Não significativo.

Os resultados da Tabela 20 mostram que aos 10 dias após a emergência para o fator tipo de solo, que no solo com baixo teor de argila foram encontrados nódulos com maior massa seca do que no solo com médio teor de argila. O efeito da variável dose de nitrogênio será analisado através de análises de regressão.

Tabela 20. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro massa seca de nódulos (mg planta^{-1}). Avaliação aos 10 DAE. Experimento 3 (parte I).

Época de coleta	10 DAE	
	Fonte de variação (FV)	MS nódulos (mg planta^{-1})
Tipo de solo	Baixo teor de argila	0,310 a
	Médio teor de argila	0,152 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Parte I. pH da rizosfera – experimento III

Na avaliação do pH da rizosfera do feijoeiro (Tabela 21) amostrado aos 10 dias após a emergência foram verificadas diferenças significativas para todas as fontes de variação testadas, além das interações fonte e dose de nitrogênio e fonte de nitrogênio e tipo de solo. Estes resultados são semelhantes aos do experimento 2 com o substrato areia e, portanto, o teor de argila não alterou os efeitos das fontes nitrogenadas na sua capacidade de modificar o pH da rizosfera.

Tabela 21. Médias do pH da rizosfera do feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de nitrogênio e em dois tipos de solo. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 10 DAE e não transformados. Experimento 3 (parte I).

Tipo de solo	Baixo teor de argila		Médio teor de argila		
	Dose N (kg ha ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺
0		5,23	5,32	4,23	4,50
30		5,36	5,38	4,45	4,51
60		5,42	5,02	4,40	4,47
120		5,52	4,77	4,29	4,35
240		5,29	4,51	4,27	4,38
Pr > F					
Fonte N		0,0332			
Dose N		0,0141			
Solo		0,0001			
Fonte N x dose N		0,0158			
Fonte N x solo		0,0001			
Solo x dose N		NS			
Fon N x dos N x solo		NS			
CV%		5,315			

NS = Não significativo.

Para as médias das fontes de variação (Tabela 22) foi visto que o nitrato proporcionou maiores valores de pH do que o amônio. O solo com baixo teor de argila apresentou valores de pH da rizosfera significativamente maiores do que o solo com médio teor de argila.

Tabela 22. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliação aos 10 DAE. Experimento 3 (parte I).

Época de coleta	10 DAE	
Fonte de variação (FV)	Tratamento	pH rizosfera
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	4,90 a
	N-NH ₄ ⁺	4,70 b
Tipo de solo	Baixo teor de argila	5,18 a
	Médio teor de argila	4,39 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

A interação entre fonte de N e dose de N não foi significativa (Tabela 23), embora pela análise da probabilidade Pr > F (0,0158) ter sido encontrado diferença significativa. Na interação tipo de solo x fonte de N, não ocorreu efeito significativo da fonte de N, somente do tipo de solo, sendo os maiores valores encontrados no solo com menor teor de argila.

Tabela 23. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliação aos 10 DAE. Experimento 3 (parte I).

Fonte N / dose N (kg ha ⁻¹)	0	30	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	4,73 a	4,91 a	4,91 a	4,91 a	4,78 a
N-NH ₄ ⁺	4,91 a	4,95 a	4,75 a	4,56 a	4,45 a
Solo / fonte N	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺		
Baixo teor de argila	5,36 Aa		5,00 Aa		
Médio teor de argila	4,33 Ab		4,44 Ab		

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Parte I. Análise de regressão para pH da rizosfera – experimento III

Neste experimento apenas tiveram diferenças significativas e elevado valor de “R²” no solo com baixo teor de argila e com o uso de amônio. Neste solo, a dose de NC para esta fonte de nitrogênio foi de 91 kgN ha⁻¹ (pH = 5,00) e para o nitrato a dose de NC foi de 218 kgN ha⁻¹ (pH = 5,38), mostrando que, embora sem significância da fonte nítrica, houve uma maior tendência às plantas apresentarem uma maior sensibilidade ao amônio. Neste tipo de solo estas doses de nitrogênio inibiram a nodulação, porém não promoveram diferenças expressivas entre si nos valores de pH rizosférico (Tabela 24).

No solo com baixo teor de argila o NC para o nitrato foi muito próximo ao verificado no solo com médio teor de argila, porém o pH rizosférico foi superior. Para a fonte amônio, no solo com baixo teor de argila foi verificado maior valor de pH rizosférico e a dose de NC sendo a metade da obtida no solo com médio teor de argila. No solo com médio teor de argila a aplicação de amônio e nitrato em dosagens próximas proporcionou semelhantes valores de pH rizosférico (4,29 e 4,39, respectivamente), mostrando um possível efeito da argila em tamponar o meio externo às raízes.

Comparando os dois tipos de solo, nota-se que para o nitrato a inibição da nodulação ocorreu com praticamente a mesma quantidade de nitrogênio. No entanto, nesta quantidade de nitrogênio e no solo com baixo teor de argila, o pH rizosférico foi superior ao obtido no solo com médio teor de argila em mais de um ponto de pH, indicando que para esta fonte de nitrogênio a inibição da nodulação teve baixa relação com as variações de pH ocorridas da rizosfera. No caso do amônio, no solo com médio teor de argila para ocorrer a inibição da nodulação inicial do feijoeiro foi necessária a aplicação de uma quantidade de nitrogênio duas vezes maior do que a aplicada no solo com baixo teor de argila, indicando um possível efeito do tamponamento em função da concentração de argila sobre a inibição da nodulação inicial do feijoeiro (Tabela 24). Como neste experimento foram usados solos não esterilizados, é importante ainda, considerar a possibilidade de uma expressiva parte do amônio aplicado estar sendo convertida a nitrato por microorganismos nitrificadores.

Tabela 24. pH rizosférico ocorrido na dose de N (NO_3^- e NH_4^+) de inibição total da nodulação (nível crítico) do feijoeiro crescido em diferentes tipos de solo. Análises de regressão realizadas em dados coletados aos 10 DAE e não transformados. Experimento 3 (parte I).

Tipo de solo	Baixo teor de argila		Médio teor de argila		
	Fonte de N	N- NO_3^-	N- NH_4^+	N- NO_3^-	N- NH_4^+
Modelo da curva		$y = 0,0001x + 5,3552$	$Y = -0,0037x + 5,3345$	$y = -0,0003x + 4,3567$	$y = -0,0006x + 4,5021$
R ² (%)		4,15	72,87	5,43	5,72
Pr > F		NS	0,0001	NS	NS
pH na dose de NC do N de inibição da total da nodulação.		5,38	5,00	4,29	4,39
Dose de NC das fontes de N		218 kg ha ⁻¹	91 kg ha ⁻¹	208 kg ha ⁻¹	186 kg ha ⁻¹

Parte II. Número de nódulos – experimento III

Este ensaio foi realizado após verificar que ocorreu um baixo número de nódulos no Ensaio I, sendo uma das causas prováveis os baixos valores de pH rizosférico ocorrido nestes solos que não tinham sido corrigidos. Portanto, com o objetivo de verificar se a correção do solo alteraria esta possível causa o Ensaio II foi instalado, utilizando calcário dolomítico e o pó da alga *Lithothamnium*, sendo estas plantas coletadas apenas aos 20 dias após a emergência.

Nos dados do número de nódulos por planta obtidos aos 20 dias após a emergência foi realizada a análise variância, que gerou os valores de Pr > F contidos na Tabela 25. Nela pode ser observado que ocorreram efeitos significativos para todas as fontes de variação analisadas isoladamente (fonte de N, dose de N, tipo de solo e tipo de neutralizante de acidez). Ocorreram interações duplas que foram significativas como, por exemplo, entre tipo de solo e fonte de nitrogênio e entre tipo de solo e dose de nitrogênio e também tripla entre fonte N x dose N x solo. Apesar de não terem sido apresentados neste trabalho, nesta primeira forma de apresentação dos resultados pode ocorrer até interação quádrupla (fonte N x dose N x solo x corretivos). Isto pode dificultar o entendimento biológico, pois é difícil comparar os efeitos somados referentes aos diferentes tipos de solo, além dos outros fatores. Embora sabendo disso, os efeitos significativos (Pr > F) das fontes de variação isoladas e os desdobramentos das interações significativas estão apresentados a diante. Optou-se por analisar o efeito das dosagens de nitrogênio utilizando análises de regressão.

Tabela 25. Média do número de nódulos planta⁻¹ de feijão crescido com diferentes fontes e doses de N, neutralizantes de acidez e tipos de solo. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 20 DAE e transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 3 (parte II).

Tipo de solo		Baixo teor de argila						Médio teor de argila				
Fonte de N		N-NO ₃ ⁻			N-NH ₄ ⁺			N-NO ₃ ⁻			N-NH ₄ ⁺	
Dose N (Kg ha ⁻¹)	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário
0	17	22	18	19	21	17	16	20	16	15	19	15
30	16	19	15	20	30	24	14	17	13	7	11	8
60	5	9	4	4	18	10	8	12	8	3	6	4
120	3	6	2	2	6	2	1	3	3	0	3	0
240	0	3	1	0	2	0	0	2	1	0	2	0
Pr > F												
Fonte N		0,0225										
Dose N		0,0001										
Neutralizante		0,0001										
Tipo de solo		0,0001										
Fonte x dose		NS										
Fonte x neutralz.		NS										
Solo x fonte N		0,0001										
Dose x neutraliz.		NS										
Solo x dose N		0,0001										
Neutraliz. x solo		NS										
Fon x dos x neutr		NS										
Fon x dos x solo		0,0001										
Fon x solo x neut		NS										
Dos x solo x neut		NS										
CV%		13,931										

NS= Não significativo.

Verifica-se na Tabela 26, avaliação das fontes de variação isoladas, que entre as fontes de nitrogênio houve maior número de nódulos em plantas supridas com o nitrato, fonte que eleva o pH rizosférico, em relação às plantas crescidas com amônio, que promove a acidificação da rizosfera. Comparando os neutralizantes, a Tabela 26 mostra que no tratamento com a alga *Lithothamnium* foi verificada a maior taxa de nodulação em relação aos demais tratamentos (com calcário e sem neutralizante). Entre os dois tipos de solo foi verificada a maior nodulação no solo com baixo teor de argila em relação ao solo com teor médio de argila.

Tabela 26. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹ de feijão. Avaliação realizada aos 20 DAE. Experimento 3 (parte II).

Época de coleta		20 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	Nº nódulos planta ⁻¹
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	9 a
	N-NH ₄ ⁺	8 b
Neutralizante	Controle	8 b
	<i>Lithothamnium</i>	12 a
	Calcário	8 b
Fonte de N	Baixo teor de argila	11 a
	Médio teor de argila	8 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Na avaliação dos desdobramentos das interações significativas da Tabela 27, foi verificado no solo com baixo teor de argila que o número de nódulos das plantas crescidas com amônio foi estatisticamente superior ao das plantas crescidas com a fonte nitrato. No solo com maior teor de argila isto ocorreu ao contrário, ou seja, o maior número de nódulos foi encontrado com nitrato. Na interação tipo de solo e dose de N, no solo com baixo teor de argila ocorreu maior nodulação em relação ao solo com médio teor de argila somente dentro das doses de zero, 30 e 120 kgN ha⁻¹. O efeito da variável dose de nitrogênio será apresentado na Tabela 28, em seguida, através das análises de regressão.

Tabela 27. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹ de feijão. Avaliações realizadas aos 20 dias após a emergência. Experimento 3 (parte II).

Tipo de solo / fonte N	N-NO₃⁻		N-NH₄⁺		
Baixo teor de argila	9 Ba		12 Aa		
Médio teor de argila	9 Aa		6 Bb		

Tipo de solo / dose de N	0	30	60	120	240
Baixo teor de argila	19 a	21 a	8 a	4 a	1 a
Médio teor de argila	17 b	12 b	7 a	2 b	1 a

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Parte II. Análise de regressão para número de nódulos – experimento III

A Tabela 28 mostra na avaliação feita aos 20 dias após a emergência e com a inclusão da variável neutralizante de acidez, que todas as curvas de dosagem apresentaram significância no teste F ($Pr > F$), nos modelos de regressão de melhor ajuste. Isto indica que em todos os casos analisados houve efeito significativo da dose de nitrogênio, sendo pelo menos uma dose diferente das demais com relação ao efeito na nodulação do feijoeiro. Os resultados da Tabela 28 mostram que predominaram os modelos polinomiais de 2ª e 3ª ordem e valores “R²” superiores a 80%.

Analisando as diferenças entre os solos, comparando os resultados obtidos em cada fonte de nitrogênio e cada neutralizante, verifica-se que no solo com médio teor de argila os valores de nível crítico do nitrogênio foram obtidos em doses mais baixas do que no solo com baixo teor de argila. Entre as fontes de nitrogênio não foram observadas diferenças expressivas. Em relação aos neutralizantes foi verificado que na ausência dos mesmos o nível crítico do nitrogênio foi mais baixo, o efeito neutralizante da alga lithothamnium proporcionou os maiores valores de NC em relação aos efeitos exercidos pelo calcário, em todas as curvas analisadas.

Neste experimento, foram obtidos valores de nível crítico do nitrogênio, para a inibição total da nodulação, superiores aos observados no experimento 2, realizado em areia (Tabela 7). Para a mesma cultivar testada em ambos os experimentos (Ouro Negro), no experimento em areia aos 20 dias após a emergência as plantas de feijão apresentaram NC de 139 kgN ha⁻¹ para o nitrato e de 81 kgN ha⁻¹ para o amônio (Tabela 7). No experimento em solo predominou a dose de NC para o nitrato em valores acima de 200 kgN ha⁻¹ e para o amônio em valores acima de 100 kgN ha⁻¹ (Tabela 28).

No solo com médio teor de argila houve uma ligeira tendência em serem obtidas as maiores doses de convivência com o uso da fonte nitrato, com dosagens na ordem de 24 kgN ha⁻¹, em relação ao uso da fonte amônio, onde foram encontrados valores próximos a 16 kgN ha⁻¹. Entre os diferentes tipos de neutralizantes da acidez do solo não foram observadas diferenças expressivas. No solo com baixo teor de argila, com o uso da fonte de nitrogênio nitrato a maior dose de convivência ocorreu no tratamento sem neutralizante de acidez e não houve diferença entre os produtos alcalinizantes. Já na fonte amoniacal as doses de convivência mais elevadas foram obtidas na presença dos neutralizantes de acidez, com destaque para o calcário dolomítico.

Avaliando o efeito da textura do solo na magnitude das doses de convivência com a nodulação (Tabela 28), verificou-se que no solo arenoso houve a possibilidade de se obter maiores níveis de nitrogênio para causar a redução de 20% da nodulação. Isto se concretiza ao analisar apenas os tratamentos controle, sem neutralizante, sendo observadas diferenças ainda mais evidentes com o uso do nitrato como fonte de nitrogênio. Outro efeito interessante ocorreu entre as fontes de N e entre os neutralizantes no solo com baixo teor de argila. Com o uso da fonte de nitrogênio que alcalinizou a rizosfera (nitrato) a maior dose de convivência foi encontrada no tratamento sem neutralizante (controle). Somente quando se utilizou a fonte de nitrogênio que acidifica a rizosfera (amônio) foi verificado efeito benéfico dos neutralizantes, possibilitando a obtenção de doses de convivência do nitrogênio superiores à dose ocorrida no tratamento controle.

Tabela 28. Obtenção das doses de NO_3^- e NH_4^+ para a inibição total (nível crítico) e para a redução de 20% da nodulação (dose de convivência) do feijoeiro crescido em diferentes tipos de solo e neutralizantes de acidez. Análises de regressão realizadas em dados coletados aos 20 DAE e não transformados. Experimento 3 (parte II).

Tipos de solo	Baixo teor de argila						Médio teor de argila					
	N- NO_3^-			N- NH_4^+			N- NO_3^-			N- NH_4^+		
Fontes N												
Neutralizante	Controle	Lithotham	Calcário	Controle	Lithotham	Calcário	Controle	Lithotham	Calcário	Controle	Lithotham	Calcário
Modelo da curva	y = - 0,0712x + 14,812	y = - 0,000002x ³ + 0,0011x ² - 0,2618x + 23,398	y = - 0,000002x ³ + 0,0013x ² - 0,2707x + 18,551	y = 0,0007x ² - 0,256x + 21,315	y = 0,0003x ² - 0,1722x + 26,685	y = - 0,089x + 18,506	y = 0,000003x ³ - 0,0004x ² - 0,1177x + 16,898	y = 0,0005x ² - 0,1944x + 21,108	y = 0,0004x ² - 0,1583x + 16,188	y = 0,0006x ² - 0,1904x + 13,458	y = 0,0006x ² - 0,2113x + 17,904	y = 0,0006x ² - 0,1943x + 14,238
R ² (%)	83,00	78,65	90,79	80,97	81,11	70,90	93,12	69,31	75,27	89,85	92,60	94,21
Pr > F	0,0006	0,0007	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Dose de N para nodulação = zero.	208 kg ha ⁻¹	225 kg ha ⁻¹	309 kg ha ⁻¹	128 kg ha ⁻¹	284 kg ha ⁻¹	207 kg ha ⁻¹	164 kg ha ⁻¹	218 kg ha ⁻¹	196 kg ha ⁻¹	106 kg ha ⁻¹	222 kg ha ⁻¹	112 kg ha ⁻¹
Dose de N para redução de 20% da nodulação.	41 kg ha ⁻¹	19 kg ha ⁻¹	16 kg ha ⁻¹	18 kg ha ⁻¹	33 kg ha ⁻¹	41 kg ha ⁻¹	27 kg ha ⁻¹	23 kg ha ⁻¹	22 kg ha ⁻¹	15 kg ha ⁻¹	18 kg ha ⁻¹	16 kg ha ⁻¹

Parte II. Massa seca de nódulos – experimento III

A análise da variância da Tabela 29, onde as plantas foram coletadas aos 20 dias após a emergência, indica que todas as fontes exerceram efeitos significativos estatisticamente no peso de nódulos, exceto a fonte de nitrogênio que não exerceu efeito sobre este parâmetro. As interações duplas foram todas significativas estatisticamente, com exceção da interação fonte de nitrogênio e dose deste elemento. As únicas interações triplas significativas foram fonte x dose x neutralizante e fonte x dose x solo.

Tabela 29. Média da massa seca de nódulos (mg planta⁻¹) do feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de N, neutralizantes de acidez e tipos de solo. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 20 DAE e transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 3 (parte II).

Tipo de solo	Baixo teor de argila						Médio teor de argila						
	Fonte de N		N-NO ₃ ⁻			N-NH ₄ ⁺			N-NO ₃ ⁻			N-NH ₄ ⁺	
Dose N (Kg ha ⁻¹)	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	
0	1,355	2,538	1,748	2,015	2,695	1,623	1,468	2,660	1,638	1,578	2,462	1,728	
30	1,570	2,328	1,455	1,727	3,472	2,650	1,065	2,285	1,230	0,697	1,582	0,973	
60	0,413	1,252	0,277	0,227	2,575	1,213	0,763	1,790	0,635	0,135	0,710	1,190	
120	0,125	0,690	0,105	0,068	0,695	0,115	0,053	0,335	0,190	0,000	0,200	0,000	
240	0,000	0,200	0,020	0,000	0,082	0,000	0,000	0,107	0,025	0,000	0,078	0,000	
Pr > F													
Fonte N	NS												
Dose N	0,0001												
Neutralizante	0,0001												
Tipo de solo	0,0001												
Fonte x dose	NS												
Fonte x neutralz.	0,0490												
Solo x fonte N	0,0001												
Neutraliz. x Dose	0,0001												
Dose x solo	0,0001												
Neutraliz. x solo	0,0340												
Fon x dos x neutr	0,0013												
Fon x dos x solo	0,0001												
Fon x solo x neut	NS												
Dos x solo x neut	NS												
CV%	8,684												

NS = Não significativo

Na análise das fontes de variação significativas (Tabela 30) foi verificada nodulação significativamente superior no solo com baixo teor de argila em relação ao com médio teor de argila. Comparando os neutralizantes foi verificada maior produção de massa nodular em plantas crescidas com a alga em relação ao tratamento controle e ao tratamento com calcário, sendo este também superior ao controle.

Tabela 30. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro massa seca de nódulos do feijoeiro (mg planta^{-1}). Avaliação realizada aos 20 DAE. Experimento 3 (parte II).

Época de coleta		20 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	MS nódulos (mg planta^{-1})
Neutralizante	Controle	0,633 c
	Lithothamnium	1,437 a
	Calcário	0,841 b
Fonte de N	Baixo teor de argila	1,108 a
	Médio teor de argila	0,853 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

No desdobramento da interação entre tipo de solo e fonte de nitrogênio (Tabela 31) foi verificado efeito significativo somente quando se comparou o efeito do tipo de solo dentro da fonte amoniacal, sendo a maior de produção nodular no solo com menor teor de argila. Entre os fatores tipo de solo e dose de nitrogênio só ocorreram diferenças na dose de 30 kgN ha^{-1} , onde a nodulação foi maior no solo com baixo teor de argila. Na interação tipo de solo x neutralizante não foi encontrado efeito significativo do fator solo em todos os neutralizantes, porém foi verificado efeito significativo dos neutralizantes com maior produção de massa seca de nódulos com o uso do Lithothamnium em relação aos demais tratamentos. Na interação entre neutralizante e dose de N, só ocorreram diferenças entre os corretivos quando não foi aplicado nitrogênio no solo.

