

**FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ALFAFA (*Medicago sativa* L.).
COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DA DIFERENÇA, DA DILUIÇÃO DE
ISÓTOPO E DA REDUÇÃO DE ACETILENO ***

HÉLIO A. BURITY

Engenheiro Agrônomo. Pesquisador da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/IPA). Professor Credenciado do Curso de Mestrado de Botânica da UFRPE.

MOHAMED A. FARIS

Engenheiro Agrônomo. Pesquisador-Agriculture Canadá, Ottawa Research Station, Forage Crop Section, Ottawa, Canadá.

BRUCE E. COULMAN

Engenheiro Agrônomo. Professor-Departament of Plant Science, MacDonald College of McGill University, Quebec, Canadá

TRUNG C. TA

Engenheiro Agrônomo. Pesquisador-Plant Research Centre, Central Experimental Farm, Research Branch, Ottawa, Canadá.

Em vista ao crescente interesse em se produzir uma maior quantidade de proteína com melhor qualidade e menor utilização de energia externa, a atenção tem sido focalizada sobre a fixação biológica de nitrogênio (N) pelas plantas leguminosas. Intensivas pesquisas sobre a fixação de N foram realizadas nesta última década. Contudo, muito escassas são as informações disponíveis sobre a quantidade absoluta de N_2 - fixado pela simbiose leguminosa - *Rhizobium*. O presente trabalho foi realizado com o propósito de comparar os métodos mais usados de avaliação da fixação biológica de N_2 pela alfafa em monocultura e em associação com gramínea. Resultados provenientes das condições de casa de vegetação e campo, mostram que o método da diferença (MB) e o método da diluição de isótopo (DI) forneceram estimativas que foram bastante similares e superiores significativamente as estimativas de N_2 - fixações derivadas do método da redução de acetileno (RA). Em geral, as estimativas de N_2 - fixado pelos MD e DI foram bastantes aproximadas, mas o método DI mostrou um erro padrão da média reduzido, demonstrando uma maior precisão em comparação ao MD. Assim, foi concluído, que o método DI é o indicado para medir a fixação de N_2 , quando mensurações precisas são requeridas. Por outro lado, o MD poderá ser utilizado em condições em que os recursos para a DI são limitantes. Quanto ao método da RA poderá ser usado, em estudos que visem dimensionar a atividade da enzima nitrogenase em períodos específico.

* Trabalho conduzido pelo primeiro autor na Estação Experimental de Ottawa, Canadá. Apresentado na Sixth Eastern Forage Improvement Conference, Ithaca, New York, August 3 to 8, 1985.

INTRODUÇÃO

Em vista ao crescente interesse em se produzir uma maior quantidade de proteína com melhor qualidade e menor utilização de energia externa, a atenção tem sido focalizada sobre a fixação biológica de nitrogênio (N) através da simbiose leguminosa-*Rhizobium*. Uma série de estudos sobre fixação biológica de N foram realizados nesta última década. A maioria dos resultados tem se baseado na aplicação do método da redução de acetileno (RA), como técnica usada para estimar a fixação de N_2 . Contudo, as avaliações de N_2 fixado através da RA têm sido conflitantes, devido as inúmeras variáveis incontroláveis quando esta técnica é utilizada (LARUE & PATTERSON, 1981 e MARTENSSON & LJUNGGREN, 1984). A principal hipótese deste método envolve a redução de etileno (C_2H_2) para acetileno (C_2H_4) em relação a fixação do N molecular. Mas a relação entre acetileno formado e fixação de N_2 é variável, em virtude da evolução de protons metabolizados pela enzima hidrogenase. Assim, valores superiores à razão teórica de conversão de $C_2H_4 : N_2$ (3:1) podem ser observados (SCHOLLHORN & BURRIS, 1967; HARDY et alii, 1973 e SCHUBERT & EVANS, 1976). Em adição a variação do fator de conversão, outras variáveis de difícil controle são enumeradas como: variação diurna da atividade enzimática da nitrogenase (BERGERSEN, 1970 e CARRAN et alii, 1982), variabilidade entre plantas e colheita parcial dos nódulos (RENNIE, 1984) e ao fato de que usualmente as plantas são destruídas (simples avaliação) (RENNIE, 1984).

Métodos alternativos para estimar a fixação simbiótica de N pelas leguminosas, baseados na aplicação da técnica de isótopos são disponíveis. Como, a incubação das plantas em ambiente atmosférico enriquecido com $^{15}N_2$, método de alta precisão e teoricamente recomendável. A incorporação de N enriquecido é diretamente proporcional a atividade da enzima nitrogenase (BURRIS, 1972). Todavia, consideráveis dificuldades práticas são encontradas nesta técnica, no que concerne à incubação por períodos mais extensos, durante o desenvolvimento da planta (MARTENSSON & LJUNGGREN, 1984). O método da diluição isotópica, a qual utiliza fertilizante enriquecido com ^{15}N é uma excelente alternativa, devido ao fato de que esta técnica integra a fixação de N_2 em um intervalo de tempo específico. A diluição de isótopo estima a concentração de ^{15}N no tecido da leguminosa discriminando o ^{15}N proveniente do solo e ^{14}N oriundo da atmosfera em relação a uma espécie de planta que utiliza somente N do solo (HAUCK & BREMNER, 1976).

