

NODULAÇÃO E TRANSPORTE DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE *Inga edulis* MART. EM RESPOSTA A DIFERENTES DOSES DE NITRATO E AMÔNIO: INVESTIGAÇÃO DO SÍTIO DE REDUÇÃO DO NITRATO

Ana Maria Silva dos SANTOS; Gilberto Costa JUSTINO; José Francisco de Carvalho GONÇALVES
Bolsista PIBIC/CNPq; Coorientador INPA/CDAM; Orientador INPA/CDAM

1.Introdução

O nitrogênio é um dos nutrientes necessários em maiores quantidades pelas plantas sendo o elemento mais limitante ao crescimento e desenvolvimento em termos de disponibilidade no solo (Helali *et al.*, 2010). Este elemento corresponde a 78% dos gases da atmosfera, no entanto, as plantas não conseguem utilizá-lo nesta forma (Oldroyd e Downie, 2008). Sob condições naturais, a capacidade de fixar o nitrogênio molecular (N_2) no solo é restrita a organismos procariontes. Estes microorganismos, coletivamente conhecidos como rizóbios, estabelecem uma relação simbiótica com algumas plantas, principalmente aquelas pertencentes à família Fabaceae, formando nódulos radiculares, possibilitando a conversão do nitrogênio da atmosfera em uma forma assimilável pelas plantas. Este processo ocorre por meio de um exclusivo mecanismo bioquímico capaz de quebrar a tripla e estável ligação covalente do N_2 reduzindo-o a amônio (NH_4^+) que é uma forma assimilável pela planta (Rogers *et al.*, 2009).

A FBN pode ser afetada quando há grande disponibilidade de nitrogênio mineral no solo, pois nestas condições as plantas passam a absorvê-lo nas formas de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+), os quais são inibidores da nodulação e da fixação biológica, afetando negativamente a aquisição de nitrogênio do ar. Contudo, o mecanismo envolvido no processo de inibição, ainda não foi completamente esclarecido (Bollman e Vessey, 2006). Por outro lado, a visão generalista de que todas as plantas respondem negativamente ao nitrogênio mineral parece não ser verdadeira, uma vez que algumas espécies arbóreas nativas não cultivadas estão apresentando respostas diferentes.

Na região Amazônica, tanto o amônio quanto o nitrato são fundamentalmente importantes para a nutrição das plantas, porém as características do uso do nitrogênio em espécies de florestas tropicais são pouco conhecidas (Aidar *et al.*, 2003). Desta forma, é importante a condução de estudos que associem o fornecimento de N mineral sem que a FBN seja afetada, com o intuito de entender e buscar um equilíbrio entre a adição e a forma de N mineral e a fixação biológica do nitrogênio molecular, bem como o melhor conhecimento biológico da espécie *Inga edulis* e seu uso ecológico destacando seu potencial de adaptação em áreas alteradas, devido sua capacidade de fixa N_2 .

Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do N mineral sobre o estabelecimento e a eficiência da FBN, a partir do transporte de compostos orgânicos nitrogenados pela seiva do xilema, bem como pelo acúmulo nas folhas, raízes e nódulos e a atividade da enzima redutase do nitrato.

2.Material e Métodos

Sementes da espécie *Inga edulis* Mart. (Mimosoideae/Fabaceae) obtidas de matrizes cultivadas na Estação Experimental de Fruticultura Tropical do INPA, em Manaus, foram germinadas em bandejas plásticas, contendo areia lavada e peneirada como substrato. As plântulas foram transferidas para sacos plásticos de 4 litros, contendo vermiculita como substrato em torno de 10 a 14 dias após a germinação, e cultivadas no viveiro da Coordenação de Dinâmica Ambiental (CDAM), sem controle de fotoperíodo e temperatura. As plântulas foram inoculadas duas vezes, sendo a primeira no dia do transplante e a segunda, após 15 dias, na altura do colo, com 5 mL de um coquetel contendo 11 bactérias isoladas a partir de nódulos obtidos de outras espécies de ingá nativas da Amazônia, estirpes presentes no banco de germoplasma de rizóbios da CDAM do INPA e, selecionadas com base na capacidade de promover a formação de nódulos em *Inga edulis* Mart.. A metodologia utilizada para preparação do inoculante foi conforme proposta por Vincent (1970).