Tabela 31. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro massa seca de nódulos do feijoeiro (mg planta⁻¹). Avaliações realizadas aos 20 dias após a emergência. Experimento 3 (parte II).

Tipo de solo / fonte N		N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺	
Baixo teor de argila		0,938 Aa		1,277 Aa	
Médio teor de argila		0,950 Aa		0,756 Ab	

Tipo de solo / dose de N	0	30	60	120	240
Baixo teor de argila	1,996 a	2,200 a	0,993 a	0,300 a	0,050 a
Médio teor de argila	1,922 a	1,305 b	0,871 a	0,130 a	0,035 a

Tipo de solo / neutralizante	Sem neutralizante	Lithothamnium	Calcário
Baixo teor de argila	0,750 Ba	1,653 Aa	0,921 Ba
Médio teor de argila	0,576 Ba	1,221 Aa	0,761 ABa

Fonte N / neutralizante	Sem neutralizante	Lithothamnium	Calcário
N-NO ₃ ⁻	0,681 Ba	1,419 Aa	0,732 Ba
N-NH ₄ ⁺	0,645 Ba	1,455 Aa	0,949 ABa

Neutralizante / dose N	0	30	60	120	240
Sem neutralizante	1,604 b	1,265 b	0,385 b	0,062 a	0,000 a
Lithothamnium	2,589 a	2,417 a	1,582 a	0,480 a	0,117 a
Calcário	1,684 b	1,577 ab	0,829 ab	0,103 a	0,011 a

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Parte II. pH da rizosfera – experimento III

Para o feijoeiro coletado aos 20 dias após a emergência, os dados da análise da variância (Tabela 32) indicam que todas as fontes de variação (isoladas) foram estatisticamente significativas. As interações duplas significativas na análise da variância ocorreram foram fonte de N x dose de N, fonte de N x solo, e dose de N x solo. A única interação tripla significativa foi entre fonte N x dose N x solo.

Tabela 32. Médias do pH da rizosfera do feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de N, neutralizantes de acidez e tipos de solo. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 20 DAE e transformados por Log de x. Experimento 3 (parte II).

Tipo de solo		Baixo teor de argila						Médio teor de argila				
Fonte de N		N-NO ₃ ⁻			N-NH ₄ ⁺			N-NO ₃ ⁻			N-NH ₄ ⁺	
Dose N (Kg há ⁻¹)	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário	Controle	Lithothamnium	Calcário
0	5,49	5,38	5,47	5,36	5,52	5,68	4,37	4,60	4,30	4,44	4,57	4,32
30	5,30	5,66	5,57	5,06	5,25	5,17	4,40	4,53	4,47	4,42	4,46	4,33
60	5,68	5,79	5,83	5,11	5,45	5,15	4,49	4,70	4,55	4,16	4,43	4,23
120	5,97	5,99	6,19	4,70	4,90	4,59	4,66	4,84	4,65	4,15	4,41	4,20
240	6,10	6,23	6,04	4,14	4,57	4,09	4,69	4,81	4,73	4,11	4,39	4,20
Pr > F												
Fonte N	0,0001											
Dose N	0,0024											
Neutralizante	0,0001											
Tipo de solo	0,0001											
Fonte x dose N	0,0001											
Fonte x neutralz	NS											
Solo x fonte N	0,0001											
Dose x neutraliz.	NS											
Solo x dose N	0,0001											
Neutraliz. x solo	NS											
Fon x dos x neutr	NS											
Fon x dos x solo	0,0001											
Fon x solo x neut	NS											
Dos x solo x neut	NS											
CV%	2,632											

NS = Não significativo

Os dados da Tabela 33, para as fontes de variação isoladas que foram estatisticamente significativas, mostrou que a fonte nitrato foi a que mais elevou o pH rizosférico. Com relação aos neutralizantes, os valores de pH da região rizosférica obtidos com o uso do lithothamnium foram estatisticamente superiores aos dos tratamentos controle e com calcário. Para o efeito do tipo de solo, os menores valores do pH da rizosfera foram encontrados no solo com maior teor de argila.

Tabela 33. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliação realizada aos 20 DAE. Experimento 3 (parte II).

Época de coleta	20 DAE	
Fonte de variação (FV)	Tratamento	pH rizosfera
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	5,18 a
	N-NH ₄ ⁺	4,65 b
Neutralizante	Controle	4,84 b
	Lithothamnium	5,02 a
	Calcário	4,89 b
Fonte de N	Baixo teor de argila	5,38 a
	Médio teor de argila	4,45 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Nos desdobramentos das interações (Tabela 34) foi verificado que na interação fonte de nitrogênio x doses de nitrogênio não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas dentro de cada dose de nitrogênio, o mesmo ocorreu para a interação tipo de solo x dose de N. Entre tipo de solo x fonte de nitrogênio, observou-se que para ambos os tipos de solo foram encontrados os maiores valores de pH para a plantas crescendo com nitrato. Em ambas as fontes de nitrogênio os maiores valores de pH foram obtidos no solo com menor teor de argila.

Tabela 34. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliações realizadas aos 20 dias após a emergência. Experimento 3 (parte II).

Fonte N / dose N	0	30	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	4,94 a	4,99 a	5,17 a	5,38 a	5,43 a
N-NH ₄ ⁺	4,98 Aa	4,78	4,76 a	4,49 a	4,25 a

Tipo de solo / fonte de N	N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺
Baixo teor de argila	5,78 Aa	4,98 Ba
Médio teor de argila	4,59 Ab	4,32 Bb

Tipo de solo / dose N	0	30	60	120	240
Baixo teor de argila	5,48 a	5,34 a	5,50 a	5,39 a	5,20 a
Médio teor de argila	4,43 a	4,44 a	4,43 a	4,49 a	4,49 a

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Parte II. Análise de regressão para pH da rizosfera – experimento III

Na Tabela 35 estão as análises de regressão para a determinação do valor de pH da rizosfera na dose de NC de inibição da nodulação inicial do feijoeiro cultivado em solos com diferentes teores de argila, onde em todos os casos o modelo linear foi o de melhor ajuste com valores de probabilidade ($Pr > F$), da análise da variância na regressão, altamente significativos. Nos tratamentos controle (sem neutralizantes) em ambos os tipos de solo, o amônio inibiu a nodulação com dose inferior a do nitrato e gerou maior acidificação na rizosfera, assim como ocorrido no experimento 2.

Nota-se na Tabela 35 que no solo com baixo teor de argila, com uso do nitrato os maiores valores de NC ocorreram com os neutralizantes em relação ao controle, com destaque para o calcário, sendo nestes tratamentos também observados os maiores valores de pH gerados na dose de NC. Neste mesmo tipo de solo o NC do amônio foi superior nos tratamentos com corretivos, principalmente com a alga *Lithothamnium*, em relação ao tratamento controle, cuja menor dose de NC gerou a menor acidificação da rizosfera. No solo com médio teor de argila observou-se que para nitrato e amônio no tratamento com a alga *lithothamnium* foram observados os maiores valores de NC para inibição da nodulação do feijoeiro, bem como os maiores valores de pH da rizosfera (Tabela 35).

Tabela 35. pH rizosférico ocorrido na dose de N (NO_3^- e NH_4^+) de inibição total da nodulação (nível crítico) do feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de N, neutralizantes de acidez e tipos de solo. Análises de regressão realizadas em dados coletados aos 10 DAE e não transformados. Experimento 3 (parte II).

Tipos de solo	Baixo teor de argila						Médio teor de argila					
	N- NO_3^-			N- NH_4^+			N- NO_3^-			N- NH_4^+		
Fontes N												
Neutralizante	Controle	Lithotham	Calcário	Controle	Lithotham	Calcário	Controle	Lithotham	Calcário	Controle	Lithotham	Calcário
Equação da regressão	$y = 0,0031x + 5,4326$	$y = 0,0033x + 5,5213$	$y = 0,0025x + 5,5938$	$y = -0,0049x + 5,3211$	$y = -0,004x + 5,4988$	$y = -0,0062x + 5,499$	$y = 0,0014x + 4,3964$	$y = 0,0011x + 4,601$	$y = 0,0016x + 4,3989$	$y = -0,0014x + 4,3818$	$y = -0,0006x + 4,5064$	$y = -0,0006x + 4,3106$
R ² (%)	43,71	74,52	66,05	83,63	50,29	91,47	49,18	49,13	76,37	69,22	25,61	39,21
Pr > F	0,0015	0,0001	0,0001	0,0001	0,0005	0,0001	0,0006	0,0006	0,0001	0,0001	0,0228	0,0031
pH na dose de NC do N de inibição total da nodulação	6,08	6,26	6,37	4,69	4,36	4,22	4,63	4,84	4,50	4,23	4,37	4,24
Dose de N para nodulação = zero.	208 kg ha ⁻¹	225 kg ha ⁻¹	309 kg ha ⁻¹	128 kg ha ⁻¹	284 kg ha ⁻¹	207 kg ha ⁻¹	164 kg ha ⁻¹	218 kg ha ⁻¹	196 kg ha ⁻¹	106 kg ha ⁻¹	222 kg ha ⁻¹	112 kg ha ⁻¹

4.4. Experimento 4. Liberação de OH⁻/H⁺ na Solução Nutritiva Proveniente do Metabolismo de Nitrogênio Aplicado Via Foliar aos 4 DAE

Os valores de F na análise da variância ($Pr > F$) foram significativos para todas as variáveis envolvidas neste experimento e a interação entre elas (Tabela 36). Os fatores deste estudo foram fontes de nitrogênio e tempos de leitura do pH da solução nutritiva após a aplicação do nitrogênio via foliar. Verificou-se (Tabela 36) uma queda gradativa do pH da solução nutritiva em função do tempo, independente da fonte de nitrogênio. Na média geral das fontes de nitrogênio aplicadas na folha do feijoeiro é possível notar que o nitrato foi a fonte que proporcionou os maiores valores de pH da solução nutritiva, seguido seqüencialmente do nitrato de amônio, uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), amônio e por fim o tratamento sem nitrogênio, que mais acidificou a solução nutritiva.

Na análise da variável fonte de nitrogênio, observa-se que no primeiro período após a aplicação do nitrogênio (14 horas) não houve diferença significativa entre as fontes de N. Com 24 horas houve a verificação dos maiores valores de pH com uso do nitrato em relação às demais fontes de N. A partir de 40 horas após a aplicação iniciou a formação de três grupos de valores de pH, com os maiores valores para o tratamentos com o NO_3^- , valores intermediários de pH nos tratamentos com nitrato de amônio, uréia e amônio e os menores valores de pH no tratamentos sem nitrogênio. Nas medições realizadas 88 e 112 horas após a aplicação do nitrogênio foliar o tratamento com NH_4^+ teve o valor de pH inferior aos tratamentos com nitrato de amônio e uréia. O nitrato permaneceu proporcionando os maiores valores de pH e a testemunha sem nitrogênio os menores valores até a última leitura com 280 horas após a adubação com N, indicando que quando não suprida com nitrogênio a planta começa a acidificar o meio externo às raízes. No tempo de 280 horas as plantas com nitrato de amônio, uréia e amônio proporcionaram valores de pH da solução sem diferenças significativas.

Com relação à variável “tempo após a aplicação do nitrogênio” nota-se na Tabela 36 que para todas as fontes de nitrogênio e também para o tratamento sem nitrogênio a mesma tendência existente na média geral para o fator pH, ou seja, do decréscimo progressivo do pH da solução ao longo do tempo até a última leitura realizada com 280 horas após a aplicação do nitrogênio. Após 10 horas após aplicação de nitrogênio os pH(s) da solução começaram a alterar.

Tabela 36. Variação do pH da solução nutritiva do feijoeiro devido ao efeito de diferentes fontes de nitrogênio via foliar e do tempo após a aplicação. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados não transformados. Experimento 4.

Horas após aplicação de nitrogênio via foliar										
Fonte de N	14	24	40	64	88	112	136	160	280	Média geral Fonte N
Sem N	5,41 Aa	4,78 Bb	4,58 BCc	4,24 CDd	3,97 DEd	3,82 DEFd	3,55 EFGd	3,47 FGd	3,21 Gc	4,11 e
NO₃⁻	5,65 Aa	5,41 Aba	5,42 ABa	5,40 ABa	5,42 ABa	5,34 ABa	5,25 ABCa	5,21 BCa	4,83 Ca	5,32 a
NH₄⁺	5,28 Aa	4,78 Bb	4,73 BCbc	4,57 BCDcd	4,46 BCDEc	4,31 CDEc	4,21 DEc	4,07 EFc	3,71 Fb	4,46 d
NH₄NO₃	5,38 Aa	5,02 ABb	4,90 ABb	4,90 ABb	4,90 ABb	4,80 Bb	4,71 Bb	4,61 Bb	3,94 Cb	4,82 b
CO(NH₂)₂	5,34 Aa	4,91 ABb	4,83 BCbc	4,74 BCDbc	4,56 BCDEc	4,42 CDEFc	4,38 DEFbc	4,28 EFbc	4,05 Fb	4,61 c
Pr > F										
Fonte de N	0,0001									
Tempo (T)	0,0001									
Fonte N x T	0,0001									
CV%	4,224									

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

4.5 Experimento 5. Liberação de OH⁻/H⁺ na Rizosfera e Nodulação do Feijoeiro Suprido com Nitrogênio Aplicado Via Foliar aos 4 e 6 DAE – Cultivo em Areia

Neste experimento as plantas de feijão também foram supridas com nitrogênio via foliar utilizando-se as mesmas fontes de N, porém, neste caso, com o cultivo em areia. O uso deste meio teve o objetivo de verificar a nodulação do feijoeiro na coleta aos 10 dias após a emergência onde também foi avaliado o pH rizosférico. A Tabela 37 mostra que na análise da variância houve significância para ambos os parâmetros avaliados.

O amônio foi a fonte que proporcionou a maior acidez na rizosfera, com o valor significativamente inferior aos obtidos nas demais fontes de nitrogênio e das plantas sem nitrogênio. A uréia e o nitrato de amônio foram as fontes de nitrogênio intermediárias no processo de acidificação da rizosfera do feijoeiro. A rizosfera das plantas sem nitrogênio tiveram valores de pH semelhantes estatisticamente ao das plantas crescidas com nitrato de amônio e superior aos das plantas crescidas com a uréia. Assim como verificado no experimento em solução nutritiva, na areia foram também observados valores estatisticamente superiores de pH na rizosfera das plantas que receberam o nitrato em relação às demais fontes testadas (Tabela 37).

Quanto à nodulação, representada pelo número de nódulos planta⁻¹, os menores índices foram verificados nas plantas que receberam o amônio, uréia e nitrato de amônio, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estas fontes amoniacais. Este é um forte indício do efeito do H⁺ liberado na rizosfera pelo feijoeiro devido ao metabolismo destas fontes de nitrogênio, reduzindo a colonização da rizosfera pelo rizóbio. Em plantas crescidas com nitrato houve superioridade na nodulação das plantas quando comparadas às plantas adubadas com demais fontes minerais de nitrogênio, porém estas plantas tiveram a nodulação inferior às das plantas sem nitrogênio mineral, dependentes apenas da fonte atmosférica (N₂). Os resultados deste experimento (Tabela 37) mostram a existência de uma relação próxima entre o processo de inibição da nodulação das plantas de feijão e as modificações do pH da rizosfera afetada pelo metabolismo do nitrogênio, onde neste caso, destaca-se a influência da acidificação devido ao efeito do metabolismo do amônio sobre o processo de nodulação do feijoeiro.

Tabela 37. Médias do número de nódulos planta⁻¹ e do pH da rizosfera do feijoeiro devido ao efeito de diferentes fontes de nitrogênio via foliar. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 10 DAE, transformados por $\sqrt{x + 1}$ para número de nódulos e não transformados para pH rizosférico. Experimento 5.

Fontes de N	pH da rizosfera	Nº de nódulos
Sem N	4,80 ab	35 a
N-NO ₃	5,03 a	27 b
N-NH ₄	4,15 d	14 c
N-NH ₄ NO ₃	4,71 bc	19 c
N-CO(NH ₂) ₂ (uréia)	4,46 c	17 c
Pr > F	0,0001	0,0001
CV%	2,816	16,096

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

4.6. Experimento 6. Influência da presença de um inibidor da bomba de prótons - Efeito das fontes nitrogenadas no pH da rizosfera e na nodulação do feijoeiro.

Neste ensaio as plantas de feijão supridas com fontes e dosagens de nitrogênio testadas em experimentos anteriores cresceram na presença de um inibidor da ATPase (VO_4^{2-}), que promove a redução da absorção do nitrogênio pelas raízes. Neste experimento foram feitas coletas aos 10 e 20 dias após a emergência para avaliação da nodulação e do pH rizosférico. Os dados de ambas as épocas de coleta não foram obtidos em diferentes ensaios, como no experimento II, sendo estes dados sempre apresentados em uma mesma tabela.

Número de nódulos - experimento VI

A análise da variância da Tabela 38 apresenta as significâncias estatísticas aos 10 DAE existentes para as fontes de variação dose de nitrogênio e dose de vanadato e para a interação dose de nitrogênio x dose de vanadato em relação ao parâmetro número de nódulos do feijoeiro. Aos 20 DAE foi verificada significância para as fontes de variação fonte de N, dose de N e dose de vanadato e para as interações fonte de N x dose de N e dose de N x dose de vanadato.

O efeito da fonte de nitrogênio só foi significativo aos 20 DAE, onde as plantas com nitrato foram as que apresentaram a maior quantidade de nódulos. Os efeitos das doses de nitrogênio serão apresentados estatisticamente nas análises de regressão (Tabela 41), onde foram feitas análises separadas para cada fonte de nitrogênio dentro de cada dosagem de vanadato. Na apresentação dos dados da Tabela 38 é possível notar que, em ambas as épocas de amostragem, houve a presença de nódulos na dose mais elevada de nitrato e amônio, diferenciando-se dos resultados do experimento 2, feito nas mesmas condições, porém na ausência de vanadato. Em outras palavras, notou-se neste experimento que a presença vanadato retardou, mesmo que discretamente, a inibição da nodulação com doses altas de N.

Tabela 38. Média do número de nódulos planta⁻¹ de feijão crescido com diferentes fontes e doses de N e doses de vanadato. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 10 e 20 DAE e transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 6.

Época de coleta	10 DAE								20 DAE							
	N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺				N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺			
Fonte de N	Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)			
Dose N (Kg ha ⁻¹)	0	115	230	460	0	115	230	460	0	115	230	460	0	115	230	460
0	26	24	26	16	28	22	12	20	58	56	28	37	33	38	33	12
60	4	8	7	3	6	11	2	2	43	17	30	8	1	3	6	2
120	1	4	1	2	1	2	1	1	5	13	19	5	0	1	2	0
240	0	9	0	1	0	1	1	0	2	5	8	3	0	2	1	0
Pr > F																
Fonte de N	NS								0,0001							
Dose de N	0,0001								0,0001							
Dose de VO ₄	0,0002								0,0001							
Fonte N x dose N	NS								0,0001							
Fonte N x dose VO ₄	NS								NS							
Dose N x dose VO ₄	0,0305								0,0001							
Fon.N x dos.N x dos.VO ₄	NS								0,0001							
CV%	27,03								16,935							

NS = Não significativo.

Analisando os valores médios da fonte de variação fonte de nitrogênio (Tabela 39) foi verificado que para as plantas amostradas aos 20 dias após a emergência, as crescidas com nitrato produziram mais nódulos do que as plantas com amônio. No desdobramento da interação fonte de N x dose de N (20 DAE) houve efeito significativo da fonte de nitrogênio, com a maior nodulação obtida nas plantas crescidas com nitrato dentro de todas as doses de vanadato (Tabela 40).

Tabela 39. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹ de feijão. Avaliações realizadas aos 10 e 20 DAE. Experimento 6.

Época de coleta		20 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	Nº nódulos planta ⁻¹
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	21 a
	N-NH ₄ ⁺	8 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Tabela 40. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro número de nódulos planta⁻¹ de feijão. Avaliações realizadas aos 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 6.

