

Fixação biológica e transporte de nitrogênio em *Inga edulis* Mart. submetida ao tratamento com nitrogênio fixado (NO_3^- e NH_4^+)

Rebeca Patricia OMENA-GARCIA¹; Gilberto Costa JUSTINO²; Carlos Eduardo Moura da SILVA³; José Francisco de Carvalho GONÇALVES²

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CPST/INPA; ³Colaborador CPST/INPA

1. Introdução

A limitação de nitrogênio (N) nos solos é o único estresse que favorece a simbiose e, consequentemente, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Hartwig 1998). Evidências mostram que o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) inibem o estabelecimento, a formação e o crescimento dos nódulos assim como a FBN da maioria das leguminosas estudadas, porém os mecanismos envolvidos no processo ainda não foram totalmente esclarecidos (Camargos e Sodek, 2010). Do ponto de vista quantitativo, o efeito do N mineral sobre a FBN em espécies arbóreas tem sido bem menos investigado quando comparado a espécies agrônomicas. No caso de espécies arbóreas de clima tropical, os estudos são ainda menos frequentes (Aidar *et al.* 2003; Dan e Brix 2009; Barron *et al.* 2011), mesmo quando se trata de leguminosas arbóreas como *Inga edulis* Mart., espécie reconhecidamente capaz de melhorar as condições físicas e químicas do solo, devido a sua grande produção de biomassa e capacidade de estabelecer relação simbiótica com microorganismos fixadores de nitrogênio molecular (N_2) (Leblanc *et al.* 2005). Como consequência, pouco se sabe sobre a eficiência desta espécie em fixar N_2 na presença do N mineral. O fato é que, dependendo das características do solo, das condições ambientais ou mesmo, da mudança no uso terra, as formas do N mineral podem ser alteradas nos solos (Wick *et al.* 2005). Diante das lacunas no conhecimento sobre o metabolismo do N em espécies arbóreas tropicais, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência da FBN ao partir do transporte de compostos nitrogenados pelo xilema em plantas noduladas de *Inga edulis* tratadas com NO_3^- e NH_4^+ .

2. Material e métodos

A espécie *Inga edulis* Mart. foi selecionada a partir das informações disponíveis sobre a capacidade de nodulação de plantas arbóreas nativas da Amazônia. As sementes foram obtidas da estação experimental do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e germinadas em bandejas plásticas. Após 15 dias, as sementes foram transferidas para vasos plásticos contendo vermiculita e inoculadas com uma suspensão contendo 11 bactérias extraídas de leguminosas arbóreas da Amazônia. As plantas foram cultivadas sob condições de viveiro e tratadas com solução nutritiva modificada de Hoagland e Arnon's (1950) como se segue: solução nutritiva sem nitrogênio (-N), solução nutritiva contendo NO_3^- (5 mM) ou NH_4^+ (5 mM). O crescimento em altura, diâmetro e a contagem do número de folhas foram realizados na instalação do experimento e acompanhados quinzenalmente. O crescimento relativo em altura (RGR-h), em diâmetro (RGR-d) e o índice de ganho foliar (IGF) foram calculados conforme Evans (1972) e Hunt (1982). Aos 98 dias após o transplante, raízes, folhas e nódulos foram coletados e lavados com água destilada, separados para determinação da massa seca em estufa e parte do material utilizado para a extração dos compostos nitrogenados extraídos em MCW (12/5/3) de acordo com metodologia proposta por Bielski e Turner (1966). A seiva do xilema foi coletada após corte do caule como recomendado por McClure e Israel (1979) e armazenada em freezer (-20 °C) para posterior avaliação. Os teores de aminoácidos totais, aminoácidos livres, ureídeos e nitrato foram determinados de acordo com recomendação de Yemm e Cocking (1955), Vogels e Van Der Drift (1970) e Cataldo *et al.* (1975), respectivamente. Os teores de açúcares solúveis foram determinados utilizando-se glicose como padrão de acordo com o proposto por Dubois *et al.* (1956). Os aminoácidos livres foram separados por HPLC em coluna fase reversa, após derivatização com orto-ftaldialdeído (OPA) (Puiatti e Sodek 1999). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (-N, $+\text{NO}_3^-$ e $+\text{NH}_4^+$) e 10 repetições, considerando-se como repetição cada indivíduo amostrado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Para verificar a relação entre as variáveis dependentes com as variáveis independentes dos dados de crescimento foram realizadas análises de regressão utilizando-se o programa Statistica versão 6.1 para Windows.