Os tratamentos foram estabelecidos da seguinte maneira: Controle (-N): plantas não inoculadas e recebendo solução nutritiva sem N (Solução modificada de Hoagland e Arnon (1950); Controle Inoculado (-N): plantas inoculadas que receberam solução nutritiva sem N; NO_3^- 7,5 mM: plantas inoculadas que receberam solução nutritiva contendo 7,5 mM de NO_3^- ; NO_3^- 15 mM: plantas inoculadas que receberam solução nutritiva contendo 15 mM de NO_3^- ; NH_4^+ 7,5 mM: plantas inoculadas que receberam solução nutritiva contendo 7,5 mM de NH_4^+ ; NH_4^+ 15 mM: plantas inoculadas que receberam solução nutritiva contendo 15 mM de NH_4^+ . O monitoramento do crescimento foi realizado a partir de análises biométricas. As taxas de crescimento relativo em altura (TCR-a), em diâmetro (TCR-d) e o índice de ganho foliar (IGF) conforme Davanzo *et al.* (2002).

Coleta do material: A seiva do xilema foi extraída por exsudação, após corte transversal, com a utilização de capilares e, armazenada em tubos do tipo eppendorf em freezer (-20°C). Ao final do experimento (128 dias), o material vegetal foi coletado, os tecidos (folhas, raízes e nódulos) separados

em sacos plásticos e armazenados em caixa térmica contendo gelo e, imediatamente, levados ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV), onde parte do material foi destinada à obtenção da massa seca e o restante utilizado para extração dos compostos nitrogenados.

Extração dos compostos nitrogenados: A extração dos compostos nitrogenados foi realizada segundo Bielecki e Turner (1966). Para a extração, foram acrescentados a 1g de material fresco (nódulos, raízes e folhas) e triturado com nitrogênio líquido, 10 mL de solução MCW (Metanol, Clorofórmio e Água, 60:25:15, v/v/v). O material permaneceu em repouso durante 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 1 mL de Clorofórmio e 1,5 mL de H₂O para cada 4 mL de sobrenadante. A fase hidrossolúvel permaneceu por 18 horas em banho-maria a 38 °C para concentração das amostras. Ao final, o volume do extrato foi aferido e armazenado em freezer -20°C para análises posteriores dos compostos nitrogenados (aminoácidos, ureídeos e nitrato).

Análise quantitativa de aminoácidos: os aminoácidos solúveis totais presentes na seiva e nos diferentes tecidos das plantas foram determinados conforme Yemm e Cocking (1955). Foram pipetados 30 µL de seiva e das amostras extraídas por MCW de folhas, raízes e nódulos em tubos de ensaio e posteriormente adicionados 0,5 mL do tampão citrato, 0,2 mL de ninhidrina, 1 mL KCN e 1 mL de solução de álcool etílico 60%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a $\lambda = 570$ nm. O aminoácido leucina foi utilizado como padrão de quantificação.

Análise quantitativa de ureídeos: A quantificação dos ureídeos da seiva do xilema e dos diferentes tecidos das plantas seguiu a metodologia de Vogels e Van Der Drift (1970), utilizando a alantoína como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda = 535$ nm.

Análise quantitativa de nitrato: As variações na concentração de nitrato foram determinadas conforme recomendação de Cataldo *et al.* (1975). Foram pipetados em tubos de ensaio 50 µL de seiva e das amostras de folhas, raízes e nódulos. Em seguida foi adicionado 0,2 mL de ácido salicílico a 5% e deixadas em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foram acrescentados 4,75 mL de NaOH (2N), e deixado em repouso durante uma hora. Posteriormente, as absorbâncias foram acompanhadas em espectrofotômetro a $\lambda = 410$ nm. O nitrato foi utilizado como padrão de quantificação.