A técnica diluição isotópica (^{15}N) para estimar a fixação de N_2 é baseada sobre as considerações do uso de nutrientes de duas fontes: solo e atmosfera. Primeiramente, foi desenvolvida e aplicada por NEWTON et alii (1953), mas somente utilizado diretamente nos estudos de assimilação de N por FRIED & MIDDELBOE (1977). McAULIFFE et alii (1958), modificou o método original da diluição de isótopos, adaptando-o a pesquisa agrônômica e estimou a fixação

biológica de N_2 em *Trifolium repens* L. e *Medicago sativa* L. de acordo com a fórmula:

$$\text{Fração do total da N na leguminosa derivado do } N_2 \text{ atmosférico} = 1 - \frac{\% \text{ de átomo } ^{15}\text{N em excesso-leguminosa}}{\% \text{ de átomo } ^{15}\text{N em excesso-gramínea}} \times 100$$

A principal limitação deste método é que a espécie referencial (não fixadora) deve estar presente e a absorção de N do solo pode ser diferente entre as espécies teste e referência, levando assim a um erro considerável.

O terceiro método para calcular a fixação de N_2 pela leguminosa é o clássico método da diferença, baseado na comparação entre o rendimento total de N das espécies fixadora e a controle. A desvantagem desta técnica está relacionada a espécie controle, a qual pode manifestar uma atividade radicular diferente, resultando em uma absorção anormal de N do solo.

O presente trabalho foi realizado com o propósito de comparar os métodos mais utilizados de estimar a fixação biológica de nitrogênio pela alfafa em monocultura e em associação com gramínea em casa de vegetação e em campo. Os métodos foram: diluição de isótopo, redução do acetileno e diferença total de N.

MATERIAL E MÉTODO

Aspectos Gerais dos Experimentos

Foram conduzidos dois experimentos, um em casa de vegetação e outro em condições de campo, na Estação Experimental de Ottawa, Canadá Agricultura, Ontário, Canadá. O experimento de casa de vegetação foi instalado em fevereiro de 1984 e concluído em agosto de 1984. As sementes pré-germinada de alfafa (*Medicago sativa* L.) cultivar 'Saranac', timothy (*Phleum pratense* L.) cultivar 'Climax', bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.) cultivar 'Tempo' e orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivar 'Kay' foram transplantadas em vaso plástico de 20 cm de altura. Na semeadura, foram colocadas oito plântulas por vaso em monocultura, e oito plântulas em associação (50% leguminosa - 50% gramínea). O meio de crescimento foi uma mistura de vermiculita (70%, v/v) e areia lavada (30%, v/v) esterelizada a seco, à 120°C, por 48 horas. O experimento foi irrigado depois da semeadura e a cada quatro dias, forneceu-se às plantas uma solução nutritiva isenta de nitrogênio (tabela 1). As adições de água foram feitas uma ou duas vezes por dia, baseando-se no peso de dez vasos de cada repetição, sorteados ao acaso. Uma semana após o transplante, uma mistura de estirpes *Rhizobium meliloti* L-6, L-26, C7 - Balzac e 102F70 (Nitragin Co. Wisconsin, EUA), em solução, foi aplicado em todos os vasos. Ao mesmo tempo, foi feita uma adu-

bação básica com 10 ppm de K na forma de KCL e 10 ppm na forma de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$. Quando as plântulas estavam bem estabelecidas, dez dias após o transplante, 5mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido com 99% de átomo de ^{15}N dissolvido em solução de água deionizada, foram aplicadas na superfície de cada pote. Após o segundo corte 2 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido (99% do átomo de ^{15}N em excesso) foram adicionados em cada pote.

As unidades experimentais foram colhidas quando a alfafa atingiu ao estado de 50% de floração, ou seja, a cada cinco a seis semanas. Quatro colheitas foram obtidas durante o experimento. Em cada colheita, as plantas de um vaso foram utilizadas para a determinação da redução de acetileno, em seguida foram secadas em estufa a 70 – 80°C, até atingirem peso constante. A concentração de N total foi determinada através do método micro-Kjeldahl segundo BREMNER (1965) e a % átomo de ^{15}N na planta tecido foi analisado por emissão óptica espectroscópica de acordo com PRESTON et alii (1981).