Época de coleta	20 DAE			
Fonte N / dose N	0	60	120	240
N-NO₃⁻	45 a	25 a	11 a	5 a
N-NH₄⁺	29 b	3 b	1 b	1 b

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Análises de regressão para número de nódulos – experimento VI

O modelo de regressão linear foi o que melhor se ajustou a todas as curvas deste experimento (Tabela 41), onde foram comparadas apenas 4 doses de nitrogênio (0, 60, 120 e 240 kgN ha⁻¹). Para as duas fontes de nitrogênio, avaliadas separadamente e dentro de cada dose de vanadato, foram obtidos valores altamente significativos para a probabilidade de F ($Pr > F$). Nas análises de regressão apresentadas na Tabela 41 ficou evidenciado o efeito inibitório do nitrogênio sobre a nodulação do feijoeiro em função do aumento das doses de nitrogênio, porém houve a influência do vanadato na obtenção das doses de nível crítico para a inibição total da nodulação do feijoeiro, especialmente nas plantas amostradas aos 20 dias após a emergência. Nesta época de coleta, a dose de 230 kgVO₄ ha⁻¹ possibilitou a elevação expressiva da dose de NC do nitrogênio (256 kgN ha⁻¹) em relação à testemunha sem vanadato (210 kgN ha⁻¹). Com o uso do amônio a nodulação foi favorecida pela dose de 115 kgVO₄ ha⁻¹ (NC nitrogênio = 231 kgN ha⁻¹) sendo superior à testemunha sem nitrogênio (181 kgN ha⁻¹). Já na dose de 460 kgVO₄ ha⁻¹ houve redução do NC para esta fonte de nitrogênio (NC = 124 kgN ha⁻¹), possivelmente associada a uma potencialização do efeito fitotóxico desta fonte de nitrogênio quando associada a uma dose elevada de vanadato (Tabela 41).

Na análise comparativa das doses de nitrogênio de convivência com a nodulação obtidas dentro de cada dose de vanadato em cada fonte de nitrogênio, nota-se que aos 10 dias após a emergência praticamente todas as doses de convivência situaram-se na faixa de 40 kgN ha⁻¹ (Tabela 41). Na avaliação feita aos 20 dias após a emergência foi verificado com o uso do nitrato a maior dose de convivência dentro da dose de 230 kgVO₄ ha⁻¹ em relação às demais. Com o uso do amônio a maior dose de convivência ocorreu na dose de 115 e 230 kgVO₄ ha⁻¹ em relação às doses zero e 460 kgVO₄ ha⁻¹.

O critério estatístico através das análises de regressão (Tabela 41) para explicar os efeitos das doses de nitrogênio e doses de vanadato na nodulação (nas curvas de dosagens de cada fonte de nitrogênio dentro de cada dose de vanadato) foi adotado também para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro, sendo obtido valor de pH ocorrido na dose de nível crítico de cada fonte de nitrogênio.

Tabela 41. Obtenção das doses de NO_3^- e NH_4^+ para a inibição total (nível crítico) e para a redução de 20% da nodulação (dose de convivência) do feijoeiro crescido com diferentes doses de vanadato. Análises de regressão realizadas em dados coletados aos 10 e 20 DAE e não transformados. Experimento 6.

Época de coleta		10 DAE							
Fonte de N		N-NO_3^-				N-NH_4^+			
Dose de VO_4		0	115	230	460	0	115	230	460
Equação da regressão		$y = -0,0902x + 17,1$	$y = -0,0848x + 17,9$	$y = -0,0942x + 18,2$	$y = -0,053x + 11$	$y = -0,0988x + 18,5$	$y = -0,0873x + 18,8$	$y = -0,0423x + 7,9$	$y = -0,0675x + 12,65$
R ² (%)		59,57	68,53	67,46	65,24	40,31	79,94	52,87	60,85
Pr > F		0,0005	0,0001	0,0001	0,0002	0,0082	0,0001	0,0017	0,0004
Dose de N para nodulação = zero.		189 kg ha ⁻¹	206 kg ha ⁻¹	193 kg ha ⁻¹	195 kg ha ⁻¹	187 kg ha ⁻¹	207 kg ha ⁻¹	197 kg ha ⁻¹	187 kg ha ⁻¹
Dose de N para redução de 20% da nodulação.		38 kg ha ⁻¹	41 kg ha ⁻¹	39 kg ha ⁻¹	40 kg ha ⁻¹	37 kg ha ⁻¹	41 kg ha ⁻¹	38 kg ha ⁻¹	37 kg ha ⁻¹
		20 DAE							
Cultivar		N-NO_3^-				N-NH_4^+			
Dose de VO_4		0	115	230	460	0	115	230	460
Modelo da curva		$y = -0,2512x + 52,75$	$y = -0,205x + 42,9$	$y = -0,1275x + 32,7$	$Y = -0,1338x + 26,7$	$y = -0,1118x + 20,3$	$y = -0,1019x + 23,55$	$y = -0,1168x + 22,45$	$y = -0,0605x + 7,5$
R ² (%)		86,33	66,63	57,25	72,05	57,03	55,99	64,08	64,31
Pr > F		0,0001	0,0001	0,0007	0,0001	0,0007	0,0009	0,0002	0,0002
Dose de N para nodulação = zero.		210 kg ha ⁻¹	209 kg ha ⁻¹	256 kg ha ⁻¹	199 kg ha ⁻¹	181 kg ha ⁻¹	231 kg ha ⁻¹	192 kg ha ⁻¹	124 kg ha ⁻¹
Dose de N para redução de 20% da nodulação.		42 kg ha ⁻¹	42 kg ha ⁻¹	51 kg ha ⁻¹	40 kg ha ⁻¹	36 kg ha ⁻¹	46 kg ha ⁻¹	47 kg ha ⁻¹	25 kg ha ⁻¹

Massa seca de nódulos - experimento VI

Na análise da variância para o parâmetro massa seca de nódulos planta⁻¹ (Tabela 42) foi visto que aos 10 dias após a emergência apenas a fonte de variação dose de nitrogênio e a interação dupla entre fonte de nitrogênio e dose de nitrogênio foram significativos. Aos 20 dias após a emergência todas as fontes de variação e todas as interações apresentaram significância estatística.

Tabela 42. Média da massa seca de nódulos (mg planta⁻¹) do feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de N e doses de vanadato. Resultados da ANOVA (Pr > F) realizada em dados coletados aos 10 e 20 DAE e transformados por $\sqrt{x+1}$. Experimento 6.

Época de coleta	10 DAE								20 DAE							
	N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺				N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺			
Fonte de N	Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)			
Dose N (Kg ha ⁻¹)	0	115	230	460	0	115	230	460	0	115	230	460	0	115	230	460
0	1,878	2,000	2,505	1,938	6,435	3,738	1,961	2,648	4,385	3,923	1,348	1,450	5,523	6,705	5,398	4,568
60	0,068	0,513	0,233	0,153	0,145	0,160	0,040	0,053	5,828	1,335	3,220	0,420	0,033	0,065	0,073	0,065
120	0,023	0,038	0,023	0,023	0,015	0,048	0,010	0,015	0,185	1,388	1,385	0,058	0,000	0,045	0,045	0,000
240	0,000	0,013	0,000	0,010	0,000	0,015	0,013	1,428	0,053	1,060	0,220	0,100	0,000	0,058	0,005	0,000
ANOVA																
Fonte de N	NS								0,0077							
Dose de N	0,0001								0,0001							
Dose de VO ₄	NS								0,0001							
Fonte N x dose N	0,0053								0,0001							
Fonte N x dose VO ₄	NS								0,0012							
Dose N x dose VO ₄	NS								0,0001							
Fon.N x dos.N x dos.VO ₄	0,0534								0,0001							
CV%	19,455								9,472							

NS = Não significativo.

No comparativo das médias das fontes de variação, aos 20 dias após a emergência foi verificado que houve maior ganho de massa seca de nódulos nas plantas com nitrato em relação às plantas com amônio (Tabela 43).

No desdobramento da interação fonte de nitrogênio x dose de nitrogênio (Tabela 44) foi verificado aos 10 dias após a emergência efeito significativo entre as fontes de nitrogênio somente na dose de 60 kgN ha⁻¹, sendo a nodulação mais evidente nas plantas com nitrato. Aos 20 dias após a emergência dentro de todas as doses de nitrogênio as plantas crescidas com nitrato tiveram maior produção de massa de nódulos em relação às plantas com amônio.

O desdobramento da interação fonte de nitrogênio x dose de vanadato mostrou que o vanadato possibilitou a produção de nódulos na presença de nitrogênio na forma de amônio, uma vez que na sua ausência (0 kgVO₄ ha⁻¹) houve maior nodulação com nitrato, mesma tendência dos experimentos sem vanadato, sendo esta diferença entre as fontes de nitrogênio não significativa nas doses de 115 e 230 kgVO₄ ha⁻¹. Na dose de 460 kgVO₄ ha⁻¹ a produção de massa de nódulos foi maior nas plantas com amônio (Tabela 44).

Tabela 43. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro massa seca de nódulos do feijoeiro (mg planta⁻¹). Avaliações aos 10 e 20 DAE. Experimento 6.

Época de coleta		20 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	MS nódulos (mg planta ⁻¹)
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	1,647 a
	N-NH ₄ ⁺	1,411 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5).

Tabela 44. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro massa seca de nódulos do feijoeiro (mg planta⁻¹). Avaliações realizadas aos 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 6.

Época de coleta		10 DAE			
Fonte N / dose N	0	60	120	240	
N-NO₃⁻	2,080 b	0,242 a	0,027 a	0,006 a	
N-NH₄⁺	3,696 a	0,100 b	0,022 a	0,364 a	
Época de coleta		20 DAE			
Fonte N / dose N	0	60	120	240	
N-NO₃⁻	2,777 b	2,701 a	0,754 a	0,358 a	
N-NH₄⁺	5,549 a	0,059 b	0,023 b	0,016 b	
Fonte N / dose VO₄	0	115	230	460	
N-NO₃⁻	2,613 a	1,927 a	1,543 a	0,507 b	
N-NH₄⁺	1,389 b	1,718 a	1,380 a	1,158 a	

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

pH da rizosfera – experimento VI

Na avaliação do pH da rizosfera das plantas supridas com nitrogênio e vanadato, para ambas as épocas de amostragem foram verificados efeitos significativos nas análises de variância ($P > F$) para todas as fontes de variação e para todas as interações ocorridas entre os fatores analisados (Tabela 45).

Tabela 45. Médias do pH da rizosfera de feijoeiro crescido com diferentes fontes e doses de N e doses de vanadato. Resultados obtidos na ANOVA ($Pr > F$) realizada em dados coletados aos 10 DAE (transformados por \sqrt{x}) e aos 20 DAE (sem transformação). Experimento 6.

Época de coleta	10 DAE								20 DAE							
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺				N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺			
	Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)				Dose de VO ₄ (kg ha ⁻¹)			
Dose N (Kg ha ⁻¹)	0	115	230	460	0	115	230	460	0	115	230	460	0	115	230	460
0	4,98	5,58	5,49	5,62	4,85	4,44	4,47	4,58	5,44	5,60	5,41	5,60	5,22	4,76	4,83	5,17
60	5,46	5,94	5,93	6,14	4,20	4,36	4,21	4,60	5,82	6,06	6,14	6,14	4,62	4,65	4,85	5,13
120	5,56	6,03	6,19	5,98	4,00	4,51	4,41	4,73	5,98	6,40	6,25	6,20	4,67	5,04	4,86	5,39
240	5,69	6,08	6,04	6,00	4,06	4,60	4,52	4,84	6,27	6,54	6,41	6,43	4,74	4,97	4,99	4,96
ANOVA																
Fonte de N	0,0001								0,0001							
Dose de N	0,0001								0,0001							
Dose de VO ₄	0,0001								0,0001							
Fonte N x dose N	0,0001								0,0001							
Fonte N x dose VO ₄	0,0001								0,0076							
Dose N x dose VO ₄	0,0008								0,0039							
Fon. N x dos. N x dos. VO ₄	0,0001								0,3114							
CV%	1,559								3,834							

Nas análises isoladas das fontes de variação apresentadas na Tabela 46 os resultados das duas épocas de coletas (10 e 20 dias após a emergência) apresentaram semelhanças muito estreitas, com os maiores valores de pH na rizosfera das plantas de feijão supridas com nitrato em relação às plantas com amônio.

Tabela 46. Médias das fontes de variação significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliações realizadas aos 10 e 20 DAE. Experimento 6.

Época de coleta		10 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	pH rizosfera
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	5,79 a
	N-NH ₄ ⁺	4,46 b
Época de coleta		20 DAE
Fonte de variação (FV)	Tratamento	pH rizosfera
Fonte de N	N-NO ₃ ⁻	6,04 a
	N-NH ₄ ⁺	4,93 b

Para cada FV, as médias com letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

No desdobramento das interações aos 10 dias após a emergência, entre fonte de nitrogênio e dose de nitrogênio (Tabela 47) os dados indicam os maiores valores de pH na presença do nitrato como fonte de nitrogênio em todas as doses de nitrogênio. O aumento das doses de nitrato promoveu variações no pH da rizosfera mais expressivas do que às promovidas pelo aumento das doses de amônio. Na interação fonte de nitrogênio x dose de vanadato aos 10 dias após a emergência o nitrato foi a fonte que gerou os maiores valores de pH em relação ao amônio dentro de todas as dosagens de vanadato. Na presença de ambas as fontes de nitrogênio o aumento das doses de vanadato aumentou levemente o pH em relação à testemunha.

Na amostragem realizada aos 20 dias após a emergência a interação entre fonte de nitrogênio e dose de nitrogênio apresentou efeitos das fontes de nitrogênio com mesmas tendências observadas aos 10 dias após a emergência. Embora não estejam apresentadas as significâncias dos efeitos da dose de nitrogênio, nota-se na Tabela 47 que, considerando todos os tratamentos do experimento, onde a maioria teve a presença do vanadato, o aumento das doses de nitrogênio na forma de amônio não causou acidificação da rizosfera. Na interação fonte de nitrogênio x dose de vanadato verificou-se que, em ambas as fontes de nitrogênio, o aumento da concentração de vanadato elevou de forma sutil o pH rizosférico. Entre as fontes de nitrogênio os valores de pH com nitrato foram, em todas as doses de vanadato, superiores aos do amônio.

Tabela 47. Médias dos desdobramentos das interações significativas para o parâmetro pH da rizosfera do feijoeiro. Avaliações realizadas aos 10 e 20 dias após a emergência. Experimento 6.

10 DAE				
Fonte N / dose N	0	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	5,42 a	5,87 a	5,94 a	5,95 a
N-NH ₄ ⁺	4,59 b	4,34 b	4,41 b	4,51 b
Fonte N / dose VO₄	0	115	230	460
N-NO ₃ ⁻	5,42 a	5,71 a	5,91 a	5,94 a
N-NH ₄ ⁺	4,28 b	4,48 b	4,40 b	4,69 b
20 DAE				
Fonte N / dose N	0	60	120	240
N-NO ₃ ⁻	5,51 a	6,04 a	6,21 a	6,41 a
N-NH ₄ ⁺	5,00 b	4,81 b	4,99 b	4,92 b
Fonte N / dose VO₄	0	115	230	460
N-NO ₃ ⁻	5,88 a	6,15 a	6,05 a	6,09 a
N-NH ₄ ⁺	4,81 b	4,86	4,88 b	5,16 b

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

Análises de regressão para pH da rizosfera – experimento VI

Nas análises de regressão (Tabela 48) foram identificados valores de pH nas doses de nível crítico para cada fonte de nitrogênio, individualmente dentro de cada dose de vanadato. Para o parâmetro pH da rizosfera a maior parte das análises de regressão onde houve significância estatística ($Pr > F$) ocorreu com o uso da fonte de nitrogênio nitrato. Para o amônio a análise de regressão com maior significância estatística foi verificada no tratamento controle sem vanadato na coleta aos 10 dias após a emergência, onde também foi obtido o maior valor de “R²” (60%).

Aos 10 dias após a emergência com a fonte nitrato foram detectadas pequenas variações nas doses de NC do nitrogênio entre as doses de vanadato, porém a inibição da nodulação ocorreu com a dose de 230 kgVO₄ ha⁻¹ com 0,5 ponto de pH superior a do tratamento com 0 kgVO₄ ha⁻¹. Na presença de amônio a inibição foi verificada com as mesmas concentrações de nitrogênio, mas com uma diferença de 0,7 ponto de pH entre o tratamento com 0 kgVO₄ ha⁻¹ (4,05) e com 460 kgVO₄ ha⁻¹ (4,79).

Na avaliação aos 20 dias após a emergência, onde foram encontradas as maiores variações nos valores de NC do nitrogênio, os tratamentos sem vanadato tiveram respostas contrastantes quanto aos valores de pH rizosférico obtidos. A aplicação de nitrato causou efeito deletério à nodulação na dose de 215 kgN ha⁻¹ (dose de NC para esta fonte de N na dose zero de vanadato - vide Tabela 46) dose esta que gerou um valor de pH rizosférico igual a 6,23. O NC do amônio na dose zero de vanadato foi de 181 kgN ha⁻¹ com o pH rizosférico igual a 4,69.

Na presença do vanadato verificou-se que com o uso do nitrato a dose de vanadato que promoveu o maior valor de pH (230 kgVO₄ ha⁻¹) foi também a que resultou em maior dose de nível crítico do nitrato para a inibição da nodulação do feijoeiro. A maior dose de NC para o amônio foi obtida na dose de 115 kgVO₄ ha⁻¹ (231 kgN ha⁻¹), onde o pH da rizosfera foi de 5,01. Para a fonte amônio o tratamento sem vanadato teve a dose de NC igual a 181 kgN ha⁻¹ e no tratamento com a maior dose de vanadato (460 kgVO₄ ha⁻¹) o NC desta fonte de nitrogênio foi de 124 kgN ha⁻¹. Estes resultados indicam que o vanadato contribuiu para a produção de nódulos na dose de 115 kgVO₄ ha⁻¹, entretanto na dose de mais elevada do vanadato houve o maior efeito deletério à nodulação, embora o pH tenha sido superior ao detectado nas demais doses (Tabela 48).

Tabela 48. pH rizosférico ocorrido na dose de N (NO_3^- e NH_4^+) de inibição total da nodulação (nível crítico) do feijoeiro crescido com diferentes doses de vanadato. Análises de regressão realizadas em dados coletados aos 10 e 20 DAE e não transformados. Experimento 6.

Época de coleta		10 DAE							
Fonte de N		N- NO_3^-				N- NH_4^+			
Dose de VO_4		0	115	230	460	0	115	230	460
Equação da regressão		$y = 0,0026x + 5,140$	$y = 0,0018x + 5,711$	$y = 0,0021x + 5,694$	$y = 0,0011x + 5,821$	$y = -0,0028x + 4,576$	$y = 0,0008x + 4,392$	$y = 0,0006x + 4,343$	$y = 0,0012x + 4,561$
R ² (%)		70,81	59,66	57,08	23,19	60,25	12,58	5,61	30,84
Pr > F		0,0001	0,0005	0,0007	0,0589	0,0004	0,1775	NS	0,0252
pH no NC do N de inibição da nodulação.		5,63	6,08	6,10	6,05	4,05	4,56	4,46	4,79
Nível de N para nodulação = zero.		189 kg ha ⁻¹	206 kg ha ⁻¹	193 kg ha ⁻¹	195 kg ha ⁻¹	187 kg ha ⁻¹	207 kg ha ⁻¹	197 kg ha ⁻¹	187 kg ha ⁻¹
Época de coleta		20 DAE							
Cultivar		N- NO_3^-				N- NH_4^+			
Dose de VO_4		0	115	230	460	0	115	230	460
Equação da regressão		$y = 0,0032x + 5,537$	$y = 0,0038x + 5,749$	$y = 0,0036x + 5,668$	$y = 0,0031x + 5,771$	$y = -0,0015x + 4,965$	$y = 0,0012x + 4,729$	$y = 0,0007x + 4,806$	$y = -0,0008x + 5,239$
R ² (%)		73,69	83,54	73,54	76,15	26,17	20,01	8,25	2,94
Pr > F		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0428	0,0823	0,2805	NS
pH no NC do N de inibição da nodulação.		6,23	6,61	6,87	6,43	4,69	5,01	4,95	5,14
Nível de N para nodulação = zero.		210 kg ha ⁻¹	209 kg ha ⁻¹	256 kg ha ⁻¹	199 kg ha ⁻¹	181 kg ha ⁻¹	231 kg ha ⁻¹	192 kg ha ⁻¹	124 kg ha ⁻¹

5. DISCUSSÃO

Este estudo envolveu experimentos que objetivaram mostrar as relações entre a nodulação do feijoeiro e as diferentes variações de pH ocorridas na rizosfera devido ao metabolismo de diferentes fontes de nitrogênio. Existem na literatura diversos estudos onde se verificou que a absorção de diferentes fontes de N alteraram o pH da rizosfera. Porém, não foram encontrados trabalhos, especialmente sobre a cultura do feijão, onde tenham sido feitas associações entre estas alterações eletroquímicas, devido ao N, e a iniciação da nodulação.