3. Resultados e discussão

O crescimento de plantas noduladas de *I. edulis* foi afetado pela presença do N mineral. Ao final do experimento, a altura das plantas tratadas com NO_3^- e NH_4^+ foi 35% e 64% maior, respectivamente, do que o verificado para plantas obtendo N exclusivamente a partir da FBN (Figura 1A). Não foram verificadas alterações drásticas no crescimento em diâmetro de plantas recebendo N mineral (Figura 1B). O incremento da massa seca total das plantas neste experimento deveu-se, principalmente, ao incremento de massa seca da parte aérea. É bastante evidente que a fixação biológica do N_2 parece limitar o crescimento desta espécie nas condições em que este experimento foi executado. O efeito positivo do N mineral sobre o crescimento foi observado no acúmulo e na distribuição de biomassa entre os principais componentes da planta (Figura 2A). Como esperado ocorreu maior investimento de biomassa no sistema radicular na presença de N mineral, mas no caso do NH_4^+ , ocorreu incremento

significativo na massa seca de folhas, o que pode ter proporcionado aumento das taxas fotossintéticas, o que explicaria, em parte, o incremento dos teores de massa seca neste tratamento.

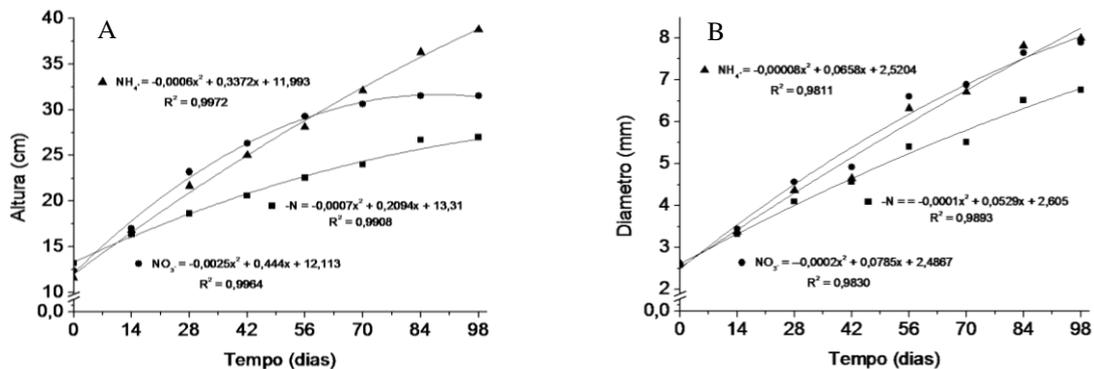


Figura 1. Relação da (A) altura em função do tempo e do (B) diâmetro em função do tempo de plantas noduladas de *Inga edulis* tratadas com solução nutritiva sem nitrogênio mineral (controle) ou contendo nitrogênio mineral (NO_3^- e NH_4^+), cultivadas em viveiro.

Todas as plantas de *Inga edulis* cultivadas nodularam após a inoculação (figura 2A; B). O melhor desempenho das plantas tratadas com NH_4^+ possibilitou maior investimento na biomassa dos nódulos, resultado não observado para o NO_3^- . O número de nódulos foi negativamente afetado pelo tratamento com NO_3^- , efeito corroborado por dados da literatura (Dan e Brix 2009; Barron *et al.* 2011). Por outro lado, no caso do NH_4^+ , os resultados foram diferentes da maioria dos dados encontrados na literatura (Glyan'ko *et al.* 2009), mas estão de acordo com os resultados encontrados por Camargos e Sodek (2010) trabalhando com *Calopogonium mucunoides*, uma espécie nativa do cerrado. Entretanto, Bollman e Vessey (2006) observaram que o NH_4^+ tem efeitos similares aos causados pelo NO_3^- , inibindo significativamente a nodulação. Isto implica que o mecanismo de influência inibitória do NO_3^- e NH_4^+ sobre a simbiose está relacionado às diferentes estratégias de utilização de N das plantas (Glyan'ko *et al.* 2009).