O experimento consistiu de quatro tratamentos em monocultura e três tratamentos em associação, arranjado em um delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições.

O experimento de campo, foi instalado em maio de 1983 em um solo areno-argiloso com boa drenagem natural na Estação Experimental de Ottawa, Ontário, Canadá. A área experimental tinha sido anteriormente cultivada com a cultura da cevada e os restos incorporados após a colheita. A análise química do solo apresentou níveis adequados de P e Mg. Contudo, levando em consideração a reação inicial do solo (pH = 5,1) e o nível médio de K disponível (98 ppm), potássio e calcário foram aplicados antes da semeadura a uma taxa de 30 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ e 3000 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ na forma de cloreto de potássio (KC1) e calcário dolomítico ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), respectivamente. Espécies e cultivares idênticas, inoculadas com *Rhizobium meliloti* estirpes 102F20 e L-26 (Nitragin Co. Wisconsin, EUA) foram usadas no experimento de campo. A taxa de semeadura para alfafa em monocultura foi 13 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ e em associação foi 11 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, enquanto para timothy foi 6,0 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, e para orchardgrass e bromegrass foi 9,0 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. A mesma taxa de plantio para as gramíneas foram utilizadas em monocultura e em associação (MINISTRY AGRICULTURE AND FOOD, 1982).

Em cada unidade experimental (1,60 m x 6,0 m) estabeleceu-se uma micro-parcela (1,0 m^2), aproximadamente no centro da parcela. Uma solução de 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecida com 99% de átomo de ^{15}N dissolvido em 1,01 de água deionizada foi aplicada na superfície do solo da micro-parcela. Uma outra solução, contendo 0,25 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido com 99% de átomo de ^{15}N foi adicionada em cada micro-parcela, anualmente, na primavera. As unidades experimentais foram colhidas quando a alfafa atingiu plena floração. Obteve-se duas colheitas durante o ano de estabelecimento (1983) e no subsequente (1984) e três colheitas no terceiro ano do experimento (1985). Em cada colheita, as plantas foram colhidas a 3 cm do nível do solo e secadas, em estufa entre 70 – 80°C, até atingirem peso constante. As mensurações realizadas foram idênticas a do experimento em casa de vegetação.

Tabela 1 - Composição química da solução nutritiva livre de nitrogênio utilizada

Solução	Composição	Concentração	Quantidade da Solução Estoque Usada (p/l)
Estoque	Química		
1	KH_2PO_4	34,00g/l	1,0ml
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123,00g/l	1,0ml
3	K_2SO_4	65,00g/l	1,0ml
4	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,00g/l	4,5ml
5	FeCl_3	0,84g/l	1,0ml
	$\text{NaH}_2\text{-EDTA}$	1,70g/l	
6	KCl	0,75g/l	1,0ml
	H_3BO_3	124,00mg/l	
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	67,00mg/l	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	46,00mg/l	
	$\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10,00mg/l	
	$\text{H}_2\text{M}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2$	2,00mg/l	

Solução nutritiva baseada em MUNNS (1968). Ajustada a pH 6.5 através da adição IN de KOH.

Redução de Acetileno

Na determinação da atividade nitrogenase utilizou-se o método da redução do acetileno em raízes destacadas, segundo TURNER & GIBSON (1980). Após a detecção da atividade nitrogenase, foi calculado a quantidade de N_2 fixado, usando a taxa de conversão de $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$ (3:1), integrando os valores diários, a estação de crescimento e ajustando estes valores a variação circadiana da função da enzima nitrogenase. Plantas de cada tratamento e repetição foram removidas entre dez e doze horas. No trabalho em casa de vegetação, após a remoção cuidadosa das plantas e corte da parte aérea na altura do colo, as raízes foram cuidadosamente manipuladas, evitando qualquer dano ao sistema radicular. Em condições de campo, foram retiradas em redor das plantas, amostras de solo de 20 cm de profundidade. Estas amostras foram submergidas em água por vários minutos, de modo a permitir a separação do sistema radicular de bloco de solo com o mínimo de perda de nódulos e distúrbios do sistema radicular. Em seguida, as raízes foram colocadas em vidros de 1.0l, que foram fechados hermeticamente com rolhas de borracha, e 100 ml de ar do vidro foram substituídos por mesmo volume de acetileno equivalente a uma concentração de 10%. Acetileno foi produzido *in situ* pela reação do cloreto de cálcio com água, como descrito por SIROIS & PETERSON (1982). Depois de uma hora de incubação em tem-

peratura ambiente, quatro amostras de 0,5 ml do gás foram retiradas do vidro através de seringa. A quantidade de etileno foi determinada em um cromatógrafo GC 9700 - TM equipado com detector de ionização de chama. Os compostos foram separados em uma coluna poropak N operada a $72 \pm 1^\circ\text{C}$, com N_2 como gás carregador. Os resultados das amostras foram comparados com 0,1% estandar de etileno, similar ao descrito por TURNER & GIBSON (1980). O estandar de etileno foi obtido com amostras de conteúdo conhecido de acetileno.