Uma das primeiras providências deste trabalho foi avaliar se as doses de nitrogênio que seriam utilizadas nos experimentos poderiam aumentar a salinidade do meio de crescimento, a ponto de mascarar os desejados efeitos do pH da rizosfera sobre a nodulação do feijoeiro. O experimento 1 mostrou que o aumento das concentrações de nitrogênio, nitrato e amônio, aumentaram a salinidade do meio. No entanto, a verificação prévia da salinidade ocorrida no substrato areia, mensurada pela condutividade elétrica (metodologia de CAMARGO, 2001), submetida a diferentes doses de nitrogênio nítrico e amoniacal resguardou que não fossem atingidos níveis salinos fora da tolerância pelo feijoeiro e pelo rizóbio. Os valores apresentados na Tabela 3, de $1790 \mu\text{S cm}^{-1}$ obtido na mais alta concentração de nitrato e de $2297 \mu\text{S cm}^{-1}$ na mais alta dose de amônio, são valores considerados dentro da faixa de tolerância para bactérias diazotróficas sobreviverem (NÓBREGA et al., 2004) e para as plantas de feijão produzirem nódulos radiculares (CORDOVILLA et al., 1999). Foi verificado neste ensaio preliminar que o aumento da salinidade foi obtido com a elevação progressiva das doses de nitrogênio e que a dose mais elevada para o crescimento do feijoeiro, testada nos experimentos seguintes, esteve nos limites tanto para a planta quanto para o rizóbio se desenvolverem e estabeleceram o processo simbiótico. Na planta os altos níveis salinos podem reduzir o crescimento, a fotossíntese e a demanda vegetal pelo nitrogênio (SINGLETON et al., 1982), mas não foi o caso das dosagens aqui utilizadas. A influência da salinidade no processo de fixação simbiótica do nitrogênio pode ainda variar com a espécie vegetal, com o nível de salinidade e com a estirpe de rizóbio utilizada (FREIRE & RODRIGUES, (2009). Em relação à nodulação, os danos causados pela salinidade estão associados principalmente às etapas iniciais de infecção do rizóbio nos pêlos radiculares (BOUHMOUCH et al., 2005; ZAHKAN & SPRENT, 1986), que envolvem alterações nos fatores NOD extracelulares produzidos pelo rizóbio (LLORET et al., 1995), na percepção dos fatores NOD pela planta e deformação do pêlo radicular (DUZAN et al., 2004) e na formação do cordão de infecção (ZAHKAN, 1999).

No processo evolucionário as plantas hoje consideradas fixadoras de nitrogênio devem ter saído de um ambiente rico em nitrogênio mineral que se esgotou e foi para um ambiente rarefeito deste elemento. Neste ambiente elas não tiveram alternativas, a não ser desenvolver mecanismos genéticos e fisiológicos que as adaptassem as estas condições, surgindo então as plantas fixadoras de nitrogênio atmosférico (RAVEN et al., 1990). Entretanto, este novo ambiente em determinadas condições poderia conter concentrações de nitrogênio disponível que desestimularia a iniciação do processo de fixação biológica. Esta concentração de nitrogênio, a partir do qual a planta não é estimulada a formar nódulos, varia de espécie para espécie dentro da família das leguminosas. Mais complexo fica o entendimento deste processo se for considerada as diferentes formas de N presentes no solo, que são geralmente dependentes do grau de oxi-redução do substrato.

No presente trabalho, foi estudado o efeito de fontes e concentrações de nitrogênio capazes de alterar significativamente o pH do meio externo às raízes do feijoeiro, afetando a aproximação do rizóbio e a iniciação da nodulação. Neste contexto, é importante salientar que a fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro inicia-se quando se esgotam as reservas de

nitrogênio da semente e a planta entra em carência do elemento, por volta dos 15 a 20 dias após a emergência (MERCANTE e al., 1992). A forma de nitrogênio sendo absorvida e assimilada deve ser levada em consideração devido ao equilíbrio eletroquímico vegetal que é estabelecido em função desta fonte, isto é, se for amônio ocorre acidificação da rizosfera, se for o nitrato se dá a alcalinização.

Nos experimentos discutidos a seguir, o processo de inibição da produção de nódulos radiculares do feijoeiro foi em todos os momentos associado às modificações do pH da rizosfera provocadas pelo metabolismo das diferentes fontes de nitrogênio mineral pela planta. A hipótese da ação do pH da rizosfera, alterado pelo nitrogênio, sobre a inibição da nodulação do feijoeiro está fundamentada no balanço iônico da planta, que para compensar seu desbalanço elétrico ocasionado pela absorção de um excesso de carga excreta íons de carga equivalente na rizosfera, alterando o pH desta região (HINSINGER et al., 2003) e, conseqüentemente, influenciando a aproximação rizóbio e a sua atividade nas etapas iniciais da formação do nódulo. Na Figura 5 está representada, de forma esquemática, rizosferas sendo ocupadas por OH^- e H^+ liberados pelas plantas a partir do metabolismo de nitrato (A) e amônio (B), respectivamente, prejudicando, em ambos os casos, a aproximação do rizóbio e a colonização do pêlo radicular.

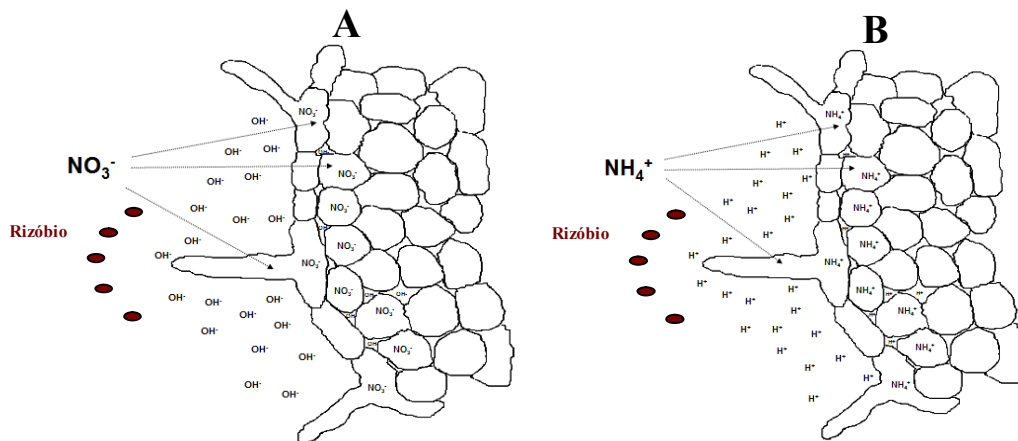


Figura 5. Representação esquemática das alterações de pH na região da rizosfera, devido ao metabolismo vegetal de uma planta com nitrato (A) e outra com amônio (B), criando condições de pH na rizosfera inadequadas à aproximação e colonização pelo rizóbio.

Apesar de não ser bem esclarecida a razão para explicar de forma distinta os mecanismos que conduzem a ação inibitória das altas dosagens de nitrogênio mineral sobre as diversas etapas do processo simbiótico entre a planta e o rizóbio, diversos trabalhos já foram realizados, considerando desde eventos ocorridos nos primeiros passos do processo simbiótico, iniciados externamente nas trocas de sinais entre a planta e o rizóbio, até questões fisiológicas inerentes ao funcionamento dos nódulos (JACOB NETO et al., 1998).

Nos experimentos deste trabalho, a atividade dos nódulos e a quantificação da FBN não foram avaliadas, uma vez que o objetivo foi verificar os efeitos do nitrogênio, metabolizado pelo feijoeiro, nas alterações do ambiente externo às raízes e o impacto destas alterações na produção de nódulos. A avaliação da nodulação é considerada um importante parâmetro em pesquisas voltadas ao entendimento da FBN, por ser uma das principais características morfológicas utilizadas para seleção de genótipos em função da sua eficiência simbiótica onde, além de número e massa seca, são também incluídos os tamanhos dos nódulos e a precocidade da nodulação das plantas (HERRIDGE & DANSO, 1995).

5.1. Nitrogênio *Versus* Nodulação

Os resultados do experimento 1 mostraram que para os ensaios com plantas de feijão está descartada a hipótese de que a inibição da nodulação do feijoeiro nas altas concentrações das fontes de nitrogênio, especialmente na forma de amônio, teve alguma relação com os níveis salinos provocados pelas mesmas. Com isso, as causas para o processo inibitório da nodulação estão ligadas a fatores provenientes de eventos fisiológicos ocorridos a partir do metabolismo vegetal (absorção/assimilação) do nitrogênio mineral fornecido às plantas de feijão, uma vez que na ausência de planta ocorreram variações significativas no pH do substrato areia, o mesmo meio utilizado para o crescimento das plantas nos ensaios seguintes.

A inibição da nodulação no experimento 2, com o feijoeiro cultivado no substrato areia, ocorreu significativamente aos 10 e 20 dias após a emergência (Tabela 4), com maior expressividade nas mais altas dosagens de amônio em relação ao nitrato. Embora todas as fontes de nitrogênio em doses superiores a 120 kgN ha⁻¹ tenham suprimido a nodulação foi verificado que o nível crítico (NC) do nitrogênio para a inibição total da produção de nódulos variou entre as fontes (Tabela 9). A partir das informações fornecidas por estes dados, surgiu a necessidade de determinar as doses de nitrogênio para cada fonte testada que causasse a inibição total da nodulação (nível crítico) e a dose capaz de permitir 80% da máxima nodulação (dose de convivência), predominantemente obtida na dose zero de nitrogênio, nas plantas de feijão coletadas aos 10 e 20 dias após a emergência.

Com o fornecimento de amônio, fonte que acidificou a rizosfera, o NC esteve situado em doses mais baixas de nitrogênio em relação às fontes nitrato e nitrato de amônio, em ambas as épocas de amostragem. Comparando estas épocas, aos 10 dias após a emergência foi verificada menor magnitude da nodulação em relação às plantas da segunda coleta, concluindo-se que a nodulação das plantas mais jovens foi mais susceptível ao processo inibitório ou que devido à metodologia de contagem de nódulos com uso de lupa houve limitação da visualização dos nódulos muito pequenos nesta primeira época.

No experimento em areia, em plantas coletadas aos 20 dias após a emergência, a dose de convivência estimada para o nitrato com a nodulação foi superior à dose estimada para a fonte amoniacal. O uso do nitrato em doses próximas a 50 kgN ha⁻¹ aplicado no plantio permitiu a ocorrência de 80% da nodulação. Já para o amônio as doses de convivência estiveram próximas a 10 kgN ha⁻¹, caracterizando alta sensibilidade da nodulação ao amônio.

Neste experimento, foi verificada uma expressiva diferença entre as duas fontes de nitrogênio. Porém, independente da fonte nítrica ou amoniacal, nas altas doses de nitrogênio no meio de crescimento houve uma forte inibição da nodulação. Este processo inibitório da nodulação em plantas que fixam biologicamente o nitrogênio é ressaltada por MOUDIONGUI & RINAUDO (1987), que relataram que o comprometimento da FBN nestas doses de N está relacionado a fatores relacionados tanto ao rizóbio (DUSHA et al., 1989; DUSHA et al., 1999) quanto à planta hospedeira (STREETER, 1985; WU & HARPER, 1990; MINCHIN et al., 1986; GIBSON & PAGAN, 1977; KOHLS & BAKER, 1989; MALIK et al., 1987; SODEK & SILVA, 1996; TRUCHET & DAZZO, 1982).

Com relação ao processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico, diversos mecanismos da ação inibidora do nitrogênio mineral sobre a FBN são frequentemente mencionados na literatura, tais como a redução da atividade da enzima nitrato redutase nos nódulos na presença de nitrato (MINCHIN et al., 1986; STREETER, 1985) e de nitrito (GIBSON & PAGAN, 1977), redução da difusão de oxigênio para os nódulos devido à presença de nitrato (VESSEY & WATERER, 1992), limitação de carboidratos para as raízes e nódulos de plantas supridas com N (DENISON & HARTER, 1995) ou pela restrição de poder redutor para a redução do N₂ nos nódulos sendo utilizada para a atividade das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (HECKMAN et al., 1989).

No entanto, estes eventos estão relacionados à supressão do metabolismo nodular em plantas que já estabeleceram os passos iniciais do processo simbiótico e já formaram os nódulos, significando que as etapas iniciais deste processo (colonização da rizosfera, trocas de sinais e infecção do tecido radicular pelo rizóbio) não foram limitadas anteriormente por fatores como a presença de nitrogênio. Em geral, a inibição da nodulação é atribuída a mecanismos regulatórios da planta sobre o controle do estabelecimento e do funcionamento da FBN em relação ao suprimento de nitrogênio proveniente do solo (MALIK et al., 1987).

A presença de microorganismos na rizosfera, como a bactéria rizóbio introduzida pela inoculação das sementes, geralmente resulta na indução de genes da planta que liberam substâncias que podem ser prejudiciais ou vantajosas ao microorganismo, onde as sinalizações podem possuir características para repulsão, como ocorrido entre plantas resistentes e patógenos, ou de atração como é o caso na relação com microorganismos fixadores de nitrogênio (HALVERSON & STACEY, 1986).

Neste contexto, o nitrogênio mineral pode influenciar o processo de sinalização entre o rizóbio e a planta tanto na síntese e liberação de flavonóides pela planta, verificado por BANDYOPADHYAY et al. (1996) em ervilha (*Pisum sativum* L.) e por CORONADO et al. (1995) em alfafa (*Medicago sativa* L.), quanto pela produção e expressão dos fatores NOD do rizóbio, como as inibições de 40 e 20% na expressão de *nodD1* e *nodABC*, respectivamente, obtidas por WANG & STACEY (1990) em *Bradyrhizobium japonicum* na presença de 10 mM de amônio.

No experimento 2, a acidez promovida pela absorção do amônio foi apontada como uma das principais causas para a inibição da nodulação, nas doses mais baixas desta fonte de nitrogênio, na fase inicial de crescimento das plantas de feijão. O nitrato foi a fonte nitrogenada que causou menos impacto negativo na nodulação do feijoeiro e que promoveu a elevação do pH da rizosfera, onde foram obtidos inclusive pequenos acréscimos na nodulação nas doses mais baixas (Tabela 4). Estes resultados indicam que a elevação do pH da rizosfera do feijoeiro com o uso desta fonte de nitrogênio parece ter favorecido a atividade do rizóbio nesta região, explicando porque pequenas quantidades de nitrato no solo podem estimular a formação de nódulos radiculares (LOPES et al., 1968; JACOB-NETO et al., 1998; RUSCHEL et al., 1979). Embora as doses elevadas de amônio tenham prejudicado substancialmente a nodulação e o sistema radicular do feijoeiro, GOI et al. (1993) verificaram que baixas doses de amônio foram favoráveis ao início da nodulação na leguminosa florestal *Acácia auriculiformis*.

Em relação aos efeitos da acidez do solo na nodulação, neste caso estando relacionados à presença do amônio, é conhecido que o excesso de H⁺ livre afeta tanto a sobrevivência do rizóbio no solo quanto a sua persistência na rizosfera vegetal (VINUESA et al., 2003), onde ao colonizar libera fatores NOD responsáveis por modificações morfológicas radiculares essenciais à iniciação da nodulação estimulado pela presença de substâncias excretadas pelas raízes (ex. flavonóides). Fisiologicamente, a tolerância do rizóbio à acidez está relacionada à sua capacidade em manter o pH intracelular alcalino quando submetido a um meio moderadamente ácido, enquanto a sensibilidade acontece quando as estirpes decrescem o pH intracelular de acordo com o pH ácido do meio.

Fatores associados ao decréscimo de pH influenciando a formação de nódulos, como a disponibilidade de alumínio (FRANCO & MUNNS, 1982; JACOB NETO, 2003; ROSSIELO & JACOB NETO, 2006) ou a indisponibilidade de molibdênio (JACOB-NETO et al., 1988) estariam aqui descartados, uma vez que não houve o fornecimento de alumínio e o molibdênio está relacionado ao funcionamento do nódulo formado. Neste caso, os possíveis mecanismos de inibição estão relacionados com as etapas do processo de iniciação da formação dos nódulos ocorridas na rizosfera, onde se inclui o efeito direto do pH do meio externo às raízes que é considerado um dos fatores abióticos que mais compromete o processo simbiótico entre

o rizóbio e a planta (FRANCO & DAY, 1980; DUZAN et al., 2004; WATKIN et al., 1997; HUNGRIA & VARGAS, 2000).

Além de fatores como a restrição do desenvolvimento das raízes e dos pêlos radiculares, que têm relação com a presença do alumínio, CAMPANHARO (2006) expõe o efeito da acidez do solo sobre a sinalização entre a bactéria e a planta hospedeira, comprometendo decisivamente o processo de infecção radicular pelo rizóbio e o desencadeamento do processo de formação do nódulo.

A influência das fontes de N sobre a dinâmica da atividade microbológica da rizosfera, em função das alterações no pH, foi levantada em estudos como o de CARVALHO (2003) que avaliou a atividade do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* em colonizar a rizosfera do tomateiro crescido em solução nutritiva com estas mesmas fontes de nitrogênio, sendo verificada maior atividade do fungo quando nas plantas crescidas acidificaram o meio gerando, neste caso, uma condição de preferência deste microrganismo. MARSCHNER et al. (1999) também relacionaram o pH da rizosfera de trigo crescido com amônio e nitrato com a taxa de colonização pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*, verificando que a mesma só ocorreu quando não foi feito o controle do pH da solução. Neste estudo, um estímulo à colonização da rizosfera na presença da fonte amoniacal foi atribuído a uma deficiência na retenção de exsudatos devido ao acúmulo de H^+ na rizosfera e no apoplasto devido à absorção de amônio. Caso semelhante provavelmente ocorreu também neste presente trabalho de tese.

A interação entre a inoculação e a adubação nitrogenada na cultura do feijão se torna importante na medida em que se busca a possibilidade de uso do N atmosférico e do solo simultaneamente. Embora o nitrogênio em altas quantidades no meio de crescimento seja inibidor à nodulação, como mostram os resultados dos experimentos desta tese, pequenas quantidades permitem que a nodulação se estabeleça inclusive com efeitos sinérgicos, desde que haja a presença de um balanço adequado dos demais nutrientes disponíveis à absorção pela planta (TSAI et al., 1993).

No caso das altas doses de nitrogênio de todas as fontes testadas terem inibido a nodulação, os resultados apontam para a possibilidade da ação de possíveis outros processos inibitórios, também relacionados à fase inicial de formação, cujos mecanismos não foram aqui mensurados. Analisando os dados de WAHAB (1996), por exemplo, é possível verificar que o incremento do nitrato no meio promove reduções na elongação da raiz e no encurvamento dos pêlos radiculares, resultando na redução da infecção radicular (DAZZO & BRILL, 1973) e restrição do desenvolvimento do cordão de infecção (WAHAB, 1996). Esta situação também é citada por MUNNS (1968) e DARBYSHIRE (1966), sendo estas as possíveis causas para a inibição na nodulação promovida por esta fonte de nitrogênio quando fornecida em grandes quantidades ao feijoeiro.

É importante frisar ainda a existência de uma possível relação entre a alcalinização da rizosfera do feijoeiro suprido com nitrato e a inibição da nodulação, uma vez que as altas doses de nitrato geraram inibição total da nodulação e alcalinizaram a rizosfera. Embora não tenham sido detectados altos valores de pH em níveis críticos para o rizóbio, sensível a condições de extrema alcalinidade em valores de pH na ordem de 10 (TANG & ROBSON, 1993; BHARDWAJ, 1975; TANG et al., 2006), deve ser levado em consideração que não foram utilizados equipamentos sofisticados, como microeletrodos de precisão inseridos na região da rizosfera, capazes de identificar se o valor do pH rizosférico nestas dosagens de nitrato, em algum momento, atingiu níveis alcalinos comprometedores para a atividade das estirpes de rizóbio utilizadas nos ensaios.

Apesar de ser conhecida a maior capacidade de nodulação de cultivar Ouro Negro em relação a cultivar Rio Tibagi, estas foram comparadas com o objetivo de verificar se o potencial de nodulação possui relação com as variações de pH rizosférico. Neste caso, a hipótese sugere que a cultivar de maior capacidade de absorver e metabolizar o nitrogênio

mineral e, conseqüentemente, alterar o pH da rizosfera teria a menor nodulação. Como não foram detectadas variações significativas entre as cultivares em relação ao pH da rizosfera, esta hipótese foi descartada e nos experimentos posteriores foi avaliada apenas a cultivar de alta capacidade de nodulação (Ouro Negro).

É conhecida a existência de variações de pH entre a rizosfera e regiões com distâncias de até um milímetro em relação à superfície da raiz (NYE et al., 1981), sendo que na presença de nitrogênio disponível à planta esta diferença pode chegar a até 2 pontos de pH (ROLLWAGEN & ZASOSKI, 1988). Entretanto, tanto o poder tampão do solo quanto a presença de carbonatos dissolvidos na solução do solo podem influenciar as variações do pH da rizosfera promovidas pela planta (SCHUBERT et al., 1990). Neste sentido, foi realizado um experimento (experimento 3), onde as plantas de feijão cresceram em solos com diferentes teores de argila e na presença de diferentes fontes de carbonato, onde pressupôs-se que o poder tampão dos mesmos e a presença dos carbonatos minimizassem as variações de pH da rizosfera causadas pelo metabolismo do nitrogênio e, conseqüentemente, influenciassem a inibição da nodulação do feijoeiro.