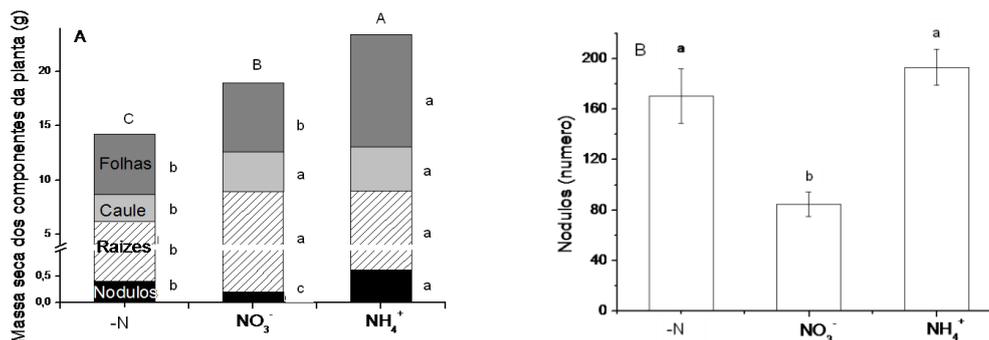


Figura 2. (A) Massa total e dos principais componentes da planta (folhas, caule, raízes e nódulos) e (B) número de nódulos de plantas noduladas de *Inga edulis* tratadas com solução nutritiva sem nitrogênio mineral (controle) ou contendo nitrogênio mineral (NO_3^- e NH_4^+), cultivadas em viveiro.

Embora os dois tratamentos (NO_3^- e NH_4^+) tenham proporcionado maior acúmulo de biomassa radicular, o NO_3^- promoveu maior incremento da massa seca das raízes em relação as folhas, levando a uma maior razão raiz/parte aérea (Tabela 1). De acordo com nossos dados, embora com acúmulo de biomassa significativamente maior, o índice de ganho foliar (IGF) de plantas tratadas com NH_4^+ foi menor neste tratamento. Assim, esta foi a única variável, significativamente, reduzida por este tratamento. Ainda, conforme verificado na tabela 1, o crescimento relativo em altura foi maior apenas no tratamento recebendo NH_4^+ e o diâmetro relativo foi superior nos dois tratamentos com N mineral. Os resultados de crescimento suportam a hipótese de que esta planta cresce melhor na presença de NH_4^+ , como fonte de N, consistente com a importância deste nutriente nos solos da Amazônia (Wick *et al.* 2005), ambiente natural da espécie aqui estudada.

Tabela 1. Crescimento relativo em altura e diâmetro, índice de ganho foliar e razão raiz/parte aérea de plantas noduladas de *Inga edulis* tratadas com solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) ou contendo nitrogênio mineral (NO_3^- ou NH_4^+), cultivadas em viveiro.

Tratamento	RGH – h (cm)	RGD – d (mm)	IGF	R/PA
-N	0,22 ± 0,08* b**	0,26 ± 0,02 b	0,52 ± 0,05 a	0,72 ± 0,19 b
NO_3^-	0,27 ± 0,05 b	0,30 ± 0,03 ab	0,55 ± 0,04 a	0,90 ± 0,17 a
NH_4^+	0,39 ± 0,06 a	0,31 ± 0,06 a	0,42 ± 0,02 b	0,58 ± 0,06 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

** Desvio padrão ($n = 10$)

Os resultados da tabela 2 indicam que não ocorreu redução nos teores de aminoácidos foliares, mas foi observado incremento nos teores das raízes e dos nódulos na presença de fonte externa de N mineral. Entretanto, no caso dos ureídeos, ocorreu redução nos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ . De acordo com Schulze (2004), o acúmulo de compostos nitrogenados nas folhas e nos nódulos está envolvido com a redução da atividade da enzima nitrogenase, responsável pela fixação do N_2 . Em folhas, raízes e nódulos de todos os tratamentos foi observada a presença do NO_3^- , contudo, os valores foram maiores em plantas tratadas com NO_3^- . Do mesmo modo, na seiva do xilema, embora bastante baixo, foi detectado o transporte de NO_3^- para a parte aérea em todos os tratamentos (Figura 3A). Não é incomum o transporte de NO_3^- pelo xilema de plantas dependentes exclusivamente da fixação biológica (Gan *et al.* 2004), sendo sugerido que a água utilizada para molhar as plantas possa ser uma fonte potencial deste elemento e no caso dos tratamentos com NH_4^+ , o processo pode ser intensificado pelo processo de nitrificação no substrato (Camargos e Sodek 2010). As altas taxas de crescimento das plantas não foram acompanhadas por nenhuma tendência de aumento nos teores de açúcares solúveis totais. Os aminoácidos parecem ser a principal forma de transporte em plantas simbióticas de *I. edulis*. Entretanto, os teores de NH_4^+ não foram determinados. O transporte deste nutriente não é comumente observado em plantas, pois devido a sua toxicidade ele é, rapidamente, assimilado. Entretanto, concentrações da ordem de milimolar de NH_4^+ foram verificadas na seiva de *Brassica napus* (Finnemann e Schjoerring, 1999).

