
EFEITO DE DIFERENTES FORMAS DE NITROGÊNIO NA NODULAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Acacia mangium*.

JORGE JACOB NETO

PhD, Prof. Adjunto IA - DF - UFRRJ

SILVIA REGINA GOI

PhD, Prof. Adjunto IF - DCA - UFRRJ

JANET IRENE SPRENT

PhD, Prof. University of Dundee, Scotland UK

RESUMO

A aplicação de N mineral afeta a nodulação em muitas leguminosas. Contudo, nódulos de algumas espécies de leguminosas arbóreas crescem vagarosamente em comparação com leguminosas produtoras de grão e uma pequena quantidade de nitrogênio pode estimular a nodulação e crescimento da raiz, logo após a germinação. Os efeitos de diferentes fontes de N na nodulação e no crescimento de *Acacia mangium* foram estudados. O nitrato aplicado, inibiu completamente a formação dos nódulos. NH_4^+ foi a fonte mais eficiente de N aplicado, não inibiu a nodulação e promoveu um crescimento maior da planta.

Palavras-chaves: nitrato, amônio, leguminosa arbórea.

ABSTRACT

EFFECT OF DIFFERENT NITROGEN FORMS ON NODULATION AND GROWTH OF ACACIA MANGIUM

Combined N inhibit nodulation in many legumes. Although, nodules of some species of trees grow slowly in comparison with grain legumes, and a small amount of N can stimulate nodulation shortly after germination. The effect of different sources of nitrogen on the nodulation and plant growth parameters of *Acacia mangium* was studied. Applied nitrate drastically affects the nodule formation. NH_4^+ was the best source of N applied, for nodule grow and plant development.

Key words: nitrate, ammonium, leguminous tree.

INTRODUÇÃO

O processo de fixação biológica de nitrogênio, não tem sido estudado intensivamente entre as espécies de leguminosas arbóreas. A relação entre as características genéticas;

fisiológicas e ecológicas, estão longe de serem compreendidas (WERNER *et al* 1998). Embora existam resultados na literatura, relacionando o efeito de diferentes formas de N no crescimento de árvores (KELTJENS & VAN LOENEN, 1989; Arnold & VAN DIEST,

1991) existem poucos resultados obtidos com leguminosas arbóreas e especialmente como essas formas de N interagem com a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio.

As plantas superiores podem adquirir o nitrogênio (N) como NH_4^+ e NO_3^- que são as formas mais comuns encontradas na solução do solo. Em comparação com o suprimento de nitrato, a utilização de NH_4^+ pode oferecer vantagens energéticas (RAVEN & SMITH, 1976; RAVEN, 1985; RAVEN *et al.*, 1992). Em relação à forma de N disponível no solo, as situações onde o nitrato ou amônio aparecem como única fonte de N, são raramente encontradas nos ecossistemas terrestres naturais, pois dependem do estado de oxidação que deve ser ou muito oxidado ou reduzido para haver apenas uma das formas presente.

Em se tratando de leguminosas arbóreas que são encontradas em associação simbiótica com *Rhizobium* que fixam o nitrogênio atmosférico, tais como a *Acacia mangium*, as mesmas podem estar sujeitas ao efeito da adição de N no processo de formação das mudas, bem como no local onde serão introduzidas. Esse N, dependendo da forma, pode afetar o processo de formação e desenvolvimento dos nódulos e consequentemente diminuir o potencial de fixação biológica de nitrogênio da espécie estudada. Adicionalmente, as plantas lenhosas também exibem diferenças em sua capacidade de utilizar ions nitrato e amônio. Essas diferenças estão pelo menos em parte, relacionadas à forma principal de N disponível nos seus nichos ecológicos (STEWART *et al* 1989). *Acacia melanoxyton*, *Acacia auriculiformis* e *Acacia mangium* apresentaram maior peso da planta quando crescidas com amônio (SUN *et al* 1992). Resultados recentes indicam, que para *Inga marginata* (GONÇALVES *et al* 1996), *Mimosa caesalpiniaefolia* (GOI *et al* 1997) e *Mimosa scrabella* (JUNIOR & GOI, 1997), a fonte ideal para a complementação de N é a NH_4^+ . Esta complementação deve ser feita até o início do processo de fixação biológica de N, que em

algumas dessas leguminosas arbóreas, demora mais de 20 dias.