Foi verificado que a mais alta concentração de amônio afetou o pH rizosférico, mesmo no solo com maior concentração de argila, e prejudicou a nodulação. Comparando os diferentes substratos usados no experimento 2 (areia) e no experimento 3 (solo) para o crescimento do feijoeiro, verificou-se que as maiores variações de pH foram obtidas na areia, seguida do solo com baixo teor de argila e por último no solo com médio teor de argila. Neste mesmo comparativo, foi observada na areia a produção inicial de nódulos sendo fortemente afetada na dose de 60 kgN ha⁻¹, enquanto no solo o amônio e o nitrato permitiram o surgimento de nódulos na dose de 60 e 120 kgN ha⁻¹, respectivamente. Este estudo levou em consideração que, dentre os atributos do solo, o poder tampão se destaca como um fator capaz de controlar decisivamente as variações de pH da rizosfera HINSINGER et al. (2003), onde os resultados mostram a influência direta do teor de argila nas variações de pH e na produção de nódulos.

Comparando as maiores doses de convivência obtidas nos solos (Tabelas 18 e 28) em relação à areia (Tabela 9), em plantas coletadas aos 10 dias após a emergência, verificou-se que a capacidade tampão dos solos permitiu que neste substrato ocorresse menor influência do nitrogênio como inibidor da nodulação, que certamente está relacionado às menores variações de pH, em relação ao substrato areia.

A explicação para a diferença entre os tipos de substrato quanto à capacidade tampão está vinculada à capacidade de troca de cátions, que é diretamente proporcional à quantidade e atividade da argila predominante, tendo também a influência da matéria orgânica (SOARES, 2003). Por isso, praticamente na totalidade dos casos, os solos argilosos exigem doses de corretivos maiores para se obter o mesmo grau de correção que os arenosos (CAIRES & ROSOLEM, 1993). Esta idéia é reforçada por SCHUBERT et al. (1990), que frisam a importância de levar em conta que a acidificação da rizosfera devido à liberação de prótons pelas raízes possui uma considerável dependência da capacidade dos solos em tamponar prótons. SCHUBERT et al. (1990) quando trabalharam com feijão fava observaram que as acentuadas quedas no pH ocorreram somente nos solos com baixa capacidade tampão e não encontraram mudanças significativas no pH dos dois solos calcários também avaliados.

O efeito das diferentes fontes de neutralizantes foi avaliado apenas na coleta realizada aos 20 dias após a emergência (ensaio II), onde foram incluídos tratamentos com calcário dolomítico e com o pó da alga lithothamnium. Nesta época de avaliação o processo de inibição da nodulação também teve relação com as variações de pH rizosférico em função do metabolismo do nitrogênio. Entretanto, na dose de 240 kgN ha⁻¹ a inibição total da nodulação foi minimizada pela presença dos neutralizantes, embora com poucos nódulos.

Na análise das doses de convivência aos 20 dias após a emergência, observou-se que para a fonte amoniacal, que acidifica a rizosfera, o efeito do solo (Tabela 28) em relação à areia (Tabela 9) foi pouco expressivo. Nesta época de coleta, as doses de nitrogênio de convivência com a nodulação obtidas no solo só foi superior às doses obtidas na areia na presença do calcário e do lithothamnium, no solo com baixo teor de argila. Houve, neste caso, um efeito integrado do corretivo e do solo, que possivelmente está associado às variações no pH da rizosfera e estas associadas à nodulação. O efeito integrado entre solo e corretivos de acidez sobre o pH da rizosfera tem relação direta com o tamponamento do meio pelo consumo de prótons proporcionado pelas cargas da argila e pelos carbonatos, tal como verificou HAUTER & MENGEL (1988) em um estudo realizado na rizosfera de plantas de *Trifolium pratense* cultivadas em solos de diferentes texturas, na presença e ausência de calcário. Foi verificado neste estudo que o tamponamento do solo rizosférico foi o principal responsável pela neutralização dos prótons excretados pelas raízes, sendo no solo arenoso obtida a diferença de 1 ponto de pH entre a rizosfera e o solo e no argiloso não detectadas diferenças importantes entre os valores de pH destes dois compartimentos.

Para HINSINGER (2003) a influência do poder tampão do solo sobre as variações de pH promovidas pelas raízes está relacionada à existência de diversos elementos capazes de reagir com os prótons liberados, através das reações de troca de cátions (CTC), protonação/desprotonação de grupos de ácidos fracos e dissolução ou precipitação de minerais do solo em reações que consomem ou produzem H^+ . No entanto, as variações podem assumir magnitudes consideráveis de acordo com a composição do solo, podendo ser mínimas em solos arenosos e máximas em solos calcários devido ao consumo de H^+ pelos carbonatos.

A diminuição da nodulação do feijoeiro adubado com amônio (acidificante), cultivado em areia e sem neutralizante (experimento 2) pode ser explicada pela diminuição do pH da rizosfera prejudicando a colonização por bactérias que tipicamente preferem ambientes neutros e alcalinos (MARSCHNER et al., 1999). Apesar das altas doses de amônio inibirem a nodulação também no experimento com neutralizantes (experimento 3), a presença destes produtos amenizou a acidificação da rizosfera e a inibição da nodulação em relação às testemunhas sem neutralizantes. Neste trabalho, não foi realizada a avaliação da população microbiana da rizosfera, no entanto a inibição da nodulação indica a redução da atividade do rizóbio neste ambiente.

MARSCHNER et al. (1999) mencionam que além do efeito direto na atividade do rizóbio a alta concentração de H^+ na rizosfera ou no apoplasto, neste caso promovida pelas altas doses de amônio, promove a retenção de exsudatos pela planta, podendo também prejudicar a atividade de microorganismos na rizosfera. Nesta mesma linha de raciocínio SMILEY & COOK (1973) constataram um efeito positivo da acidificação promovida pelo amônio sobre o controle do fungo *Ophiobolus graminis*, microorganismo intolerante às condições ácidas, na rizosfera de trigo. No trabalho destes autores a aplicação de calcário e a consequente elevação do pH reduziram o efeito do amônio como controlador da doença.

Os dados desta tese mostram claramente a existência de relações substanciais entre as variações de pH da rizosfera e a inibição da nodulação, especialmente nas doses baixas e intermediárias de nitrogênio mineral. Entretanto, nos resultados de todos os experimentos fica evidente que nas mais altas doses de nitrogênio (120 e 240 kgN ha⁻¹), dificilmente praticadas em lavouras nacionais de feijão, o pH rizosférico passou a não ser o principal fator prejudicial à nodulação. Ainda assim, a presença dos neutralizantes de acidez possibilitou a ocorrência das maiores doses de nível crítico do nitrogênio para a inibição total da nodulação.

5.2. Aplicação do Nitrogênio Via Foliar, Nodulação e pH da Rizosfera

No experimento em solo e com neutralizantes de acidez (experimento 3) houve a inclusão de agentes capazes de consumir cargas produzidas na rizosfera com o propósito de melhor explicar as associações entre as variações de pH da rizosfera e a magnitude da nodulação do feijoeiro. No experimento 5, o efeito do balanço iônico vegetal, através da extrusão de H^+/OH^- na rizosfera, na nodulação foi avaliado através da aplicação do nitrogênio via foliar, evitando o contato direto do nitrogênio com o rizóbio e o efeito direto nas raízes.

Previamente, foi feita uma avaliação das variações de pH da solução nutritiva de plantas que receberam N via foliar (experimento 4), através de medições em diversas épocas após a aplicação na folha das mesmas fontes e concentrações de nitrogênio. Neste ensaio, não foi feito o controle do pH da solução nutritiva, uma vez que o objetivo do estudo foi investigar as suas variações a partir da aplicação das diferentes fontes de N via foliar. Foi observada, no experimento 4, progressiva acidificação do meio externo às raízes para todos os tratamentos. Entretanto, observou-se que nas plantas adubadas com nitrogênio na forma de nitrato a acidificação da solução nutritiva foi amenizada em relação às plantas supridas com fontes amoniacais, mostrando que independente do órgão de absorção do nitrogênio a rizosfera tem o pH alterado pelo metabolismo vegetal deste elemento.

A deficiência nutricional nas plantas que não receberam nitrogênio é apontada como o principal agente intensificador do processo de acidificação da solução nutritiva. A liberação de ácidos orgânicos pelas raízes é descrita por JONES (1998) como uma das principais respostas das plantas ao estresse por deficiência de minerais. No caso do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) HUNGRIA et al. (1991) relatam que a depleção total do nitrogênio nas reservas da semente ocorre por volta dos 15 DAE, onde é fundamental a presença do nitrogênio no solo ou o funcionamento dos nódulos para as plantas dependentes, exclusivamente, da fixação biológica do nitrogênio atmosférico.

No experimento realizado em areia (experimento 5) foi verificado aos 10 dias após a emergência que o amônio foi a fonte de nitrogênio que mais acidificou a rizosfera do feijoeiro e que mais inibiu a nodulação. Em relação às alterações de pH do meio externo às raízes estes resultados estão de acordo com as variações observadas no experimento em solução nutritiva e em relação à nodulação os resultados do experimento 5 possuem relação direta com os experimentos em areia e solo (experimentos 2 e 3), onde as maiores inibições foram encontradas nas plantas supridas com amônio.

Os resultados do experimento 5 indicam, além da estreita relação existente entre a inibição da nodulação e a presença de nitrogênio metabolicamente disponível fornecido às folhas, a necessidade da planta em balancear-se eletricamente liberando na rizosfera cargas correspondentes às cargas dos íons absorvidos pela folha. A relação entre as modificações do pH e o processo de inibição da iniciação da nodulação mostra-se consistente quando é feito um comparativo entre as quatro fontes de nitrogênio no que diz respeito às variações do pH da rizosfera e o número de nódulos. No comparativo entre as plantas supridas com nitrato e plantas sem nitrogênio nota-se que estas últimas apresentaram maior número de nódulos radiculares mesmo com a geração de valores de pH inferiores aos das plantas com nitrato. Este resultado novamente indica a participação de outro efeito inibitório do nitrogênio sobre a nodulação que independe das variações pH, assim como verificado nos outros experimentos. Como o processo de fixação biológica do nitrogênio é diretamente ligado a deficiência de nitrogênio sendo estimulado por isto, talvez explique esta separação de efeitos.

As relações entre aplicação de substâncias via foliar e alterações na rizosfera, observadas nestes experimentos com aplicação de nitrogênio via foliar, são investigadas há várias décadas. Alterações na atividade de microrganismos na rizosfera foram estudadas por pesquisadores da área de microbiologia, que verificaram em alguns casos a possibilidade de

modificar a dinâmica microbiológica da rizosfera através da aplicação foliar de produtos como fungicidas (HALLECK & COCHRANE, 1950), micronutrientes (RAMACHANDRA REDDY, 1968) e uréia (VRANY, 1974; RAMACHANDRA-REDDY, 1959). A aplicação de uréia via foliar em plantas de trigo cultivadas em um solo contaminado pelo fungo *Fusarium sp.* resultou na redução da população do fungo na rizosfera, além de terem ocorridos aumentos nas populações de bactérias (VRANY, 1972).

Em uma análise comparativa entre sorgo e crotalária BALASUBRAMANIAM & RANGASWAMI (1973) notaram que a aplicação de NaNO_3 (0,1%) via foliar aumentou o teor de aminoácidos na rizosfera da leguminosa e alterou qualitativamente os açúcares liberados pela planta, o que supostamente foi o principal fator para incrementar a população de bactérias fungos e actinomicetos na rizosfera de ambas as espécies vegetais estudadas. RANGA RAO et al. (1972) aplicaram o regulador de crescimento morfactina nas folhas de plantas de pimentão e observaram que a população fúngica da rizosfera foi fortemente reduzida nas mais altas dosagens, cujo efeito foi associado ao retardo no crescimento das raízes laterais e às alterações nos padrões dos exsudatos. Estes autores atribuíram os efeitos da aplicação de substâncias na folha sobre variações na atividade de microorganismos mais às produções de diferentes compostos pela planta, e liberação dos mesmos na rizosfera, do que aos possíveis efeitos do pH ocorridos nesta região.

A ação da acidez da rizosfera sobre a redução da nodulação pelo rizóbio foi, na presente tese, muito possivelmente, associada à sensibilidade do microorganismo a esta condição ambiental desfavorável para a sobrevivência e colonização desta região pelo microorganismo (MIGUEL & MOREIRA, 2001; VARGAS & GRAHAM, 1988; GRAHAM & VANCE, 2000, ANDRADE et al., 2002). A acidificação da rizosfera devido à aplicação de amônio via foliar, por sua vez, possui relação com o balanço iônico vegetal, processo que leva em conta o equilíbrio das cargas internas da planta, considerando a planta inteira (ALLEN et al., 1988), para que a eletroneutralidade vegetal seja mantida.

A explicação para as diferentes variações de pH da rizosfera de plantas supridas com o nitrogênio aplicado via foliar está relacionada às interações existentes entre o sistema radicular e a parte aérea, que ocorrem constantemente no tocante ao equilíbrio de cargas em um processo que possui participação direta do nitrogênio associado a íons como o potássio e compostos orgânicos como o malato. TOURAINÉ et al. (1992) mostraram em plantas soja a interação raiz/parte aérea em relação à absorção de nitrato do solo e o transporte de malato para a raiz, quando verificaram que a absorção nítrica é controlada pela assimilação de N nas folhas, que também controlam a produção e transporte de malato e seu transporte para as raízes pelo floema.

Em relação ao balanço de cargas estes autores concluem sobre a hipótese que quando o nitrato é reduzido na folha a alcalinização resultante faz com que seja produzido malato para manter a eletroneutralidade celular. O malato é translocado pelo floema e quando descarboxilado na raiz produz HCO_3^- , excretado a rizosfera para equilibrar desbalanço aniônico promovido pela absorção de nitrato. YAMADA (2002) cita que o malato é transportado para as raízes acompanhado de um K^+ e na descarboxilação passa a piruvato e HCO_3^- .

De acordo com KIRKBY & KNIGHT (1977) a distribuição das cargas em toda planta de tomate foi acompanhada pela absorção de nitrato, taxa de acúmulo de ânions e taxa de liberação de OH^- na solução nutritiva. O acúmulo de ânions na planta, promovido pelo aumento do nitrato na solução, foi mais evidente na parte aérea do que na raiz. Foi gerado um acúmulo de ânions orgânicos na parte aérea, que normalmente é balanceado por cátions acompanhando o nitrato, com destaque para o potássio.

As relações entre parte aérea e sistema radicular envolvendo transporte de íons e compostos orgânicos, sob a ação do balanço iônico da planta, explicam a correlação ocorrida

entre a aplicação de nitrogênio foliar e as alterações no pH da rizosfera e destas com a magnitude da nodulação. Acredita-se, por exemplo, que o conjunto de mecanismos pelos quais o nitrato aplicado via foliar promoveu a alcalinização da rizosfera e permitiu maior nodulação do que nas plantas com amônio seja o mesmo ocorrido com o nitrato aplicado pela raiz e reduzido na folha, local predominante para a redução do nitrato (KIRKBY & KNIGHT, 1977; IMSANDE & TOURAINÉ, 1994).

No caso do amônio, quando fornecido às folhas das plântulas de feijão provocou acidificação da rizosfera e reduziu o número de nódulos. A explicação fisiológica para este efeito está relacionada aos decréscimos do pH apoplástico de plantas supridas com amônio via foliar, fato verificado por MUHLING & LÄUCHLI (2001) quando testavam várias formas de aplicação de diferentes fontes de N em plantas de feijão e milho. Outra observação destes autores, foi que a partir da aplicação de nitrato e amônio na solução nutritiva foi detectado nas folhas elevação do pH apoplástico na presença da fonte nítrica e acidificação com a fonte amoniacal, concluindo que a atividade da Nitrato Redutase (NR) da raiz foi responsável pelas concentrações de nitrato e variações do pH foliar. Já o gás amônia fumigado na folha gerou uma resposta bifásica, ou seja, uma alcalinização seguida de acidificação. Para YIN et al. (1998) a alcalinização do citosol e vacúolo das folhas submetidas ao gás amônia foi causada, em seu trabalho, pela solução e protonação de NH_3^+ nos compartimentos aquosos de folhas.

A assimilação foliar da amônia em plantas de cevada e espinafre resultou em alterações citossólicas dos teores de aminoácidos (incremento) e sacarose (reduções), correlacionadas com as variações ocorridas no apoplasto e na seiva do floema (LOHAUS & HELDTH, 1997), onde se acredita que sejam geradas alterações nas propriedades eletroquímicas da raiz e da rizosfera. Nestes trabalhos foi mostrado que as folhas podem absorver o amoníaco atmosférico e utilizá-lo como uma fonte de nitrogênio (FARQUHAR et al., 1980), em um processo onde a planta incorpora a amônio em aminoácidos através do complexo GS/GOGAT (BERGER et al., 1986).

O uso da uréia, assim como de nitrato de amônio, proporcionou reduções no pH da areia da rizosfera do feijoeiro menos impactantes do que as obtidas com o uso de amônio, o que não foi uma surpresa considerando o seu metabolismo em relação ao do íon amoniacal. É comum a utilização de uréia via foliar em soluções com concentrações na ordem de 2% em plantas de feijão (ALVIM, 1960), sendo normalmente utilizada como fonte complementar de nitrogênio. A uréia aplicada é rapidamente absorvida e no citoplasma passa pela hidrólise que libera NH_3^+ , cuja protonação alcaliniza o pH citoplasmático (WITTE et al., 2002).

Embora sejam poucas as informações referentes aos efeitos da assimilação foliar da uréia sobre possíveis variações químicas e biológicas na rizosfera, presume-se aqui que mesmo promovendo uma alcalinização inicial, seja possível o surgimento de uma acidificação posterior, tal como mencionado para a amônia fumigada nas folhas, por se tratar da entrada na planta de um íon de carga positiva, necessitando da liberação de uma molécula de carga similar para a planta equilibrar-se ionicamente. No caso do nitrato de amônio o pH da rizosfera foi estatisticamente igual ao da testemunha sem nitrogênio, explicado pelo fato desta ser a fonte eletricamente estável de nitrogênio, com a presença de um íon de nitrato e um íon de amônio.

Em relação ao tratamento sem N mineral, onde o N_2 atmosférico surge como a única possível fonte de N para as plantas inoculadas, os baixos valores de pH foram promovidos pela planta que ao assimilar biologicamente o N_2 libera excessos de cargas positivas na rizosfera em relação às negativas gerando acidificação neste ambiente (JARVIS & ROBSON, 1983; ALLEN et al., 1988; TANG et al., 1997).

Vale ressaltar também que, pelos dados apresentados nos últimos ensaios, as variações de pH ocorridas na rizosfera e atribuídas aos efeitos do balanço de cargas da planta quando submetida fontes catiônicas ou aniônicas de nitrogênio estão associadas tanto ao processo de

absorção do nitrogênio, verificadas através da extrusão de H^+ ou OH^- em plantas com N aplicado nas raízes, quanto com o processo de assimilação foliar do N. Neste caso, posteriormente à sua incorporação em estruturas orgânicas alguns processos metabólicos, como a descarboxilação de ácidos orgânicos, ocorrem para que cargas excedentes sejam liberadas pela raiz, órgão que possui entre outras funções a de excretar diversos íons, compostos e substâncias no meio externo (HINSINGER et al., 2003)

É importante mencionar ainda que como as variações de pH da solução nutritiva iniciaram-se logo nas primeiras horas após a aplicação do nitrogênio via foliar, muito provavelmente o nitrogênio alterou as condições eletroquímicas da rizosfera, afetando o processo de aproximação do rizóbio à rizosfera e, conseqüentemente, influenciando a formação de nódulos.

5.3. Cultivo em areia com a presença do vanadato - inibidor da bomba de prótons

A última variação experimental realizada foi a inclusão do vanadato como inibidor da bomba de próton H^+ -ATPase, devido a possibilidade de reduzir a absorção de íons minerais como o N (HOWITT & UDVARDI, 2000; MCCLURE et al., 1990). Na presença do vanadato, a aplicação de altas doses de amônio (240 kgN ha^{-1}) não permitiu a acidificação da rizosfera (Tabela 45) e possibilitou ainda o surgimento de nódulos (Tabela 38), mesmo que em baixas quantidades e tamanhos reduzidos, situações não verificadas no experimento em areia sem vanadato (experimento 2). Na literatura é conhecido que altas concentrações de N mineral no meio de crescimento de plantas fixadoras de N inibe a nodulação (JACOB et al., 1998; KOHLS & BAKER, 1989; DUSHA et al., 1989; TRUCHET & DAZZO, 1982; ZAHRAN, 1999; BANDYOPADHYAY, et al., 1996). Porém, não são esclarecidos os efeitos das concentrações de nitrato e amônio nas alterações do pH rizosférico e destas alterações na aproximação do rizóbio e na nodulação, principalmente considerando que a absorção do nitrato promove a alcalinização e do amônio a acidificação da rizosfera (JACOB NETO, 2003; RAVEN et al., 1990; CARVALHO et al., 2005). As variações de pH rizosférico devido às fontes de N testadas neste ensaio estão fundamentadas no balanço iônico da planta, que para compensar seu desbalanço elétrico, ocasionado pela absorção de um excesso de carga, excreta íons de carga equivalente na rizosfera, alterando o pH desta região (HINSINGER et al., 2003).