Tabela 2. Teor de aminoácidos, ureídeos, NO_3^- e açúcares solúveis totais em folhas, raízes e nódulos de plantas noduladas de *Inga edulis* tratadas com solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) ou contendo nitrogênio mineral (NO_3^- ou NH_4^+), cultivadas em viveiro.

	Folhas			Raízes			Nódulos		
	-N	NO_3^-	NH_4^+	-N	NO_3^-	NH_4^+	-N	NO_3^-	NH_4^+
Aminoácidos $\mu\text{mol/g}$	11,9±2,0a	11,4±2,1a	11,2±2,5a	1,6±0,5b	2,3±1,1ab	3,6±1,5a	12,9±1,7b	16,0±3,3ab	19,2±3,8a
Ureídeos $\mu\text{mol/g}$	11,4±1,2a	10,8±0,8a	11,4±0,9a	5,1±2,6a	5,1±2,0 a	4,7±2,0b	10,5±0,7a	9,9±0,4b	9,8±0,3b
Nitrato $\mu\text{mol/g}$	3,98±0,2b	4,36±0,9ab	5,08±0,5a	2,06±0,8c	7,65±2,3a	4,61±1,1b	4,40±0,5b	6,91±0,9a	4,47±0,7b
Açúcares solúveis $\mu\text{mol/g}$	14,7±1,5a	16,4±1,8a	14,4±2,6a	14,0±1,3a	15,0±0,8a	14,4±0,9a	4,7±0,8a	5,1±1,0a	4,3±0,5a

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

** Desvio padrão ($n = 10$)

Os dados da figura 3A mostram o nível de N orgânico transportado pela seiva na forma de aminoácidos, ureídeos e NO_3^- . Os aminoácidos são claramente a mais importante forma de N transportado em *I. edulis* da raiz para a parte aérea, independente da forma de N fornecida. Na seiva do xilema, um alto nível de transporte de N foi encontrado, enquanto os níveis mais baixos foram observados com NO_3^- . Os dados observados aqui revelaram que a fonte de N influencia o transporte de N, uma vez que foi observada redução nos teores transportados. Em soja, o perfil de aminoácidos transportados pelo xilema pode ser usado como um indicador da fixação de N_2 em condições de estresse. No entanto, no caso de nosso experimento, ao contrário de outras leguminosas, a composição dos aminoácidos do xilema sofre pequena alteração na presença de NO_3^- ou NH_4^+ . O conteúdo de ureídeos foi dez vezes inferior ao encontrado em soja e feijão, onde os níveis de ureídeos chegaram a 7-8 mmol/ml (Amarante *et al.* 2006). Estas características excluiriam *I. edulis* da categoria de plantas transportadoras de ureídeos.

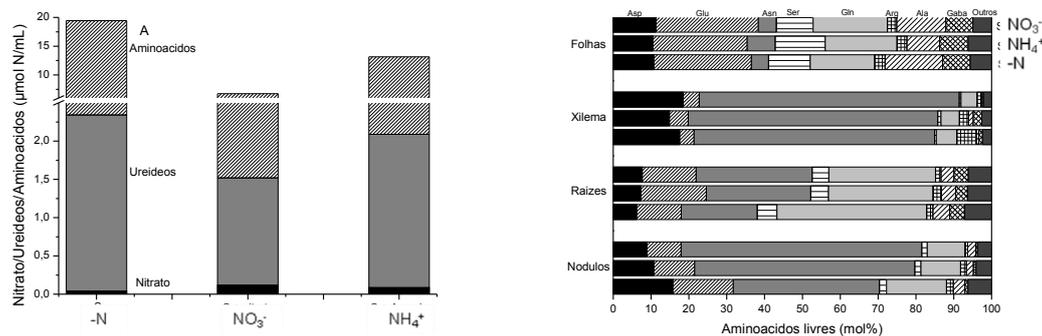


Figura 3. (A) Distribuição do conteúdo de aminoácidos, ureídeos e nitrato na seiva do xilema e (B) perfil de aminoácidos em folhas, xilema, raízes e nódulos de plantas noduladas de *Inga edulis* tratadas com solução nutritiva sem nitrogênio mineral (controle) ou contendo nitrogênio mineral (nitrato ou amônio), cultivadas em viveiro.