Em face do aproveitamento diferencial do N entre as leguminosas arbóreas acima relacionadas, este trabalho teve como objetivo, estudar o efeito da adição de diferentes formas de N, no processo de formação e desenvolvimento do nódulo, bem como no crescimento de *Acacia mangium* em sua fase inicial de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com fotoperíodo de aproximadamente 13 horas e temperatura de 33°C/18°C. As sementes de *Acacia mangium* foram escarificadas com gilete, esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio (5%), lavadas com água esterilizada e colocadas em placas de petri com meio agar/água estéril 91% e mantidas em incubadora a 28°C. Após uma semana, as plântulas foram transferidas para potes contendo uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2x1. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 4 repetições e três tratamentos: plantas sem nitrogênio mineral (controle), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (10 mg N/planta/semana) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 mg N/planta/semana). Todas as plântulas foram inoculadas com a estirpe de *Rhizobium* DUS 088. Para manter relativamente constante a concentração de N no sistema, semanalmente, o meio de crescimento era lavado com água corrente durante 30 minutos e então 100 ml de uma nova solução nutritiva (GOI, 1993) era adicionada. As plantas foram colhidas aos 128 dias após plantio. A atividade da redutase do nitrato *in vivo* foi feita como descrito por ANDREWS *et al.*, (1984). Foi utilizada uma mistura de folhas ou raízes finamente cortadas (< 2 mm) para a composição de cada amostra. O material foi colocado em 5 cm³ de meio de incubação contendo 100 mol m⁻³ de tampão fosfato (pH 7,5), n-propanol 3% (v/v) e nitrato de potássio (50 mol. m⁻³). As amostras foram incubadas no escuro, em banho-maria a 30°C. Após 30 minutos, 1 ml da amostra foi analisada para

nitrito. A quantidade de nitrito presente deu a estimativa da atividade da redutase do nitrato. Para 1 ml da amostra, foi acrescentado 0,25 ml de 15 sulfanilamida em 3M HCl e após, 0,25 ml de 0,002 5 N-1 naphthil-ethyldiamine-dihydrochloride e 2 ml de água deionizada. Após 15 minutos a absorbância foi lida a 543 nm em colorímetro digital. As amostras para a análise de carbono e nitrogênio foram secas e moídas em micromoinho, pesadas em uma microbalança (Cahn), e analisadas em analisador automático de elementos marca Carlo Erba (modelo 1106). Os resultados quantitativos foram analisados pelo procedimento estatístico padrão do Programa Statgraphics.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela 1 mostram o efeito deletério do uso de nitrato na fixação biológica de nitrogênio, na fase inicial de crescimento de *Acacia mangium*. O nitrato inibiu completamente a formação dos nódulos. As plantas controle e as plantas crescidas com NH_4^+ , apresentaram o mesmo peso de nódulos, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre esses tratamentos. Este efeito na nodulação, decorrente da adição de nitrato, também foi observado em outras leguminosas, como *Acacia auriculiformis* (GOI *et al.*, 1992) e *Mimosa caesalpiniaefolia* (GOI *et al.*, 1997). Adicionalmente, pode-se citar que o NO_3^- no substrato de crescimento de plantas de *Mimosa caesalpiniaefolia* (GOI *et al.*, 1997) e *Chamaecrista fasciculata* (GOI *et al.*, 1994), acarretou mudanças morfológicas na ultraestrutura dos nódulos, tais como senescência de bacteróides, permanência dos bacteróides dentro do cordão de infecção, presença de cordões de infecção com membranas espessadas e desorganização celular generalizada.

Quando as plantas foram coletadas, muitos primórdios de nódulos foram observados em raízes do tratamento com NH_4^+ , mas eles não foram incluídos no número e peso, devido à

dificuldade de contagem e separação das raízes. Adicionalmente, como os pesos das raízes demonstram (Tabela 1), elas eram 12 vezes maiores no tratamento com NH_4^+ , possibilitando o aparecimento de novos sítios de infecção e conseqüente formação de nódulos. Essa observação pode significar, que pelo menos neste nível de NH_4^+ aplicada, o processo de infecção não foi afetado e que novas gerações de nódulos podem aparecer nessa fase de crescimento, na espécie estudada.

O efeito benéfico do ion NH_4^+ refletiu-se significativamente na acumulação de matéria seca da parte aérea (Tabela 1), sendo que neste tratamento, as plantas apresentaram valor médio 11,5 vezes maior que o tratamento onde as plantas não receberam suplementação com nitrogênio mineral. SUN *et al.* (1992) obtiveram resultados semelhantes, onde o crescimento de *Acacia mangium* foi 40% menor, quando o nitrato foi a fonte de nitrogênio.

A percentagem de N (Tabela 1) foi maior na raiz no tratamento com NO_3^- . Este resultado também foi observado em *Acacia polyacantha*, *Chamaecrista fasciculata* (GOI *et al.*, 1993) e *Mimosa caesalpiniaefolia* (GOI *et al.*, 1997), indicando uma acumulação de N na raiz. Esse nitrogênio pode ter contribuído localizadamente para inibir a nodulação. Uma acumulação de ^{15}N nas raízes, também foi observada nos experimentos de absorção de nitrato por *Acacia auriculiformis* (GOI, 1993). Em face desses resultados, considera-se portanto que a assimilação e transporte de NH_4^+ , não provocou acumulação de N na raiz, deixando os nódulos e a planta se desenvolverem normalmente e pode ser considerado um processo mais eficiente para a espécie estudada. Entretanto, estudos do custo energéticos da absorção e assimilação de NO_3^- e NH_4^+ ainda não foram realizados nesta espécie.