O presente experimento verificou no feijoeiro a dose de nitrato e de amônio capaz de inibir totalmente a nodulação e a dose capaz de permitir 80% da máxima nodulação (aqui denominada dose de convivência). Para melhor entender os efeitos da absorção das fontes de N no pH rizosférico, e por conseqüência na nodulação, foi introduzido o vanadato para reduzir a absorção do N (através da inibição da bomba de prótons) e diminuir os efeitos do N nas variações de pH da rizosfera. Diversos estudos envolvendo a absorção do N mineral, especialmente os que envolvem os efeitos associados a este processo, têm utilizado o ortovanadato (HVO_4^{2-}) como inibidor das H^+ -ATPases (bombas de prótons). As bombas de H^+ são enzimas transmembranares que possuem capacidade de hidrolisar o ATP para produzir energia e um gradiente eletroquímico na membrana. Este gradiente está diretamente envolvido em mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal, como o de transporte de H^+ e, conseqüentemente, a energização do sistema de translocação de íons pela membrana, que é fundamental para absorção de nutrientes como o N (RODDA et al., 2006).

Verificou-se neste 6º experimento desta tese, aos 10 DAE e para ambas as fontes de N, que as maiores doses de NC foram obtidas na presença de $115 \text{ kgVO}^{-3} \text{ ha}^{-1}$. No entanto, ficou claro que nas plantas aos 10 DAE o pH rizosférico teve pouca influência na nodulação, uma vez que sem o vanadato foram observadas as mesmas doses de NC para nitrato e amônio, sendo que estas fontes de N geraram diferentes valores de pH nestas dosagens. Embora seja

conhecido que a acidez seja um dos principais fatores responsáveis por reduzir a nodulação e a FBN (MARSCHNER, 1991; MIGUEL & MOREIRA, 2001; OLIVEIRA & PAVAN, 1996) os dados mostram que no feijoeiro com 10 DAE este efeito não foi o mais expressivo para limitar a nodulação. Neste caso, estima-se que as plantas supridas com as altas doses de nitrato e amônio sofreram os mesmos mecanismos inibitórios independentes do pH (não mensurados no trabalho).

O efeito das fontes de N na nodulação foi mais evidente nas plantas coletadas aos 20 DAE. No tratamento sem vanadato foi verificada a maior dose de NC na rizosfera mais alcalinizada pela presença do nitrato do que na rizosfera acidificada pela presença do amônio. Este raciocínio está de acordo com o de outros autores, que mencionam que no impacto da acidez na produção de nódulos e FBN devem ser incluídos problemas ocorridos na interação entre a planta e o rizóbio ao nível da região da rizosfera (CAMPANHARO, 2006; MARSCHNER et al., 2004). Nota-se também aos 20 DAE que tanto no nitrato quanto no amônio foram observadas as maiores doses de NC nas rizosferas mais alcalinizadas devido à presença do vanadato em relação às testemunhas sem vanadato, sendo no caso do nitrato a dose de vanadato $230 \text{ kgVO}^{-3} \text{ ha}^{-1}$ e no caso do amônio a dose $115 \text{ kgVO}^{-3} \text{ ha}^{-1}$. Foi verificado que o vanadato bloqueou a extrusão de prótons na rizosfera mesmo nas plantas supridas com as mais altas concentrações de amônio, possibilitando aumentar a dose de NC. Neste experimento também foi verificado que na presença do vanadato a aplicação de altas doses de amônio (240 kgN ha^{-1}) não acidificou a rizosfera e foram observados alguns nódulos, corroborando com SANTOS (2006) que menciona que na presença do vanadato normalmente não se verifica a acidificação desta região.

Em relação às doses de convivência do N com a nodulação, nas plantas coletadas aos 10 DAE foi verificado, em geral, que 40 kg ha^{-1} foi a quantidade de N que permitiu que a nodulação se expressasse em 80% do potencial máximo, seguindo os modelos matemáticos utilizados. Para as doses de convivência, as diferenças mais expressivas entre o nitrato e amônio e entre as doses de vanadato foram observadas nas plantas coletadas aos 20 DAE. Entre as fontes de N (plantas sem vanadato), notou-se que a dose de convivência do nitrato foi superior à do amônio. No caso do nitrato, na dose de vanadato $230 \text{ kgVO}_4 \text{ ha}^{-1}$ houve a maior dose de convivência no maior valor de pH rizosférico obtido. As plantas crescidas com amônio e com 115 kg ha^{-1} de vanadato tiveram maior dose de convivência e de NC, em maior valor de pH rizosférico, em relação às plantas testemunhas sem vanadato.

É importante destacar que o mecanismo fisiológico do vanadato em não permitir que a rizosfera seja acidificada mesmo com elevadas doses de amônio, está relacionado à inibição da atividade de ATPases ligadas ao transporte de íons, por formar compostos intermediários durante as reações dependentes de ATP (O'NEILL & SPANSWICK, 1984). A inibição ocorre porque o HVO_4^{-2} é um íon análogo ao HPO_4^{-2} e compete com o fosfato do ATP pelo sítio de fosforilação do ácido aspártico da enzima (SANTOS, 2006). Como as H^+ -ATPases são dirigidas pela hidrólise de ATP, na presença do ortovanadato é formado um intermediário aspartilfosfato em seu ciclo de reação (GARRIDO & BALDANI, 2005), porém sem a geração da energia suficiente para a plena ativação da bomba de prótons como a ocorrida na hidrólise do ATP.

A aquisição das formas de N mineral nitrato e amônio pela planta necessita da atividade da H^+ -ATPase. Na absorção de amônio o influxo na célula vegetal é retardado pela inibição das H^+ -ATPases da membrana plasmática, sendo o equilíbrio de cargas entre o citoplasma e ao apoplasto compensado mediante a excreção de H^+ pela ATPase (HOWITT & UDVARDI, 2000). Assim sendo, a liberação de H^+ devido ao metabolismo do amônio promove acidificação da rizosfera (JACOB NETO, 2003; HINSINGER et al., 2003), porém na presença do vanadato normalmente não se verifica a acidificação desta região (SANTOS, 2006). No caso do nitrato a absorção no mecanismo simporte com um próton (NO_3^-/H^+) exige

a atividade da ATPase para que seja mantida polarizada a membrana plasmática (MCCLURE et al., 1990).

Neste experimento ficou clara a relação entre o pH da rizosfera e a nodulação, especialmente pelo bloqueio das bombas de prótons pelo vanadato na presença das altas doses de amônio, resultando em não acidificação da rizosfera e otimizando a nodulação. Entretanto, as altas doses de nitrato elevaram o pH e também inibiram a nodulação, sugerindo novamente a existência de outros possíveis mecanismos, não mensurados, ligados ao efeito das altas concentrações do nitrato na nodulação. Acredita-se que, assim como a aproximação do rizóbio, estes fatores também estejam ligados ao processo inicial de formação de nódulos, tais como a sinalização entre o rizóbio e a planta, deformação dos pêlos radiculares e a formação do cordão de infecção.

Em relação ao trabalho desenvolvido nesta tese, não foi encontrado na literatura o principal fato aqui relatado, de que a fonte amônio afeta o processo de nodulação do feijoeiro por exercer efeito direto na acidificação da rizosfera. Embora existam diversos mecanismos inibitórios à nodulação descritos na literatura, este trabalho de tese demonstra pela primeira vez este efeito inibidor à nodulação.

6. CONCLUSÕES

- O amônio foi a fonte de N que mais salinizou o substrato areia sem planta, mas a mais alta dose (240 kgN ha^{-1}) não gerou níveis salinos críticos à sobrevivência do rizóbio.
- A cultivar Ouro Negro produziu mais nódulos que a cultivar Rio Tibagi, independente da fonte de N utilizada.
- As duas cultivares testadas alteraram similarmente o pH rizosférico, independente da fonte de N utilizada.
- O amônio foi a fonte de N que mais acidificou a rizosfera, mais inibiu a nodulação e proporcionou a menor dose de nível crítico e a menor dose de convivência.
- A inibição da nodulação causada pelas altas doses de nitrato parece não estar associada somente ao efeito da liberação de OH^- na rizosfera.
- Houve efeito do poder tampão dos solos nas variações de pH rizosférico e na nodulação do feijoeiro, sendo no solo com mais argila encontrada maior acidificação e menor nodulação.
- A alga lithothamnium e o calcário atenuaram a acidificação da rizosfera causada pelo uso de amônio, permitindo otimizar a nodulação do feijoeiro crescido com esta fonte de N.
- A aplicação de N via foliar influenciou o pH da rizosfera e a nodulação, onde as fontes contendo amônio acidificaram mais e afetaram mais a nodulação, associando a extrusão de H^+ à nodulação do feijoeiro.
- A presença do vanadato atenuou a acidificação da rizosfera causada pelas doses elevadas de amônio e permitiu a nodulação, associando novamente a extrusão de H^+ à nodulação.
- Em geral, a inibição da nodulação teve relação com as variações de pH da rizosfera promovidas pelas fontes de N. Porém, nas altas doses de N acredita-se na ação de mecanismos inibitórios não detectados pelas metodologias analíticas utilizadas.

7. REFERÊNCIAS BOBLIOGRÁFICAS

ABAIDOO, R. C.; GEORGE, T.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean. **Can. J. Microbiol.** v.36, p.92-96, 1990.

AGUILAR, S.A. & VAN DIEST, A. Rock-Phosphate mobilization induced by alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, v.61, p.27-42, 1981.

AGUILAR, O.M.; GRASSO, D.H.; RICILLO, P.M.; LOPEZ, M.V.; SZAFER, E. Rapid identification of bean rhizobium isolates by a nifH gene-PCR assay. **Soil Biol. Biochem.** V.30, nº 13, p.1655-1661, 1998.

ALCANTARA, R.M.C.M. & REIS, V.M. Metabolismo do carbono nos nódulos. EMBRAPA. **Documentos 253**. ISSN 1517-8498, Seropédica, 27 p., 2008.

ALLEN, S. & SMITH, J.A.C. Ammonium Nutrition in *Ricinus communis*: Its Effect on Plant Growth and the Chemical Composition of the Whole Plant, Xylem and Phloem Saps. **Journal of Experimental Botany**, v.37, n.11, p.1599-1610, 1986.

ALLEN, S.; RAVEN, J.A.; SPRENT, J.L. The role of long-distance transport in intracellular pH regulation in *Phaseolus vulgaris* grown with ammonium or nitrate as nitrogen source, or nodulated. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.513-528, 1988.

ALMEIDA, C.; CARVALHO, M.A.C.; ARF, O.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S. Uréia em cobertura e via foliar em feijoeiro. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.293-298, 2000.

ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F.M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R.M. JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.41, n.3, p.449-456, 2006.

ALVES, J. M. ; BRITO, H. N. F. ; DORNELLES, M. S. ; SUNDIN, M. F. C. A. M. ; JACOB NETO, J. Efeito da aplicação da alga *Lithothamnium*, triturada e incorporada ao solo, no pH e na produtividade de soja. **Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ**. p.23-24, 1999a.

ALVES, J. M. ; BRITO, H. N. F. ; DORNELLES, M. S. ; SUNDIN, M. F. C. A. M. ; JACOB NETO, J. Efeito da aplicação da alga *Lithothamnium* triturada no sulco de plantio e via foliar, em duas épocas do desenvolvimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) crescidas em condições de campo. **Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ**, Seropédica. p.25-26, 1999b.

ALVES, J.M. ; BRITO, H.N.F. ; JACOB NETO, J. Utilização da alga calcária *Lithothamnium* sp. Triturada na produção de soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ**, Serpédica, v.11. p.77-80, 2001.

ALVES, V.G.; ANDRADE, M.J.B.; CORRÊA, J.B.D.; MORAES, A.R.; SILVA, M.V. Crescimento e produção de vagens do feijoeiro em diferentes graus de compactação e classes de solos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.5, p.1051-1062, 2001.

ALVIM, P.T. Net assimilation rate and growth behavior of beans as affected by gibberellic acid urea and sugar sprays. **Plant physiology**, v.35, n.3, 1960.

ANDRADE, C.A.B.; PATRONI, S.M.S.; CLEMENTE, E.; SCAPIM, C.A. Produtividade e qualidade nutricional de cultivares de feijão em diferentes adubações. **Ciênc. Agrotec.** Lavras. v. 28. n.5. p.1077-1086. 2004.

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. Effects os lime and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, p.477-485, 2002.

ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P.A.A.; HENSON, R.A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres quanto a características relacionadas com a fixação biológica de N₂. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.6, p.831-837, 1994.

ANGELINI, J.; CASTRO, S.; FABRA, A. Alterations in root colonization and *nodC* gene induction in the peanut-rhizobia interaction under acidic conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41 p.289-294, 2003.

ARAÚJO, F.F.; MUNHOZ, R.E.V.; HUNGRIA, M. Início da nodulação em 7 cultivares de feijoeiro inoculadas com duas estirpes de Rhizobium. **Pesq. Agrop. Bras.** Brasília, v.31, n.6, p.435-443, 1996.

ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília, Embrapa, 236p., 1994.

ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; GRIFFITHS, G.J. WHITE, S.T. Economy of Carbon and Nitrogen in Nodulated and Nonnodulated (NO₃⁻grown) Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant Physiology**. 66, 978-983, 1980.

BALASUBRAMANIAN, A. & RANGASWAMI, G. Influence of Foliar Application of Chemicals on the Root Exudations and Rhizosphere Microflora of *Sorghum vulgare* and *Crotalaria juncea*. **Folia Microbiol.**, v.18, p.492-498, 1973.

BANDYOPADHYAY, A.K.; JAIN, V.; NAINAWATEE, H.S. Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). **Biol. Fertil. Soils**, v.21, p.189-192, 1996.

BARKER, A.V.; VOLK, R.J.; JACKSON, W.A. Root Environment Acidity as a Regulatory Factor in Ammonium Assimilation by the Bean Plant. **Plant Physiol.**, v.41, p.1193-1199, 1966.

BASHAN, Y. & LEVANONY, H. Adsorption of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to Soil, Sand and Peat Particles. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.1811-1820, 1988.

- BEN ZIONI, A.; VAADIA, Y.; LIPS, S.H. Nitrate uptake by roots is regulated by nitrate reduction products of the shoot. **Physiol. Plant.** 34: 288-290, 1971.
- BERGER, M.G.; KLAUS, R.E.; FOCK, H.P. Assimilation of gaseous ammonia by sunflower leaves during photosynthesis. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.211-19, 1986.
- BEUTLER, A.N.; FERNANDES, L.A.; FAQUIN, V. Efeito do alumínio sobre o crescimento de duas espécies florestais. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.25, p. 923-928, 2001.
- BHARDWAJ, K.K.R. Survival and symbiotic characteristics of rhizobium in saline-alkali soils. **Plant and Soil**, v.43, p.377-385, 1975.
- BILAN, M.I. & USOV, A.I. Polysaccharides of Calcareous Algae and their Effect on the Calcification Process, **Russian Journal of Biorganic Chemistry**, v.27, p. 2-16, 2001.
- BLACQUIÈRE T. Ammonium and nitrate nutrition in *Plantago lanceolata* L. and *Plantago major* L. ssp. *major*. II. Efficiency of root respiration and growth. Comparison of measured and theoretical values of growth respiration. **Plant Physiol. Biochem.** 25, 775–785, 1987.
- BLISS, F.A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, v.152, p.71-79, 1993.
- BLOOM A.J., SUKRAPANNA S.S. AND WARNER R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiol.** 99, 1294–1301, 1992.
- BLOOM, A.J.; JACKSON, L.E.; SMART, D.R. Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. **Plant, cell and environment**, v.16, p.199-206, 1993.
- BLOOM, A.J.; MEYERHOFF, P.A.; TAYLOR, A.R.; ROST, T.L. Root Development and Absorption of Ammonium and Nitrate from the Rhizosphere. **Journal Plant Growth Regul.**, v.21, p.416-431, 2003.
- BLUNDEM, G.; CAMPBELL, S.A.; SMITH, J.R.; GUIRY, M.D.; HESSION, C.C.; GRIFFIN, R.L. Chemical and physical characterization of calcified red algal deposits known as maërl. **J. Appl. Phycol.** v.9, p.11-17, 1997.
- BOUHMOUCH, I.; SOUAD-MOUHSINE, B.; BRHADA, F.; AURAG, J. Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1103-1113, 2005.
- BOUWMEESTER, H.J.; ROUX, C.; LOPEZ-RAEZ, J.A. BÉCARD, G. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. **TRENDS in Plant Science**, v.12 n.5, 2007.
- BOXMAN, A.W.; KRABBENDAM, H.; BELLEMAKERS, M.J.S; ROELOFS, J.G.M. Effects of ammonium and aluminum on the development and nutrition of *Pinus nigra* in hydroculture. **Environ Pollut.**, v.73, p.119-136, 1991.

- BRITO, D.T. & KRONZUCKER, H.J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiol.** 159, 567-584, 2002.
- BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to Symbiotic Harmony. **Journal of bacteriology**, v.182, n.20, p.564-5652, 2000.
- BROWN, C.M. & DILWORTH, M.J. Ammonia Assimilation by Rhizobium Cultures and Bacteroids. **Journal of General Microbiology**, v.86, 39-48, 1975.
- BUTZ, R.G. & JACKSON, J.A. A mechanism for nitrate transport and reduction. **Phytochemistry**, v.16, p.409-417, 1977.
- CAIRES, E. F. & ROSOLEM, C. A. Calagem em genótipos de amendoim. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.13, p.193-202, 1993.
- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S.. Métodos de Análises Química, Física e Mineralógica do Instituto Agronômico de Campinas. Instituto Agronômico, **Boletim Técnico 106**, Campinas, 94p., 1996.
- CAMPANHARO, M. **Acidez do solo na fixação biológica do nitrogênio no feijoeiro**. Dissertação de Mestrado. UFRPE (Pernambuco), 72p., 2006.
- CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FAÇANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H^+ -ATPases (capítulo 7). In. **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de ciência do Solo. Viçosa, MG. 432 p. 2006.
- CANVIN, D.T. & ATKINS, C.A. Nitrate, Nitrite and Ammonia Assimilation by Leaves: Effect of Light, Carbon Dioxide and Oxygen. **Planta**, v.116, p.207-224, 1974.
- CARVALHO, A.O. **Influência da fonte de nitrogênio sobre o pH da rizosfera de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (sacc) Snyder Hansen**. Tese de Doutorado, Depto. de Fitotecnia, UFRRJ, Seropédica, 2003.
- CARVALHO, A.O.; JACOB-NETO, J.; DO CARMO, M.G.F. Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. **Fitopatol. bras.** v.30. n.1 Brasília. 2005.
- CASTRO, O.M.; PRADO, H.; SEVERO, A.C.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v.50 n.2, p.212-219, 1993.
- CHAGAS, E.; ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G.; GUERRA, J.G.M. Decomposição e liberação de nitrogênio, fósforo e potássio de resíduos da cultura do feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Rev. Bras. Ci. Solo, v.31, p.723-729, 2007.
- CHAILLOU, S.; VESSEY, J.K.; MOROT-GAUDRY, J.F.; RAPER, C.D.; HENRY, L.T.; BOUTIN, J.P. Expression of Characteristics of Ammonium Nutrition as Affected by pH of the Root Medium. **Journal of Experimental Botany**, v.2, n.2, p.189-196, 1991.

CHENG, W.X.; ZHANG, Q.L.; COLEMAN, D.C.; CARROLL, C.R. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? **Soil Biol. Biochem.**, v.28, p.283–288, 1996.

CHENG, Y.; HOWIESON, J.G.; O'HARA, G.W.; WATKIN, E.L.J.; SOUCHE, G.; JAILLARD, B.; HINSINGER, P. Proton release by roots of *Medicago murex* and *Medicago sativa* growing in acidic conditions, and implications for Rhizosphere pH changes and nodulation at low pH. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36 p.1357-1365, 2004.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Research constraints provisionally identified by CIAT. **In: Workshop On Advanced *Phaseolus* Beans Research Network, CIAT: Cali, 1990. 30p.**

CLAUSSEN, W. & LENZ, F. Effect of ammonium and nitrate on net photosynthesis, flower formation, growth and yield of eggplants (*Solanum melongena* L.). **Plant and Soil**, v.171, p.267-274, 1995.