Diluição de Isótopo

A técnica de diluição de isótopo (DI) foi executada com a aplicação de uma solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contendo 99% de átomo de ^{15}N , equivalente a 1 g/m^2 , uma semana após a semeadura. A percentagem de N na planta derivada da atmosfera foi estimada baseada, nas hipóteses: a) a planta fixadora de N_2 e a testemunha não fixadora absorveu na mesma proporção N mineralizado do solo e o ^{15}N enriquecido durante a estação de crescimento: b) qualquer entrada de N não proveniente do sistema solo é igual para ambas espécies.

A quantidade de N_2 fixado pela alfafa estimado pela diluição de isótopo, seguiu os seguintes cálculos:

$$\begin{aligned} \text{\% de } \text{N}_2 \text{ derivado} \\ \text{da atmosfera} &= \left(1 - \frac{\text{\% de átomo } ^{15}\text{N em excesso - alfafa}}{\text{\% de átomo } ^{15}\text{N em excesso - gramínea}} \right) \times 100 \\ \text{N}_2 - \text{fixado} &= \frac{\text{\% de N derivado da atmosfera}}{100} \times \text{Total N-alfafa} \end{aligned}$$

Para o método da diferença (MD), o total de N_2 fixado foi estimado através da seguinte relação:

$$\text{Total } \text{N}_2 \text{ derivado da} = \frac{\text{Rendimento total de N - Redimento total de N}}{\text{Fixado (leguminosa) (gramínea)}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento em Casa de Vegetação

Na tabela 2, podem ser vistos os dados referentes a quantidade absoluta de N_2 -fixado estimado pelos diferentes métodos. A interação entre métodos e sistema cultural não foi significativa, assim os valores apresentados são os efeitos principais para ambos parâmetros. Os métodos da diferença (MD) e da diluição de isótopo (DI) se destacaram com maior estimativa de N_2 -fixado em relação a redução de acetileno (RA), que apresentou menor estimativa da quantidade de N_2 -fixado por planta. MD e DI deram estimativas de N_2 -fixado que não

diferem estatisticamente. Embora as estimativas pelo MD excederam aqueles produzidos pelo DI em 5,7% em média. Isto sugere que através do MD se obtêm valores representativos de N₂-fixado, a onde, as condições de meio ambiente permite um desenvolvimento apropriado da espécie referencial. De modo geral, a quantidade de N₂-fixado avaliadas pelos métodos MD e DI seguiram a mesma tendência durante o experimento com exceção do corte 4, com DI excedendo a estimativa do MD. Todavia, no corte 1, as estimativas produzidas pelos DI e MD foram iguais (16,20mg de N/planta), independentemente do sistema cultural utilizado.

LEGG & SLOGER (1975), depois de incorporar fertilizante enriquecido com ¹⁵N, verificaram uma relação entre os métodos MD e DI, através de todo período experimental. WILLIAMS et alii (1977), determinaram a correlação entre os dois métodos de medir a fixação de nitrogênio e encontraram que estes métodos estão correlacionados linearmente ($r = 0,98$). Prévios valores de N₂-fixado medidos pelo MD em leguminosas anuais, podem subestimar a fixação em cerca de 40% (HOLLAND et alii, 1969). MARTENSSON & LJUNGGREN (1984), compararam os valores de N derivado da atmosfera em ambos métodos e concluíram que o método DI forneceu estimativas de N₂-fixado significativamente inferiores ao MD. Por outro lado, COALE et alii (1985), quantificaram a percentagem de N derivado da | atmosfera e a quantidade absoluta de N₂-fixado e não evidenciaram existência de diferença significativa entre os MD e DI. Contudo, houve uma significativa diferença em termos de precisão do método usado. O método da diluição, consistentemente apresentou um menor desvio padrão que o MD para ambos parâmetros mensurados. RENNIE (1984) afirmou que MD foi um método confiável de avaliação de N₂-fixado em experimentos com níveis baixos de N do solo, assim a espécie referencial mostrou sinais de deficiência de N. O autor concluiu que o MD pode ser usado com confiança para estimar N₂-fixado, quando a eficiência de uso de fertilizantes são / idênticas para o sistema fixador e a espécie referencial. Outros autores, RUSCHEL et alii (1979), TALBOTT et alii (1982) e BROADBENT et alii (1982) concluíram que a DI oferece maior precisão, quando comparado ao MD, sendo uma das vantagens em mensurar baixa taxa de N₂-fixado. RENNIE & RENNIE (1983) e RENNIE, (1984) concluíram que em adição a precisão, o método DI apresenta uma elevada capacidade de estimar a fixação biológica, devido, principalmente, ao fato dos valores obtidos serem independentes da produção da média seca.