A composição de aminoácidos livres foi bastante similar entre os tratamentos (Figura 3B). A mais clara diferença foi observada no aumento dos teores de glutamina (Gln) em raízes e nódulos de plantas dependentes da FBN (sem N mineral). As diferenças encontradas entre os tecidos foram mais significativas do que entre os tratamentos. Asparagina (Asn) predominou nos nódulos enquanto em raízes foi predominante junto com Gln. Nas folhas, Asn representou uma pequena fração, sendo que glutamato (Glu), seguido de Gln, foi o mais abundante. De acordo com os dados do xilema, não há evidências de

que algum aminoácido esteja intimamente relacionado ao processo de fixação ou a assimilação do N mineral. *I. edulis* transporta preferencialmente asparagina para a parte aérea, como a maioria das leguminosas não-transportadoras de ureídeos (Amarante *et al.* 2006). Aidar *et al.* (2003) também verificou que, em *Inga marginata* Willd, crescendo em áreas abandonadas na região da Mata Atlântica, Asn é o principal aminoácido transportado pela seiva do xilema.

4. Conclusões

O N amoniacal não inibiu a nodulação (número de nódulos) e o crescimento dos nódulos (massa seca). Entretanto, o N nítrico suprimiu parcialmente a nodulação, embora este efeito não tenha apresentado reflexos marcantes sobre o crescimento das plantas, que eventualmente pode ter sido compensado pela FBN. O transporte de compostos nitrogenados para a parte aérea não apresentou predominância de um aminoácido em específico, havendo bastante similaridade na composição dos aminoácidos transportados nas plantas entre os tratamentos.

5. Referências

- Aidar M.P.M., Schmidt S., Moss, G., Stewart G.R., Joly C.A. 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant, Cell and Environment*, 26: 389-399.
- Amarante L., Lima J.D., Sodek, L. 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. *Environmental and experimental Botany*, 58: 123 – 129.
- Barron, A. R., Purves, D. W., Hedin, L. O. 2011. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. *Oecologia*, 165: 511 – 520.
- Bielski L.R., Turner N.A. 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, 17: 278 – 293.
- Bollman M.I., Vessey J.K. 2006. Differential Effects of Nitrate and Ammonium Supply on Nodule Initiation, Development, and Distribution on Roots of Pea (*Pisum sativum*), *Canadian Journal of Botany*, 84, 893–903.
- Camargos L. S., Sodek L. 2010. Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. *Symbiosis*, 51: 167 – 174.
- Cataldo, D. A.; Harron, M.; Schrader, L. E; Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6: 71 - 80.
- Dan T.H., Brix H. 2009. Growth responses of the perennial legume *Sesbania sesban* to NH_3 and NO_3^- nutrition and effects on root nodulation. *Aquatic Botany*, 91: 238 – 244.
- Dubois, M. et al. 1956. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:350-356.
- Evans, G. C. 1972. The quantitative analysis of plant growth. University of California Press, Berkeley.
- Finnemann, J.; Schjoerring, J.K. 1999. Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiologia Plantarum*. 105: 469-477.
- Gan Y., Stulen I., van Keulen H., Kuiper P. J. C. 2004. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N_2 fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N_2 fixation (N_2 fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean. *Plant and Soil*, 258: 281 – 292.
- Glyan'ko, A.K., Vasil'eva G.G., Mitanova N.B., Ishchenko A.A. 2009. The influence of mineral nitrogen on legume-rhizobium symbiosis. *Biology Bulletin*, 36:250–258.
- Hartwig U.A. 1998. The regulation of symbiotic N_2 fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. Perspectives in Plant ecology, *Evolution and Systematics*, 1: 92 – 120.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Bulletin*, 347.
- Hunt, R. 1982. Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, London.
- Leblanc H.A., McGraw R.L., Nygren P., Le Roux C. 2005. Neotropical legume tree *Inga edulis* forms N_2 -fixing symbiosis with fast-growing Bradyrhizobium strains. *Plant and Soil*, 275:123-133.
- McClure P.R., Israel D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology*, 64: 411 – 416.
- Puiatti M., Sodek L. 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37: 767 – 773.
- Schubert K.R., 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 539-574.
- Schulze, J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167: 127 – 135.
- Vogels G.D., Van Der Drift C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry*, 33: 143 – 157.
- Wick B., Veldkamp, E. Mello W. Z., Keller M., Crill P. 2005. Nitrous oxide fluxes and nitrogen cycling along a pasture chronosequence in Central Amazonia, Brazil. *Biogeosciences*, 2: 175 – 187.
- Yemm E.M. Coching E.C. 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Analyst*, 80: 209 – 213.