CNPAF. Cultivo do feijoeiro comum – Calagem e adubação. **Sistemas de Produção N° 2.** ISSN 1679-8869. Versão eletrônica. Jan/2003.

CNPAF. Origem e historia do feijão. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. 2007. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/feijao/historia.htm>

CORDOVILLA, M.D.P. & LLUCH, F.L.C. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia faba* L.). **Applied Soil Ecology**, 11, 1-7, 1999.

CORONADO, C.; ZUANAZZI, J.A.S.; SALLAUD, C.; QUIRION, J.C.; ESNAULT, R.; HUSSON, H.P.; KONDOROSI, A.; RATET, P. Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. **Plant Physiology**, v.108, p.533-542, 1995.

DABA, S. & HAILE, M. Effects of rhizobial inoculant and nitrogen fertilizer on yield and nodulation of common bean. **Journal of plant nutrition**, vol. 23, n.5, p.581-591, 2000.

DARBYSHIRE, J. Studies on the physiology of nodule formation. IX. The influence of combined nitrogen, glucose, light intensity and day length on root-hair infections in clover. **Annals of Botany**, v.30, P.623-638, 1966.

DARRAH, P.R. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. **Plant and Soil**. 155/156. 1-20. 1993.

DAZZO, F.B. & BRILL, W.J. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the Rhizobium-clover symbiosis. **Plant Physiology**, v.62, p.18-21, 1973.

DE MICHELIS, M.I. & SPANSWICK, R.M. H⁺-Pumping Driven by the Vanadate-Sensitive ATPase in Membrane Vesicles from Corn Roots. **Plant Physiology**, v.81, p.542-547, 1986.

DENISON, R.F. & HARTE, B.L. Nitrate Effects on Nodule Oxygen Permeability and Leghemoglobin. **Plant Physiol.**, v.107, p.1355-1364, 1995.

DEUBEL, A.; GRANSEE, A.; MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v.163, p.393-398, 2000.

DIAS, G.T.M. Granulados bioclásticos - algas calcárias. **Brazilian Journal of Geophysics**, Vol. 18(3), 2000.

DÖBEREINER, J. & DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica do nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. In: **Curso Sobre Fixação Biológica do Nitrogênio**, n.3, Rio de Janeiro, 23p. 1980.

DÖBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*phaseolus vulgaris* l.), in acid soils. **Plant and Soil**, v.24, n.1, 1966.

DROZDOWICZ, A. G. Microbiologia ambiental. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Tratado de microbiologia**. Rio de Janeiro, v.2, p.1-102, 1991.

DUSHA, I.; BAKOS, A.; KONDOROSI, A. BRUIJN, F.J.; SCHELL, J. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. **Mol. Gen. Genet.**, v.219, p.89-96, 1989.

DUSHA, I.; OLÁH, B.; SZEGLETES, Z.; ERDEI, L.; KONDOROSI, A. *syrM* Is Involved in the Determination of the Amount and Ratio of the Two Forms of the Acidic Exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n.9, p.755-765, 1999.

DUZAN, H.M.; ZHOU, X.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D.L. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.408, p.2641–2646, 2004.

FAGERIA, N.K. & STONE, L.F. Physical, Chemical, and Biological Changes in the Rhizosphere and Nutrient Availability. **Journal of Plant Nutrition**, v.29, n.7, p.1327-1356, 2006.

FAO, 2010. Consulta ao site da FAO.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

FARQUHAR, G.D.; FIRT, P.M.; WETSELAAR, R.; WEIR, B.. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: determination of the ammonia compensation point. **Plant Physiology** v.66, p.710-14, 1980.

FILHO, M.P.B. & SILVA, O.F. Adubação e calagem para o feijoeiro irrigado em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n°7, p.1317-1324, 2000.

FISHER, R.F. & LONG, S.R. *Rhizobium*-plant signal exchange. **Nature**, v.357, p. 655-660, 1992.

- FISCHER, K & NEWTON, W.E. Nitrogen Fixation- A General Overview. **In Nitrogen Fixation at the Millennium**. G. Jeffery Leigh (Editor). Elsevier Science B.V. All rights reserved. Chapter I. USA, 2002.
- FRANCO, A.A. & DAY, J.M. Effect of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. **Turrialba**, Costa Rica, v.30, p.99-105, 1980.
- FRANCO, A.A. & DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.3, p.223-227, 1968.
- FRANCO, A.A. & MUNNS, D.N. Acidity and aluminum restraints in nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. **Soil Sci. Soc. Amer. J.** v.46, p.296-301, 1982.
- FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília. v. 37. n. 8. p. 1145-1150. 2002.
- FREIRE, A.L.O. & RODRIGUES, T.J.D. A salinidade do solo e seus reflexos no crescimento, nodulação e teores de n, k e na em leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Vit.). **Engenharia Ambiental**, v.6, n.2, p.163-173, 2009.
- FREITAS, J.G.; CAMARGO, C.E.O.; FILHO, A.W.P.F.; JUNIOR, A.P. Produtividade e resposta de genótipos de trigo ao nitrogênio. **Bragantia**, v.53, n.2, p.281-290, 1994.
- FREITAS, F.O. Notas científicas. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v.41. n.7. p.1199-1203. jul. 2006.
- GALLAGHER, S.R. & LEONARD, R.T. Effect of Vanadate, Molybdate, and Azide on Membrane-Associated ATPase and Soluble Phosphatase Activities of Corn Roots. **Plant Physiology**, v.70, p.1335-1340, 1982.
- GARRIDO, R.G. & BALDANI, V.L.D. Perspectivas da Nutrição Nitrogenada de Plantas após a Revolução Verde: Fixação Biológica e Uso Eficiente de Nitrogênio. Embrapa Agrobiologia, **Série Documentos 203**, 40p. 2005.
- GERKE, J. Kinetics of soil phosphate desorption as affected by citric acid. **Z.Pflanzenernähr**, v.157, p. 17-22, 1994.
- GIBSON, A.H. & PAGAN, J.D. Nitrate Effects on the Nodulation of Legumes Inoculated with Nitrate-reductase-deficient Mutants of *Rhizobium*. **Planta**, v.134, p.17-22, 1977.
- GIBSON, A.H. & HARPER, J.E. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, v.25, p.497-501, 1985.
- GILLER, K.E. & WILSON, K.F. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. CAB International. Wallingford, Oxon, 313p. 1993.

- GNIAZDOWSKA, A. & RYCHTER, A.M. Nitrate uptake by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots under phosphate deficiency. **Plant and Soil**, v.226, p.79–85, 2000.
- GOI, S.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K.; JACOB-NETO, J. Influence of nitrogen form and concentration on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis*. **Symbiosis**. v.14, p.115-122, 1993.
- GOYAL, S.S. Inhibited effects of ammoniacal nitrogen on growth radish plants. I. Characterization of toxics of NH_4^+ on growth and its alleviation by NO_3^- . **Journal of American Society for Horticultural Science**. v.107, p.125-129, 1982.
- GRAHAM, P.H. & VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**. 65, 93-106, 2000.
- GRAHAM, P.H., DRAEGER, K.J., FERREY, M.L., CONROY, M.J., HAMMER, B.E., MARTÍNEZ, E., AARONS, S.R., QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.198–207, 1994.
- HALLECK, F.E. & V.V. COCHRANE. The effect of fungistatic agents on the bacterial flora of rhizosphere. **Phytopathology**, v.40, p.715-718, 1950.
- HALVERSON, L.J. & STACEY, G. Signal Exchange in Plant-Microbe Interactions. **Microbiological Reviews**, v.50, n.2, p.193-225, 1986.
- HARVEY, A.S. & WOELKERLING, W.J. Guía para la identificación de rodolitos de algas rojas coralinas no geniculadas (Corallinales, Rhodophyta). **Ciencias Marinas**, v.33, p.411-426, 2007.
- HAUSSLING, M.; LEISEN, E.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. An improved method for non-destructive measurements of the pH at the root-soil surface (Rhizosphere). **Plant Physiology**, v.117, p.371-375, 1985.
- HAUTER, R. & MENGEL, K. Measurement of pH at the root surface of red clover (*Trifolium pratense*) grown in soils differing in proton buffer capacity. **Biol. Fertil. Soils**. v.5, p.295-298, 1988.
- HAWKINS, H.J. & GEORGE, E. Reduced ^{15}N -nitrogen Transport Through Arbuscular Mycorrhizal Hyphae to *Triticum aestivum* L. Supplied with Ammonium vs. Nitrate Nutrition. **Annals of Botany**, v.87, p.303-311, 2001.
- HAYNES, R.J. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. **Plant and Soil**, v.120, p.247-264, 1990.
- HECKMANN, M.O.; DREVON, J.J.; SAGLIO, P.; SALSAC, L. Effect of Oxygen and Malate on NO_3^- Inhibition of Nitrogenase in Soybean Nodules. **Plant Physiology**, v.90, p.224-229, 1989.

- HEIDSTRA, R., NILSEN, G.; MARTINEZ-ABARCA, F.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.10, p.215–220, 1997.
- HERRIDGE, D.F. & DANSO, S.K.A. Enhancing crop legume N_2 fixation through selection and breeding. **Plant and Soil**, v.174, p.51-82, 1995.
- HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v.237, p.173–195, 2001.
- HINSINGER, P. & GILKES, R.J. Root-induced dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of lupins grown in alkaline soil. **Australian Journal of Soil Research.** 33, 477-489, 1995.
- HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; TANG, C.; JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. **Plant and Soil**, v.248, p.43–59, 2003.
- HORTA, P.A. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. **Biotemas**, v.15, p.7-44, 2002.
- HOWITT, S.M. & UDVARDI, M.K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1465, p.152-170, 2000.
- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A.A.; WALLSGROVE, R.M. Nitrogen Fixation, Assimilation and Transport During the Initial Growth Stage *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Exp. Botany**, v.42, n.7, p.839-844, 1991.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., (eds.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Brasília, EMBRAPA, p.187-294, 1997.
- HUNGRIA, M. & FRANCO, A.A. Effects of high temperatures on nodulation and N_2 fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**. Dordrecht. v.149. 95-109. 1993.
- HUNGRIA, M. & RUSCHEL, A.P. Acetylene reduction, hydrogen evolution and nodule respiration in *Phaseolus vulgaris*. **Biology and Fertility of Soils**, v.7, n.4, p.351-358, 2004.
- HUNGRIA, M. & VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.
- HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBENZA, A., GUITIERREZ-MANERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.21, p.1515–1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, n.5, p.387-394, 2001.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v.149, p.103-109, 1993.

IMSANDE, JOHN & TOURAINE, B. N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. **Plant Physiology**, v.105, p. 3-7, 1994.

IZAWA, S. & GOOD N.E. Inhibition of photosynthetic electron transport and photophosphorylation. **Methods in Enzymology**. v.24, p.355-377, 1972.

JACOB NETO, J. **Variação estacional, concentração nas sementes e níveis críticos de Mo nos nódulos de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)**. UFRRJ, Tese de Mestrado, 155 p., 1985.

JACOB-NETO, J. & FRANCO, A.A. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.): response to molybdenum in tropical soils. **In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics**. Angra dos Reis - RJ. The Role of Biological Nitrogen Fixation. 1995.

JACOB-NETO, J.; THOMAS, R.J.; FRANCO, A. Avaliação estacional da concentração de molibdênio nos nódulos e demais partes de planta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Turrialba**, Costa Rica, v.38, p.51-57, 1988.

JACOB-NETO, J. & FRANCO, A.A. Determinação do nível crítico de Mo nos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Turrialba**. v.39. p.215-223. 1989.

JACOB-NETO, J.; GOI, S.R.; SPRENT, J.I. Efeito de diferentes formas de nitrogênio na nodulação e crescimento de *Acacia mangium*. **Floresta e Ambiente**, v.5, p.104-110, 1998.

JACOB-NETO, J. **The interactions of H⁺/OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects**. University of Dundee. Scotland. Tese de PhD. 2003.

JARVIS, S.C. & ROBSON, A.D. The effects of nitrogen nutrition of plants on the development of acidity in Western Australian soils. I. Effects with subterranean clover grown under leaching conditions. **Aust. J. Agric. Res.**, v.34, p.341-353, 1983.

JAUER, J.; DUTRA, L.M.C.; ZABOT, L.; UHRY, D.; LUDWIG, M.P.; FARIAS, J.R.; GARCIA, D.C.; LÚCIO, A.D.C.; FILHO, O.A.L.; PORTO, M.D.M. Efeitos da população de plantas e de tratamento fitossanitário no rendimento de grãos do feijoeiro comum, cultivar "TPS Nobre". **Ciência Rural**. v.36. n.5. 2006.

JONES D.L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant and Soil**, v.205, p.25-44, 1998.

JONES, D.L.; HODGE, A.; KUZYAKOV, Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. **New Phytologist**, v.163, p.459-480, 2004.

- JUNIOR, P.I.F. & REIS, V.M. Algumas limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas. EMBRAPA Agrobiologia, **Série Documentos 252**, 33p. 2008.
- KIRKBY, E.A. & MENGEL, K. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea, or ammonium nutrition. **Plant Physiology**, v.42, p.6-14, 1967.
- KIRKBY, E.A. & KNIGHT, A.H. Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. **Plant Physiology**, v.60, p.349-353, 1977.
- KOHL, S.J. & BAKER, D.D. Effects of substrate nitrate concentration on symbiotic nodule formation in actinorhizal plants. **Plant and Soil**, v.118, p.171-179, 1989.
- KUBOTA, F.Y.; NETO, A.C.A.; ARAÚJO, A.P. TEIXEIRA, M.G. Crescimento e acumulação de nitrogênio de plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de molibdênio. **Rev. Bras. Ciência do Solo**, v.32, p.1635-1641, 2008.
- KUZYAKOV, Y. Factors affecting Rhizosphere priming effects. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v.165, p.382-396, 2002.
- KUZYAKOV, Y. & DOMANSKI, G. Carbon input by plants into the soil. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, v.163, p.421-431, 2000.
- KUZYAKOV, Y.; BIRYUKOVA, O.V.; KUZNETZOVA, T.V.; MÖLTER, K.; KANDELER, E.; STAHR, K. Carbon partitioning in plant and soil, carbon dioxide fluxes and enzyme activities as affected by cutting ryegrass. **Biol. Fert. Soils**, v.35, p.348-358, 2002.
- LASA, B.; FRECHILLA, S.; LAMSFUS, C.; APARICIO-TEJO, P.M. The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. **Scientia Horticulturae**, v.91, p.143-152, 1991.
- LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p.773-787, 2002.
- LIMPENS, E. & BISSELING T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.343-350, 2003.
- LLORET, J., BOLAÑOS, L., LUCAS, M. M., PEART, J. M., BREWIN, N. J., BONILLA, I., AND RIVILLA, R. Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61, p.3701-3704, 1995.
- LOBBAN, C.S & HARRISON, P.J. **Seaweed ecology and physiology**. Cambridge, U.K., University Press, 366p. 1994.
- LOHAUS, G. & HELDTH, W. Assimilation of gaseous ammonia and the transport of its products in barley and spinach leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n. 315, p.1779-1786, 1997.

- LOPES, E.S.; NORRIS, D.O.; WEBER, D.F. Estudos sobre a influência de nitratos do solo e modo de inoculação das sementes na nodulação em alfafa (*Medicago sativa* L.). **Bragantia**, v.27, n.21, 1968.
- LUCASSEN, E.C.H.E.T.; BOBBINK, R.; SMOLDERS, A.J.P.; VAN DER VEM, P.J.M.; LAMERS, L.P.M.; ROELOFS, J.G.M. Interactive effects of low pH and high ammonium levels responsible for the decline of *Cirsium dissectum* (L.) Hill. **Plant Ecology**, v.165, p.45-52, 2002.
- LYNCH, J.M. & BRAGG, E. Microorganisms and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science** v.2, p.133-171, 1985.
- LYNCH, J.M. & WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant Soil**, v.129, p.1-10, 1990.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.273-278, 2001.
- MACEDO, R.A.T. **Influência de Fatores de Manejo Sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura da Soja em Áreas Experimentais e de Produção no Noroeste do Paraná**. Dissertação de Mestrado. Agronomia - Ciência do solo, UFRRJ, 2003.
- MACEDO, R.A.T.; SILVA, M.F.; MAIA, L.S.F.M. Neutralização e estabilização do pH da vinhaça de cana de açúcar com uso da alga marinha lithothamnium em pó. **Anais FERTBIO**, Bonito/MS, 2006.
- MAHMOOD T.; WOITKE, M.; GIMMLER, H.; KAISER, W.M. Sugar exudation by roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth] is strongly affected by the nitrogen source. **Planta**, p.214, p.887-894, 2002.
- MAHMOOD, T.; KAISER, W.M.; ALI, R.; ASHRAF, M.; GULNAZ, A.; IQBAL, Z. Ammonium versus nitrate nutrition of plants stimulates microbial activity in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v.277, p.233–243, 2005.
- MAHON, J. D. Environmental and genotypic effects on the respiration associated with symbiotic nitrogen fixation in peas. **Plant Physiology**. v.63, p.892-97. 1979.
- MALIK, N.S.A.; CALVERT, H.E.; BAUER, W.D. Nitrate Induced Regulation of Nodule Formation in Soybean. **Plant Physiology**, v.84, p.266-271, 1987.
- MANTELIN, S & TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.394, p.27-34, 2004.
- MARQUES, I.A. Effects of different nitrogen sources on photosynthetic carbon metabolism in primary leaves on non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, v.71, p.555-561, 1983.
- MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant and Soil**, v.134, p.1-20, 1991.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London, Academic Press, 889 p., 1995.
- MARSCHNER, P.; GERENDÁS, J.; SATTELMACHER, B. Effect of N concentration and N source on root colonization by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RLI. **Plant and Soil**, v.215, p.135–141, 1999.
- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, v.261, p.199-208, 2004.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, L., MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A., GRAHAM, P., PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417–426, 1991.
- MAURY, P.; SUC, S.; BERGER, M.; PLANCHON, C. Response of photochemical processes of photosynthesis to dinitrogen fixation in soybean. **Plant physiology**. 101, p.493-497, 1993.
- MCCLURE, P.R.; KOCHIAN, L.V.; SPANSWICK, R.M.; SHAFF, J.E. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. **Plant Physiology**, v.93, p.281-289, 1990.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315–332, 2006.
- MERCANTE, F.M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F.F.; FRANCO, A.A.; A inoculação do feijão comum com rizóbio. EMBRAPA-CNPBS, **Comunicado técnico n.10**, p.1-9, 1992.
- MEYER, R.J.K. Soybean and sustainability of production system. In: NAPOMPETH, B., ed. **Soybean feeds the world**. Kasetsart Univ. Press, Bangkok, Tailândia. p.367-372. 1997.
- MIGUEL, D. L. & MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Rev. Bras. Ci. Solo**, Viçosa, v.25, p.873-883, 2001.
- MINCHIN, F.R., MINGUEZ, M.I., SHEEHY, J.E., WITTY, J.F. SKOT, L. Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. **Journal of Experimental Botany**, v.37, p.1103-1113, 1986
- MOAT, A.G.; FOSTER, J.W. SPECTOR, M.P. **Microbial Physiology**. Wiley-Liss, Inc. ISBN: 0-471-39483-1, Chapter 14, 2002.
- MONSANT, A.C.; TANG, C.; BAKER, A.J.M. The effect of nitrogen form on rhizosphere soil pH and zinc phytoextraction by *Thlaspi caerulescens*. **Chemosphere**, v.73, p.635-642, 2008.

- MORGANTE, C.; ANGELINI, J.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. **Soil Biology and Biochemistry**. v.37, n.8, p.1436-1444, 2005.
- MORÓN, B.; SORIA-DÍAZ M.E.; AULT, J.; VERROIOS, G.; NOREEN, S.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGÍAS, M.; SOUSA, C. Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. **Chemistry & Biology**. V.12. 1029–1040. 2005.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F., L.; VARGAS, M., A., T.; HUNGRIA, M. Selection of Bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2, p. 121–132, 2002.
- MOUDIONGUI, A. & G. RINAUDO, G. Effect of ammonium nitrate on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) of the tropical legume *Sesbania rostrata*. **Mircen Journal**, v.3, p.235-241, 1987.
- MÜHLING, K.H. & LÄUCHLI, A. Influence of chemical form and concentration of nitrogen on apoplastic pH of leaves. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, p.399-411, 2001.
- MUNNS, D.N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. **Plant and Soil**, v.29, p.33-47, 1968.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**. Vol. 7, 869-885. American Society of Plant Physiologists. 1995
- NEUMANN, G. & RÖMHELD, V. The Rhizosphere: Contributions of the Soil–Root Interface to Sustainable Soil Systems. In.: **Biological Approaches to Sustainable Soil Systems**, Cap.7, p.91-107, 2006.
- NEVES, M. C. P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **Critical Reviews of Plant Science**. v.6, Issue 3, 267-321, 1987.
- NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.
- NYE, P.H. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. **Plant and Soil**, v.61, p.7-26, 1981.
- OAKS, A. & HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**. v.36, p.345-365, 1985.
- OLIVEIRA, E.L. de & PAVAN, M.A. Control of soil acidity in no-tillage system for soybean production. **Soil & Tillage Research**. v.38, p.47-57, 1996.
- OLIVEIRA, I.P.; ARAÚJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica de nitrogênio. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Coord.). *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba. **Potafos**. p.169-221. 1996.