As estimativas de N₂-fixado proveniente do método da RA foram sempre inferior significativamente que aquelas oriundas dos outros métodos em questão. A quantidade absoluta de N₂-fixado estimadas alcançou valores entre 4,46 mg de N/planta e 9,37 mg de N/planta, dependendo do corte. Assim, o método RA deram as menores estimativas de N₂-fixado. A explicação para estes resultados pode vir da sugestão de CARRAN et alii (1982) de que fatores associados a atividades nitrogenase, particularmente a variabilidade entre as plantas de alfafa. TOUGH & CRUSH (1979), sugerem que a variação da atividade da enzima nitrogenase pode ser explicada com a mistura de estirpes de *Rhizobium* usada e a variação genética que ocorre dentro da população de alfafa. Apesar das variações mencionadas, a RA mostra-se um teste proveitoso para estudar a

atividade da enzima nitrogenase no período inicial de seleção para melhorar a fixação de nitrogênio (VIANDS, 1983).

As estimativas de fixação de N_2 da alfafa em associação foram superiores significativamente àquelas obtidas, quando alfafa se desenvolveu em monocultura. Os resultados podem sugerir que as gramíneas pode estimular a fixação de N_2 da leguminosa, quando ambas espécies crescem em associação. Isto é, provavelmente devido a utilização pela gramínea do N excretado dentro do meio pela alfafa (BURITY et alii 1985). Uma compreensiva revisão da associação leguminosa-gramínea, mostrou que a leguminosa tem a propriedade de excretar composto nitrogenado solúveis que são eficientemente absorvidos pelas gramíneas associadas (SIMPSON, 1965 e HAYSTEAD & MARRIOTT, 1979).

Tabela 2 – Fixação de nitrogênio (N_2) pela alfafa em monocultura e em associação com gramíneas, em cortes periódicos, estimada por diferentes técnicas, em condições de casa de vegetação. Os valores entre parênteses são desvio padrão da média para cada método

TÉCNICA OU	N_2 FIXADO				Média ⁺⁺⁺
	1	2	3	4	
SISTEMA CULTURAL	CORTE ⁺				
	mg				N/planta
Redução de Acetileno(RA)	9,37b (3,22)	6,01b (2,23)	5,54b (2,09)	4,46b (1,72)	6,35b
Diluição de Isótopo(DI)	16,20a (2,23)	16,22a (2,12)	15,50a (2,07)	21,26 (2,07)	16,54a
Método da Diferença(MD)	16,20a (2,92)	17,42a (2,20)	17,63a (3,62)	18,74a (2,90)	17,49a
SISTEMA CULTURAL					
Alfafa em monocultura	11,74b (1,74)	11,30b (1,62)	11,24a (1,09)	12,02b (1,36)	11,57b
Alfafa em associação	16,09a (1,94)	15,13a (2,02)	12,53a (1,15)	17,62 (2,15)	13,46a
Média ⁺⁺	13,91a	12,21ab	11,89b	14,82a	13,46
± SE	1,70	1,53	2,22	2,60	2,72

Valores da coluna seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

+ Corte 1 realizado em 23 de maio de 1984; corte 2 realizado em 15 de junho de 1984; Corte 3 realizado em 17 de julho de 1984 e Corte 4 realizado em 24 de agosto de 1984.

++ Médias comparadas horizontalmente.

+++ Médias comparadas verticalmente.

Experimento de Campo

De modo geral, a fixação de N_2 no experimento de campo (tabela 3) seguiu as mesmas tendências dos resultados obtidos em casa de vegetação. Devido ao fato de haver diferença significativa entre métodos de avaliação, sistema cultural e interação entre as variáveis em questão, os dados apresentados representam efeito principal de ambas variáveis. Os métodos da diferença e de isótopo tiveram avaliações de N_2 -fixado superiores significativamente em relação a RA. No ano de estabelecimento das culturas houve uma diferença significativa entre as estimativas de N_2 -fixados pelos MD e DI. No entanto, nos anos subsequentes as estimativas foram muito aproximadas. Todavia as estimativas de DI apresentaram um desvio padrão menor, demonstrando que este método foi mais preciso em estimar a quantidade absoluta de N_2 -fixado. Geralmente, as estimativas de N_2 -fixado pelo MD excedeu aquelas oriundas do DI (MARTENSSON & LJUNGGREN, 1984 e RENNIE, 1984). O MD assume que ambas as espécies, fixadora e referência, apresentam um padrão igual ou muito similar de absorção de N do solo. No presente trabalho, durante o ano de estabelecimento o MD subestimou significativamente a fixação biológica de N_2 em comparação ao método DI, entretanto nos anos seguintes as estimativas entre MD e DI não mostraram uma diferença significativa. Estes resultados podem ser atribuídos a uma maior eficiência no uso do N do solo por parte da leguminosa no período inicial de estabelecimento da simbiose. BOLE & RENNIE (1983) afirmaram que o MD geralmente subestimou a fixação de N_2 quando comparado com o método DI.