A razão do efeito negativo do NO_3^- no processo de nodulação e fixação biológica de nitrogênio não está ainda bem esclarecido, mesmo em leguminosas anuais (STREETER, 1986;

Tabela 1 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no peso de raiz, parte aérea e nódulos secos, número de nódulos, % de nitrogênio e nitrogênio total de *Acacia mangium*.

Fontes de Nitrogênio	Peso (mg/planta)			Número de nódulos	%N		Nitrogênio Total (mg /planta)	
	Nódulos	Raiz	Parte aérea		Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Controle	7,25a	23,25b	137,50c	15ab	1,96b	3,39ab	0,45c	4,65c
N-NO ₃ ⁻	0b	110,50b	669,25b	0b	2,68a	3,68a	2,96b	24,66b
N-NH ₄ ⁺	7,75a	278,25a	1590,50a	24a	2,15b	3,16b	5,94a	49,51a

As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 2 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na %C, carbono total, relação C/N pH do substrato de crescimento de *Acacia mangium*.

Fontes de nitrogênio	%C		Carbono Total (mg)		Relação C/N		pH do substrato
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	
Controle	40,95a	45,98ab	9,48b	64,26c	13,58ab	21,06a	7,60b
N-NO ₃ ⁻	41,24a	45,01b	45,56b	301,37b	12,22b	15,40b	7,96a
N-NH ₄ ⁺	42,95a	48,27a	120,65a	769,70a	15,41a	20,09a	6,96c

As médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

TRUCHET & DAZZO, 1982). Várias hipóteses tem sido propostas para explicar este efeito deletério: diminuição do fornecimento de carboidratos (GIBSON & PAGAN, 1977), toxicidade do nitrito (RIGAUD & PUPPO, 1977) e relação do nitrato com o processo de difusão do O₂ nos nódulos (VESSEY & WATERER, 1992). Contudo, essas hipóteses propostas se somam, sem chegar a uma conclusão generalizada. No presente experimento por exemplo, o próprio nitrato estaria limitando o crescimento da planta por não ser a fonte ideal

de N, reforçando a atuação do ion NO₃⁻ no processo de fixação biológica de nitrogênio.

Em relação à assimilação de nitrato, na maioria das plantas, ele é reduzido mais eficientemente nas folhas do que nas raízes, por causa da disponibilidade de fotossintetatos. Contudo, as leguminosas parecem ser uma exceção a essa regra. A predisposição da redução de nitrato pela raiz pode ser uma consequência da assimilação obrigatória de nitrogênio imposta pela adaptação à utilização de amônio ou do N₂

(STEWART *et al* 1989). Nesta espécie, a atividade da redutase do nitrato (95 nmol NO_2^- / g peso fresco / hora na raiz e 7 nmol NO_2^- / g peso fresco / hora na parte aérea) indicou ser a raiz, o local principal de redução do nitrato, em semelhança com outras leguminosas arbóreas anteriormente estudadas (GOI *et al*, 1997). Os valores da atividade da redutase do nitrato encontradas nesta espécie são bem menores que os valores encontrados para *Acacia auriculiformis* (GOI, 1993), nas mesmas condições experimentais. Nos tratamentos onde o nitrato não estava presente no substrato de crescimento, a atividade da enzima não foi detectada, pois nesta espécie a enzima redutase do nitrato não é constitutiva.

A relação C/N na raiz e parte aérea foi menor no tratamento com NO_3^- (Tabela 2), demonstrando também um aumento da concentração de nitrogênio nessas plantas. A relação C/N da parte aérea nas plantas crescidas com nitrato e o aspecto clorótico das folhas novas dessas plantas, sugerem que o NO_3^- deve ter sido absorvido, mas não foi assimilado, restringindo a fixação do carbono. Os resultados da %C e Carbono Total Também sugerem a não assimilação do nitrato. Foram observadas diferenças no pH do substrato; as plantas que receberam NH_4^+ promoveram um decréscimo no pH e as plantas com NO_3^- aumentaram o pH, em função de trocas ocorridas no processo de absorção iônica. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em literatura (RAVEN *et al*, 1990; JACOB-NETO, 1993).

Foram observadas anteriormente, em outras espécies florestais que possuem a NH_4^+ como fonte preferencial de N, modificações no crescimento, bem como escurecimento das raízes de pinheiros e spruce quando as plantas cresciam com NO_3^- (BIGG & DANIEL, 1978), Estes dados contribuem para reforçar a necessidade de indicação da fonte ideal de complementação de N, não só considerando o processo de nodulação, mas também em relação ao crescimento da planta.