- O'NEILL, S.D. & SPANSWICK, R.M. Effects of Vanadate on the Plasma Membrane ATPase of Red Beet and Corn. **Plant Physiology**, v.75, p.586-591, 1984.
- OTIENO, P.J.; MUTHOMI, J.W.; CHEMINING'WA, G.N.; NDERITU, J.H. Effect of rhizobia inoculation, farmyard manure and nitrogen fertilizer on growth, nodulation and yield of selected food grain legumes. **African Crop Science Conference Proceedings**, v.18, p.305-312, 2007.
- PATE J.S.; LAYZELL, D.B.; ATKINS, C.A. Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and nonnodulated (NO₃-grown) legume. **Plant Physiol.** 64, 1083- 1088, 1979.
- PATTERSON, T.G. & LARUE, T.A. Root Respiration Associated with Nitrogenase Activity (C₂H₂) of Soybean, and a Comparison of Estimates. **Plant Physiology**, v.72, p.701-705, 1983.
- PATERSON, E.; SIM, A.; STANDING, D.; DORWARD, M.; MCDONALD, A.J.S. Root exudation from *Hordeum vulgare* in response to localized nitrate supply. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.10, p.2413-2420, 2006.
- PEARSON, J. & SOARES, A. Physiological responses of plant leaves to atmospheric ammonia and ammonium. **Atmospheric Environment**. v.32, p.533-538, 1998.
- PEIXOTO, N.; BRAZ, L.T.; BANZATTO, D.A.; OLIVEIRA, A.P. Adaptabilidade e estabilidade em feijão-vagem de crescimento indeterminado. **Horticultura brasileira**. v. 20. n.4. 2002.
- PEREIRA, P.A.A. & BLISS, F.A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. **Plant and Soil**. v.104, p.79-84, 1987.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo do carbono na agricultura tropical**. Seropédica. UFRRJ. Inst. Fitotecnia. 159 p, 1998.
- POLLACK, B.M. & MANALO, J.R. Controlling substrate moisture oxygen levels during age of germination. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.94, n.6, p.574-576, 1969.
- PONGSILP, N. & NUNTAGIJ, A. Selection and characterization of mungbean root nodule bacteria based on their growth and symbiotic ability in alkaline conditions. **Suranaree J. Sci. Technol.**, v.14, p.277-286, 2007.
- PUIATTI, M. **Mecanismos envolvidos na inibição da nodulação e fixação de N₂ pelo NO₃⁻ em plantas de soja (*Glycine max* (L) Merrill cv. Santa Rosa) cultivadas em hidroponia**. Tese de Doutorado, Unicamp, Instituto de Biologia, Campinas/SP, 1997.
- PURITCH, G.S. & BARKER, A.V. Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. **Plant Physiology**, v.42, n.7, p.1229-1238, 1967.
- RAMACHANDRA REDDY, T. K. Foliar spray of urea and rhizosphere microflora of rice (*Oryza sefiva* L.). **Phytopathol. Z.**, v.36, p.286-289, 1959.

RAMACHANDRA REDDY, T. K. plant treatment in relation to the rhizosphere effect iii. foliar application of certain trace elements and metallic chelates in relation to rhizosphere microflora of rice (*oryza sativa* l.). **Plant and Soil**, v.29, n.1, 1968.

RAMOS, D.P. **Levantamento detalhado de solos da área da UFRRJ com base em fotografias aéreas e prospecções no terreno.** Itaguaí, Seropédica, Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Agronomia/Ciência do Solo, 128p., 1970.

RANGA RAO, V.; JAYAKAR, M.; SHARMA, K.R.; MUKERJI, K.G. Effect of foliar spray of morphactin on fungi in the root zone of *apsicum annuum*. **Plant and Soil**, v.37, n.1, p.179-182, 1972.

RANGEL, A.F.; MOBIN, M.; RAO, I.M.; HORST, W.J. Proton toxicity interferes with the screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for aluminium resistance in nutrient solution. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** v.168, p.607–616, 2005.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL. I.E.. MUZZI, M.R.S.; PAIVA, E.; FILHO, I.A.P.; CARVALHAIS. L.C.; PASSOS, R.V.M.; PINTO, P.P.; DE SÁ, N.M.H. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília. v.41. n.3. p.439-447. 2006.

RAVEN, J.A. Acquisition of nitrogen by the shoots of land plants: its occurrence and implications for acid-base regulation, **New Phytologist**, v.109, n.1, p.1-20, 1988.

RAVEN, J.A. & SMITH, F.A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytol.**, v.76, p.415-431, 1976.

RAVEN, J.A.; FRANCO, A.A.; JESUS, E.L.; JACOB-NETO, J. H⁺ extrusion and organic-acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants. **New Phytologist**. 114. 369-389. 1990.

RAVEN, J.A.; WOLLENWEBER, B.; HANDLEY, L.L. A comparison of ammonium and nitrate sources for photolithotrophs. **New phytologist**, v.121, p.19-32, 1992.

RAYLE, D.L. & CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant physiology**, v.99, p.1271-1274, 1992.

REZENDE, R.; GONÇALVES, A.C.A.; FRIZZONE, J.A.; FREITAS, P.S.L.; BERTONHA, A.; ANDRADE, C.A.B. Uniformidade de aplicação de água, variáveis de produção e índice de área foliar da cultivar de feijão iapar 57. **Acta Scientiarum**. Maringá. v.24. n.5. p.1561-1568. 2002.

RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; LOPES, E.S.; FRANCO, A.A. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em latossolo ácido. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.11. p.275-282, 1987.

RODDA, M.R.C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R., ZANDONADI, D.B.; GUERRA, J.G.M. ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de atp em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I-efeito da concentração. **Rev. Bras. Ciência do Solo**, v.30, p.649-656, 2006.

- RODRIGUEZ, M.B.; GODEAS, A.; LAVADO, R.S. Soil Acidity Changes in Bulk Soil and Maize Rhizosphere in Response to Nitrogen Fertilization. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.39, n.17, p.2597-2607, 2008.
- ROLLWAGEN, B.A. & ZASOSKI, R.J. Nitrogen source effects on rhizosphere pH and nutrient accumulation by Pacific Northwest conifers. **Plant and Soil**, v.105, p.79-86, 1988.
- RÖMHELD, V. pH changes in the rhizosphere of various crop plants in relation to the supply of plant nutrients. **Potash Review**, v.12, p.1-12, 1986.
- ROSAS, J. C. & BLISS, F. A. Host-plant traits associated with estimates of nodulation and nitrogen fixation in common bean. **HortScience**, v.21, p.287-289, 1986.
- ROSOLEM, C.A. Nutrição e adubação do feijoeiro. Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1987, 93p. (Boletim Técnico 8).
- ROSSIELO, R.O.P. & JACOB NETO, J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema (capítulo 9). In. Nutrição Mineral de Plantas. **Sociedade Brasileira de ciência do Solo**. Viçosa, MG. 432 p. 2006.
- RUAN, J.; ZHANG, F. WONG, M.H. Uptake and rhizosphere soil property of *Camellia sinensis* L. **Plant and Soil**, v.223, p.63-71, 2000.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de Rhizobium, nitrogênio e matéria orgânica na fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.21-24, 1977.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T.; TULMANN NETO, A. Efficiency of Rhizobium inoculation on *Phaseolus vulgaris*. I. Effects of nitrogen sources and plant variety. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.3, p.13-17, 1979.
- RYLE, G.J.A.; ARNOTT, R.A.; POWELL, C.E.; GORDON, A.J. N₂ Fixation and the Respiratory Costs of Nodules, Nitrogenase Activity, and Nodule Growth and Maintenance in Fiskeby Soybean. **Journal of Experimental Botany**, v.35, p. 1156-1165, 1984.
- SÁ, J.C.M.; CERRI, C.C.; DICK, W.A.; LAL, R.; VENSKE FILHO, S.P.; PICCOLO, M.C.; FEIGL, B.E. Organic Matter Dynamics and Carbon Sequestration Rates for a Tillage Chronosequence in a Brazilian Oxisol. **Soil Sci. Soc. Am. J.** v.65. p.1486-1499. 2001.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma Membrane H⁺-ATPase in Maize Roots Induced for NO₃⁻ Uptake. **Plant Physiology**, v.109, p.1277-1283, 1995.
- SANTOS, L.A. & REIS, V.M. A formação do nódulo em leguminosas. EMBRAPA Agrobiologia, **Série Documentos 251**, 14p. 2008.
- SANTOS, L.A. **Absorção e remobilização de NO₃⁻ em arroz (*Oriza sativa* L.): Atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo**. Dissertação de Mestrado. Depto Solos. UFRRJ. 2006.

- SASAKAWA, H. & LARUE, T.A. Root Respiration Associated with Nitrate Assimilation by Cowpea. **Plant Physiol.** 972-975, 1986.
- SCHUBERT, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology.** 37, 539-574, 1986.
- SCHUBERT, S.; SCHUBERT, E.; MENGEL, K. Effect of low pH of the root medium on proton release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). **Plant and Soil**, v.124, p.239-244, 1990.
- SCHULZE, J.; ADGO, E.; MERBACH, W. Carbon Costs Associated with N₂ Fixation in *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. over a 14-Day Period. **Plant Biol.** 1, 625-631, 1999.
- SILVA, J.C.; HELDWEIN, A.B.; MARTINS, F.B.; STRECK, N.A. GUSE, F.I. Risco de estresse térmico para o feijoeiro em Santa Maria, RS. **Ciência Rural.** v.37. n.3. 2007.
- SILVEIRA, J.A.G.; MATOS, J.C.S.; CECATTO, V.M.; VIEGAS, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Nitrate Reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. **Environmental and Experimental Botany.** 46, 37–46, 2001.
- SINGLETON, P.W.; EL SWAIFY, S.A.; BOHLOOL, B.B. Effect of Salinity on Rhizobium Growth and Survival. **Applied and Environmental Microbiology**, p.884-890, 1982.
- SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. **Biologia e bioquímica do solo.** Lavras, Universidade Federal de Lavras, 291p., 2001.
- SKLENAR, J.; FOX, G.G.; LOUGHMAN, B.C.; PANNIFER, A.D.B.; RATCLIFFE, R.G. Effects of vanadate on the ATP content, ATPase activity and phosphate absorption capacity of maize roots. **Plant and soil**, v.167, p.57-62, 1994.
- SKOT, L.; HIRSCH, P.R.; WITTY, J.F. Genetic factors in *Rhizobium* affecting the symbiotic carbon costs of N₂ fixation and host plant biomass production. **Journal of Applied Bacteriology.** 61, p.239-246, 1986.
- SMILEY, R.W. Antagonists of *Gaeumannomyces graminis* from the rhizoplane of wheat in soils fertilized with ammonium or nitrate nitrogen. **Soil Biology and Biochemistry**, v.10, n.3, p.169-174, 1978.
- SMILEY, R.W. & COOK, R.J. Relationship between Take-all and rhizosphere pH in soils fertilized with ammonium vs. nitrate-nitrogen. **Phytopathology**, v.63, p.882-890, 1973.
- SMIT, G., SWART, S.; LUGTENBERG, B.J.J.; KIJNE, J. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. **Mol. Microbiol.** v.6, p.2897–2903, 1992.
- SMOLDERS, A.J.P.; DEN HARTOG, c.; VAN GESTEL, C.B.L.; ROELOFS, J.G.M. The effects of ammonium on growth, accumulation of free amino acids and nutritional status of young phosphorus deficient *Stratiotes aloides* plants. **Aquatic Botany**, v.53, p. 85-96, 1986.

SOARES, A.H.V. **CeresSefs: Sistema Especialista para o Cálculo da Necessidade de Calagem**. Monografia, Ciência da computação, Lavras, MG, 2003.

SODEK, L & SILVA, D.M. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.8, n.3, p.187-191, 1996.

SÖDERBERG, K.H. & BAATH, E. The influence of nitrogen fertilization on bacterial activity in the rhizosphere of barley. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.195-198, 2004.

SOUZA, M.F.M.; VALE, H.M.M.; STRALIOTTO, R. Competitividade de estirpes pertencentes a diferentes espécies de rizóbio para ocupação nodular em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agronomia**, v.37, n.1, p.59 - 63, 2003.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Enzimas de assimilação de nitrogênio. UFRRJ. Copyright©. 57 p. 2002.

SRIVASTAVA, H.S. & ORMROD, D.P. Effects of Nitrogen Dioxide and Nitrate Nutrition on Nodulation, Nitrogenase Activity, Growth, and Nitrogen Content of Bean Plants. **Plant Physiology**, V.81, P.737-741, 1986.

STRALIOTTO, R. & RUMJANEK, N.G. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. Embrapa Agrobiologia, **Série Documentos nº 94**, 1999.

STREETER, J.G. Nitrate Inhibition of Legume Nodule Growth and Activity. **Plant Physiol.** v.77, p.325-328, 1985.

TAGLIAVINI, M.; MASIA, A.; QUARTIER, M. Bulk soil pH and rhizosphere pH of peach trees in calcareous and alkaline soils as affected by the form of nitrogen fertilizers. **Plant and Soil**, v.176, p.263-271, 1995.

TANG, C. & ROBSON, A.D. pH above 6,0 reduces nodulation in *Lupinus* species. **Plant and Soil**, v.152, p.269-276, 1993.

TANG, C.; MCLAY, C.D.A.; BARTON, L. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. **Aust. J. Exp. Agric.** v.37, p.563-570, 1997

TANG, C.; ZHENG, S.J.; QIAO, Y.F.; WANG, G.H.; HAN, X.Z. Interactions between high pH and iron supply on nodulation and iron nutrition of *Lupinus albus* L. genotypes differing in sensitivity to iron deficiency. **Plant and Soil**, v.279, p.153-162, 2006.

TANNER, J.W. & ANDERSON, I.C. External Effect of Combined Nitrogen on Nodulation. **Plant Physiology**, v.39(6), p.1039-1043, 1964.

TEIXEIRA, I. R.; ANDRADE, M.J.B.; CARVALHO, J.G.; MORAIS, A.R.; CORRÊA, J.B.D. Resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola) a diferentes densidades de semeadura e doses de nitrogênio. **Ciênc. agrotec.**, v.24, n.2, p.399-408, 2000.

- TESTA, V. & BOSENCE, D.W.J. Physical and biological controls on the formation of carbonate and siliciclastic bedforms on the north-east Brazilian shelf. **Sedimentology**, v.46, p.279-301, 1999.
- TOURAINÉ, B.; MULLER, B.; GRIGNON, C. Effect of Phloem-Translocated Malate on NO_3^- Uptake by Roots of Intact Soybean Plants. **Plant Physiology**, v.99, p.1118-1123, 1992.
- TREBST, A.V.; LOSADA, M.; ARNON, D.I. Photosynthesis by isolated chloroplasts: XII. Inhibitors of CO_2 assimilation in a reconstituted chloroplast system. **Journal of Biological Chemistry**. v. 235, n.3, p.840-844, 1960.
- TRUCHET, G.L. & DAZZO, F.B.. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen. **Planta**, v.154, p.352-360, 1982.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**. v.152, p.131-138, 1993.
- VADEZ, V.; LASSO, J.H.; BECK, D.P.; DREVON, J.J. Variability of N_2 fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. **Euphytica**, v.106, p.231-242, 1999.
- VAN RHIJN, P. & VANDERLEYDEN, J. The Rhizobium-Plant Symbiosis. **Microbiol. Reviews**, v.59, n.1, p.124-142, 1995.
- VANCE, C.P. & HEICHEL G.H. Carbon In N_2 Fixation: Limitation or Exquisite Adaptation. **Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 42, 373-392, 1991.
- VARGAS, A.A.T. & GRAHAM, P.H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, v.19, p.91-101, 1988.
- VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 524p, 1997.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; CARVALHO, A.M.; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUZA, D., M., G. & LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 416p, 2002.
- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. **Biol Fertil Soils**., v.32, p.228-233, 2000.
- VESSEY, J.K. & WATERER, J. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. **Physiol. Plant**. v.84, p.171-176, 1992.

- VINUESA, P., NEUMANN-SILKOW, F., PACIOS-BRAS, C., SPAINK, H. P., MARTÍNEZ-ROMERO, E., AND WERNER, D. Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.16, p.159-168, 2003.
- VOISIN, A.S.; SALON, C.; JEUDY, C; WAREMBOURG, F.R. Symbiotic N₂ fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. **Journal of Experimental Botany**. v.54, n.393, p.2733-2744, 2003.
- VRANY, J. Changes of Microflora of Wheat Roots after Foliar Application of Urea. **Folia Microbiol.** v.19, p.229-235, 1974.
- VRANY, J. The Effect of Foliar Application of Urea on Fungi of Wheat Growing in Soil Artificially Contaminated with *Fusarium* spp. **Folia Microbiol.** v.17, p.500-504, 1972.
- WAHAB A.M.A., ZAHARAN, H.H.; ABD-ALLA, M.H. Root-Hair Infection and Nodulation of Four Grain Legumes as Affected by the Form and the Application Time of Nitrogen Fertilizer. **Folia Microbiol.** v.41, n.4, p.303-308, 1996.
- WANG, S.P. & STACEY, G. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Gen. Genet.**, v.223, p.329- 331, 1990.
- WATKIN, E.L.J.; O'HARA, G.W. GLENN, A.R. Calcium and acid stress interact to affect the growth of *rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Soil Biol. Biochem.**, v.29, n.9/10, p.1427-1432, 1997.
- WEBSTER, G.; GOUGH, C.; VASSE, J.; BATCHELOR, C.A.; O'CALLAGHAN, K.J.; KOTHARI, S.L.; DAVEY, M.R.; DÉNARIÉ, J.; COCKING, E.C. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, v. 194, p. 115-122, 1997.
- WEISSMAN, G.S. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. **Plant Physiology**, v.49, n.2, p.138-141, 1972.
- WITTE, C.P.; TILLER, S.A.; TAYLOR, M.A.; DAVIES, H.V. Leaf Urea Metabolism in Potato. Urease Activity Profile and Patterns of Recovery and Distribution of ¹⁵N after Foliar Urea Application in Wild-Type and Urease-Antisense Transgenics. **Plant Physiology**, v.8, p.1129-1136, 2002.
- WU, S. & HARPER, J.E. Nitrogen Fixation of Nodulation Mutants of Soybean as Affected by Nitrate. **Plant Physiology**, v.92, p.1142-1147, 1990.
- YAMADA, T. Melhoria na eficiência da adubação aproveitando as interações entre os nutrientes. Informações Agronômicas, **Potafos**, n.100, dezembro/2002.
- YAN, F.; SCHUBERT, S.; MENGEL. Effect of Low Root Medium pH on Net Proton Release, Root Respiration, and Root Growth of Corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.). **Plant Physiol.**, v.99, p.415-421, 1992.

YANG, S.S.; BELLOGÍN, R.A.; BUENDÍA, A.; CAMACHO, M.; CHEN, M.; CUBO, T.; DAZA, A.; DIAZ, C.L.; ESPUNY, M.R.; GUTIÉRREZ, R.; HARTEVELD, M.; LI, X.H.; LYRA, M.C.C.P.; MADINABEITIA, N.; MEDINA, C.; MIAO, L.; OLLERO, F.J.; OLSTHOORN, M.M.A.; RODRÍGUEZ, D.N.; SANTAMARÍA, C.; SCHLAMMAN, H.R.M.; SPAINK, H.P.; TEMPRANO, F.; THOMAS-OATES, J.E.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; VINARDELL, J.M.; XIE, F.; YANG, J.; ZHANG, H.Y.; ZHEN, J.; ZHOU, J.; RUIZ-SAINZ, J.E. Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. **Journal of Biotechnology** v.91, p.243–255, 2001.

YIN, Z.H.; KAISER, W.; HEBER, U.; RAVEN, J.A. Effects of gaseous ammonia on intracellular pH values in leaves of C₃- and C₄-plants. **Atmospheric Environment**, v.32, p.539-544, 1998.

YOKOHAMA, M.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba, **Potafos**, p.771-786, 1996.

YURGEL, S.N.; KAHN, M.L. Dicarboxylate transport by rhizobia. **FEMS Microbiology Reviews**. 28, p.489–501, 2004.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.63, p.968-989, 1999.

ZAHRAN, H.H. & SPRENT, J.I. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. **Planta**, v.167, p.303-309, 1986.

ZERIHUN, A.; MCKENZIE, B.A.; MORTON, J.D. Photosynthate costs associated with the utilization of different nitrogen-forms: influence on the carbon balance of plants and shoot-root biomass partitioning. **New Phytol.**, v.138, p.1-11, 1998.