MARTENSSON & LJUNGGREN (1984) compararam a percentagem de nitrogênio derivada da atmosfera nos MD e DI, e concluíram que DI apresentou estimativas significativamente menores de N_2 -fixado.

BODDEY et alii (1984) observaram que as mensurações de N_2 -fixado para soja foram geralmente superiores pela técnica da diferença total de N, já que houve uma alta absorção de N do solo pelas plantas noduladas em comparação com as plantas de soja que não nodularem. WAGNER & ZAPATA (1982) também encontraram uma alta absorção de fertilizantes nitrogenados pelas plantas noduladas de soja, determinando assim uma super estimação da fixação de N_2 pelo MD. A absorção relativa de fertilizante e/ou N do solo pelas plantas fixadoras e referências depende do solo, fatores ambientais e práticas de manejo (DEIBERT et alii, 1979 e VASILAS & HAM, 1985).

Independentemente do sistema de cultivo, as estimativas de N_2 -fixado através do MD, depois do inicial período de estabelecimento excederam as mensurações realizadas pela DI por uma percentagem média de 4,15% e 8,43% em 1984 e 1985, respectivamente. Essas diferenças não alcançaram os níveis de significação. Assim, os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, sugerem que as

estimativas de N_2 -fixado pelo MD são suficientemente confiáveis e representativas quando as seguintes condições são observadas: condições ambientais que permitem razoável desenvolvimento da espécie referência; não existir diferença marcante na eficiência de absorção de N do solo ou de fertilizante nitrogenado entre as espécies em teste.

A quantidade de N_2 -fixado estimada pela RA foi sempre bastante inferior a dos outros métodos (tabela 3), alcançando valores de 24,22 kg de N/ha e 25,13 kg de N/ha em 1983 e 1984, respectivamente. Esses baixos valores obtidos podem ser explicados pelos fatos mencionados pela mistura de estirpes de *Rhizobium meliloti* utilizada, juntamente com a variabilidade genética da população da leguminosa (TOUGH & CRUSH, 1979), associados a perdas e danos dos nódulos durante o processo de separação do sistema radicular do solo, em condições de campo. Aliados a estes pontos citados, pode-se observar na tabela 2, que o método da RA subestimou a fixação em relação ao MD no percentual médio de 64%. Neste experimento, não houve o envolvimento da espécie no cálculo da fixação, devido ao meio de crescimento isento de N. Assim, os resultados implicam que a taxa de conversão de $C_2H_2:N_2$ foi aproximadamente 1:1, a qual é aproximadamente a mesma para soja de acordo com HERRIDGE, (1982). Contudo, apesar da subestimativa do N_2 -fixado em ambas as condições ambientais utilizadas e outras limitações enfatizadas, o método RA mostra ser um teste racional e útil em estudos relativos a atividade de enzima nitrogenase em período específico.

A estimativa de N_2 -fixado proveniente do sistema cultural, alfafa em associação foi significativamente superior àquelas estimadas em monocultura, no ano de estabelecimento do ensaio. Nos anos subsequentes contudo, as estimativas não apresentaram diferenças estatísticas. A tendência foram as mesmas do experimento em condições mais controladas. Estes dados evidenciam que a associação, alfafa-gramínea, não teve efeito prejudicial na capacidade fixadora da leguminosa e talvez estimule a fixação de N_2 , quando ambas crescem em associação. CRAIC et alii (1981) reportaram que a inclusão de gramíneas em misturas com leguminosas aumentou a fixação de N_2 na leguminosa. Os autores explicaram que a diminuição de N disponível no solo para a leguminosa foi devido à rápida absorção pela gramíneas que pode estimular a fixação de N_2 na leguminosa.