Como o objetivo final é a otimização do

crescimento das mudas em viveiro em função da análise da fonte de nitrogênio e sua interação com a nodulação das raízes, para esta espécie estudada, a fonte ideal de complementação de N foi a NH_4^+ . Nesse tratamento foi observada a melhor interação dos parâmetros de crescimento e nodulação. O N-NH_4^+ deve ser suprido nas primeiras semanas de desenvolvimento da planta até o estabelecimento do processo de fixação biológica de nitrogênio.

LITERATURA CITADA

- ANDREWS, M.; SUTHERLAND, J. M.; THOMAS, R. J. & SPRENT, J. I. Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: the importance of the stem. *New Phytol.*, 1984, 98:301-310.
- ARNOLD, G. & VAN DIEST, A. Nitrogen supply, tree growth and soil acidification. *Fert. Res.*, 1991, 27:29-38.
- BIGG, W. L. & DANIEL, T. W. Effects of nitrate, ammonium and pH on the growth of conifer seedlings and their production of nitrate reductase. *Plant and Soil*, 1978, 50:371-385.
- GOI, S. R. Nitrogen nutrition of nodulated woody legumes. Tese de PhD, University of Dundee, 1993, 199p.
- GOI, S. R.; SPRENT, J. I. & JACOB-NETO, J. Effect of different sources of N on the structure of *Mimosa caesalpiniaefolia* root nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29:983-987.
- GOI, S. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. & JACOB-NETO, J. Influence of nitrogen form on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis*. *Symbiosis*, 1992, 82:505-512.
- GOI, S. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. & JACOB-NETO, J. Effect of long term application of nitrogen as nitrate and

- ammonium on the structure of *Chamaecrista fasciculata* root nodules. III Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo. 1994, p. 73. *Resumos*.
- GONÇALVES, C. A.; GOI, S. R. & JACOB-NETO, J. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na nodulação de *Inga marginata*. XII Congresso Latino Americano de Ciência do solo. *Resumos*, 1996.
- JACOB-NETO, J. The interactions of H⁺ / OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects. PhD Thesis, University of Dundee, Scotland, UK, 1993.
- JUNIOR, H. C. M. & GOI, S. R. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na nodulação e crescimento de *Mimosa scabrella*. 1997. *Semana de Biologia, UFRRJ, Anais*.
- KELTJENS, W. G. & VAN LOENEN, E. Effects of aluminium and mineral nutrition on growth and chemical composition of hydroponically grown seedlings of five different forest tree species. *Plant and Soil*, 1989. 119:39-50.
- RAVEN, J. A. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular land plants: costs and benefits in relation to efficiency of use of water. *New Phytol.*, 1985. 101:25-77.
- RAVEN, J. A. ; WOLLENWEBER, B. & HANDLEY, L. L. A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytol.*, 1992. 121:19-31.
- RAVEN, J. A. & SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.*, 1976. 76: 415-431.
- RAVEN, J. A, FRANCO, A. A. ; JESUS, L.L. & JACOB-NETO, J. H⁺ extrusion and organic acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants. *New Phytolol*, 1990, 114:369-389.
- RIGAUD, J. & PUPPO, A. Effect of nitrite upon leghaemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 497:702-706.
- STEWRT, G. R.; PEARSON, J.; KERSHAW, J. L. & CLOUGH, E.C.M. Biochemical aspects of inorganic nitrogen assimilation by woody plants. *In: Ann. Sci. For.* 46. *Forest Tree Physiology*, 1989, Suppl., p.648s-653s.
- STREETER, J. G. Effect of nitrate on acetylene reduction activity and carbohydrate composition of *Phaseolus vulgaris* nodules. *Physiol. Plant.*, 1986 68:294-300.
- SUN, J. S.; SANDS, R. & SIMPSON, R. J. Genotypic variation in growth and nodulation by seedlings of *Acacia* species. *For. Ecol. Manag.*, 1992, 55:209-223.
- TAYLOR, A. A., DE-FELICE, J. & HAVILL, D. C. Seasonal variation in nitrogen availability and utilization in na acidic and calcareous soil. *New Phytol.*, 1982. 92:141-152.
- TRUCHET, G. L. & DAZZO, F. B. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen. *Planta*, 1982, 154: 352-360.
- VESSEY, J. K. & WATERER, J. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant.*, 1992, 84:171-176.
- WERNER, D.; VINUESA-FLEISCHMANN P.; SCHEIDEMANN, P.; WETZEL, A. & REDECKER, D. Nitrogen fixing trees:

research tasks in physiology,
symbiotic interactions and ecology.
Biological Nitrogen fixation for the 21st

Century. Proceedings of the 11th
International Congress on Nitrogen
Fixation. 1998, 677-678.