Tabela 3 – Fixação de nitrogênio (N_2) pela alfafa em monocultura e em associação com gramíneas, durante os anos de 1983 a 1985, estimada por diferentes técnicas em condições de campo. Valores entre parênteses são desvio padrão da média para cada método

TÉCNICA ou <u>SISTEMA CULTURAL</u>	N_2 -FIXADO		
	1983	1984	1985
	A N O		
	kg N/ha		
Redução de Acetileno(RA)	24,22 (4,9)	25,23 (4,7)	—
Diluição de Isótopo(DI)	99,88	256,67	215,09
Método da Diferença(MD)	86,64 (21,8)	267,78 (32,8)	234,89 (33,9)
<u>SISTEMA CULTURAL</u>			
Alfafa em monocultura	58,55 (9,7)	194,07 (17,1)	221,85 (31,1)
Alfafa em associação	82,11 (11,0)	192,31 (19,8)	228,13 (28,1)
DMS (5%)	3,87	44,14	54,82
C.V.(%)	18,04	15,20	13,47

C.V. (%), Coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que os métodos da diluição de isótopo e da diferença total de nitrogênio são adequados para quantificar a fixação simbiótica de N_2 . Devido a maior precisão e sensibilidade da diluição de isótopo este método deverá ser escolhido quando mensurações mais rigorosas são requeridas. Contudo, os custos adicionais associados ao método diluição de isótopo com aplicação e análises (átomo % ^{15}N), evidenciam que o método da diferença seja preferido em várias situações. Apesar das limitações apresentadas pelo método da redução de acetileno, seu uso é proveitoso em caso de estudos fenológicos da atividade enzimática da nitrogenase em períodos específicos.

ABSTRACT

In view of the increasing interest in producing high-quality protein with less input of external energy, attention has been focused on biological nitrogen (N) fixation by leguminous plants. Intensive research on biological N fixation has taken place during the past decade. However, very few measurements on absolute amount of N_2 - fixation are available. The present work was carried out with the purpose of comparing the most used method for evaluating total N_2 - fixation by alfalfa in pure and mixed stand with grass. Field and greenhouse estimates of N_2 - fixation using the N difference method (DM) and ^{15}N dilution method (ID) were fairly similar for the two techniques and significantly larger than N_2 - fixation values estimated by acetylene reduction (AR). In general, the estimates by these two methods were close, however, the ID showed lower standard errors than DM, demonstrating that the ID was more precise to assess N_2 - fixation in comparison with DM. So, it is concluded that ^{15}N dilution technique is the method of choice when precise measurements of N_2 - fixation are required. The DM may be used when resources for isotopes technique are limiting. In spite of the limitations presented by AR, this method should be used for studying the relative activity of the nitrogenase enzyme at a specific time.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BERGERSEN, F. J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Australian Journal Biology Science*, Victoria, 23:1015-25, 1970.
- 2 - BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R.; MATSUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 16:583-8, 1984.
- 3 - BOLE, J. B. & RENNIE, R. J. Letter to the editor. *Agronomy Journal*, Madison, 75(4):717; July/Aug. 1983.
- 4 - BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: BLACK, C. A., ed. *Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties*. Madison, American Society of Agronomy, 1965. part. 2, cap. 83, p. 1149-78. (Agronomy, 9).
- 5 - BROADBENT, F. E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, G. Y. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. *Agronomy Journal*, Madison, 74(4):625-8, July/Aug. 1982.
- 6 - BURITY, H. A.; FARIS, M. A.; COULMAN, S. E. Nitrogenase activity of alfalfa grown alone and in mixture with grass under greenhouse conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, 65:787-91, 1985.
- 7 - BURRIS, R. H. Nitrogen fixation assay methods and techniques. *Methods Enzymology*, London, 4:355-66, 1972.
- 8 - CARRAN, R. A.; RUMBALL, P. J.; TOUGH, H. J.; BROCK, J. L.; CRUSH, J. R. Diurnal variation in acetylene reduction by white clover. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 25:295-9, 1982.

- 9 – COALE, F. J.; MEISINGER, J. J.; WIEBOLD, W. J. Effects of plant breeding and selection on yields and nitrogen fixation in soybeans under two soil nitrogen regimes. *Plant and Soil*, The Hague, 86:357-67, 1985.
- 10 – CRAIG, L. de A.; WIEBOLD, W. J.; McLINTOSH, M. S. Nitrogen fixation rates of alfalfa and red clover grown in mixture with grass. *Agronomy Journal*, Madison, 73(6):996-8, Nov./Dec. 1981.
- 11 – DEIBERT, E. J.; BUJERIEGO, M.; OLSON, R. A. Utilization of ^{15}N fertilizer by modulating and non-modulating soybean isolines. *Agronomy Journal*, Madison, 71:717-23, 1979.
- 12 – FIELD Crop Recommendations. Ontario, Ministry Agriculture and Food, 1982. 74 p. (Publication, 296).
- 13 – FRIED, M. & MIDDELBOE, V. Measurement of amount nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil*, The Hague, 47:713-5, 1977.
- 14 – HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 5:47-81, 1973.
- 15 – HAUCK, R. D. & BREMNER, J. M. Use of tracers soil and fertilizer nitrogen research. *Advance in Agronomy*, New York, 28:219-66. 1976.
- 16 – HAYSTEAD, A. & MARRIOTT, C. Transfer of legume nitrogen to associated grass. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 11:99-104, 1979.
- 17 – HERRIDGE, D. F. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiology*, Bethesda, 70(3):1-6, July, 1982.
- 18 – HOLLAND, A. A.; STREET, J. E.; WILLIAMS, W. A. *Range legume inoculation and nitrogen fixation by root nodule bacteria*. Davis, California Agriculture Experimental Station, 1969. 842 p.
- 19 – LARUE, T. A. & PATTERSON, T. G. How much nitrogen do legumes fix? *Advance in Agronomy*, New York, 34:15-37, 1981.
- 20 – LEGG, J. O. & SLOGER, C. A tracer method for determining symbiotic nitrogen fixation in field studies. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABLE ISOTOPES, 2., 1975. *Proceeding...* Illinois, Oak Brook, 1975. p. 661-6.
- 21 – McAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D. S.; URIBE-URANGO, H.; WOODHOUSE, W. W. J. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N . *Agronomy Journal*, Madison, 50:334-37, 1958.
- 22 – MARTENSSON, A. M. & LJUNGGREN, H. D. A comparison between the acetylene reduction method, the isotope dilution method and the total nitrogen difference method for measuring nitrogen fixation in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant and Soil*, The Hague, 81:177-84, 1984.
- 23 – MUNNS, D. N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. A sensitive steps. *Plant and Soil*, The Hague, 28:129-46, 1968.
- 24 – NEWTON, J. W.; WILSON, P. W.; BURRIS, R. H. Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by azotobacter. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 204:445-51, Sept. 1953.

- 25 – PRESTON, C. M.; PRESTON, J. M.; CALLWAY, E. G. Inexpensive ^{15}N analysis of agricultural samples by optical emission spectroscopy employing a single one step Damas sample preparation procedures. *Canadian Journal of Spectroscopy*, Montreal, 26:239-44, 1981.
- 26 – RENNIE, R. J. Comparison of N balance and ^{15}N isotope dilution to quantify N_2 fixation in field grown legumes. *Agronomy Journal*, Madison, 76:785-90, 1984.
- 27 – — & RENNIE, D. A. Techniques for quantify N_2 – fixation in association with non legumes under field and greenhouse conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Montreal, 29:1022-35, 1983.
- 28 – RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B.; VICTORIA, R. L.; SALATI, E. Comparison of isotopetechniques and non-nodulating isolines study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean. *Plant and Soil*, The Hague, 53:513-25, 1979.
- 29 – SCHOLLHORN, R. S. & BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 – fixation. *Proceedings of the Nation Academy of Science*, Washington, 58:213-6, 1967.
- 30 – SCHUBERT, K. R. & EVANS, H. J. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, 73:1207-11, 1976.
- 31 – SIMPSON, J. R. The transference of nitrogen from pasture legumes to an associated grass under serval systems of managements in pot culture. *Australian Journal of Agriculture Research*, Victoria, 16:915-26, 1965.
- 32 – SIROIS, J. C. & PETERSON, E. A. A rapid screening method for *Rhizobium meliloti* symbiotie nitrogenase activity. *Canadian Journal of Microbiology*, Montreal, 28:265-8, 1982.
- 33 – TALBOTT, H. J.; KENWORTHY, W. J.; LEGG, J. O. Field comparison of the nitrogen-15 and difference methods of measuring nitrogen fixation. *Agronomy Journal*, Madison, 74(5):799-804, Sept./Oct. 1982.
- 34 – TOUGH, H. J. & CRUSH, J. R. Effect of grade of acetylene on ethylene production by white clover (*Trifolium repens* L.) during acetylene reduction assay of nitrogen fixation. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 22:581-3, 1979.
- 35 – TURNER, G. L. & GIBSON, A. H. Measurement of nitrogen fixation by indireet means. In: BERGESEN, F. J., ed. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Chichester, J. Wiley, 1980. p.111-38.
- 36 – VASILAS, B. L. & HAM, G. E. Nitrogen fixation in soybeans: An evaluation of measurement techniques. *Agronomy Journal*, Madison, 76:759-64, 1985.
- 37 – VIANDS, D. R. Advances in breedings alfalfa for nitrogen fixation potencial. In: EASTERN FORAGE IMPROVEMENTE CONFERENCE, 5., St. Anne de Bellevue, 1983. *Proceedings...* St. Anne de Bellevue, MacDonald College of McGill University, 1983. |p. 2-7.
- 38 – WAGNER, B. L. & ZAPATA, F. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope dilution. *Agronomy Journal*, Madison, 74:607-12, 1982.
- 39 – WILLIAMS, W. A.; JONES, M. B.; DELWICHE, C. C. Clover N fixation measurement by total N difference and ^{15}N A-values in lysimetress. *Agronomy Journal*, Madison, 64:1023-4, 1977.

Recebido para publicação em 31 de dezembro de 1987.