Análise quantitativa de nitrito: a ação da enzima redutase do nitrato foi analisada pela quantificação do nitrito em folhas e raízes, seguindo a metodologia proposta por Hageman *et al.* (1980). Em tubos de ensaio foram pipetados 1 mL das amostras de folhas e raízes, em seguida foram adicionados 1 mL de água e sulfanilamida, permanecendo em repouso por 15 minutos. Após esse período foi adicionado 1 mL de N-(Naftil)-Etilenoamidina. Após 30 minutos de reação as absorbâncias foram acompanhadas em espectrofotômetro a $\lambda = 540$ nm. O nitrito foi utilizado como padrão.

Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC): Os aminoácidos solúveis foram separados e analisados por HPLC em coluna de fase reversa como seus derivados OPA (β -mercaptoetanol), de acordo com o método descrito por Jarret *et al.* (1986).

Delineamento experimental: O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos (Controle (-N); Controle inoculado (-N); NO₃⁻ 7,5 mM; NO₃⁻ 15 mM; NH₄⁺ 7,5 mM; NH₄⁺ 15 mM) em 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 7.0 para Windows.

3. Resultados e Discussão

O NH₄⁺ proporcionou os melhores resultados de crescimento em altura e diâmetro em relação ao NO₃⁻. No que diz respeito ao índice de ganho foliar, plantas recebendo NH₄⁺ (15 mM) e NO₃⁻ (15 mM) apresentaram maiores porcentagens. Em relação à razão raiz/parte aérea (R/PA) nota-se que mesmo as plantas inoculadas e tratadas com NH₄⁺ e NO₃⁻ tenham proporcionado maior acúmulo de biomassa radicular, o tratamento controle (-N) foi o que promoveu maior incremento da massa seca das raízes em relação às folhas, levando a uma maior razão raiz/parte aérea (R/PA). Estes resultados reforçam a idéia de que esta planta cresce melhor na presença de NH₄⁺ como fonte de N, consistente com a importância deste nutriente nos solos da Amazônia (Wick *et al.*, 2005), ambiente natural da espécie aqui estudada. Resposta eficiente do N mineral também foi observada no acúmulo e na distribuição de biomassa de plantas noduladas de *I. edulis* (Figura 1A). A adição de N promoveu o aumento de biomassa das plantas em relação às plantas que receberam solução nutritiva sem N, porém, a massa seca total das plantas foi significativamente menor com NO₃⁻ (7,5 e 15 mM) quando comparada a plantas tratadas com NH₄⁺ (15 mM). O fornecimento de NH₄⁺ na concentração de 15 mM resultou no maior incremento de biomassa total e em todos os componentes das plantas, ao passo que o Controle (-N) foi o que obteve as menores respostas.

O incremento de biomassa total nos demais tratamentos apresentou pouca variação, bem como para biomassa de folhas, caule e raízes. No geral, entre os componentes da planta, ocorreu maior investimento de biomassa nas raízes e folhas, sendo que este último pode ter proporcionado aumento das taxas fotossintéticas, explicando, em parte, o incremento dos teores de massa seca. Dessa forma, o

incremento de massa seca total das plantas neste experimento ocorreu, principalmente, devido ao incremento de massa seca da parte aérea.

Plantas de *Calopogonium mucunoides* recebendo NH_4^+ e NO_3^- na concentração de 15 mM apresentaram maior acúmulo de biomassa de folhas, raízes e nódulos quando tratadas com amônio (Camargos e Sodek, 2010). Contudo, para espécie *Canna indica* não houve diferença significativa no acúmulo de biomassa total das plantas com o fornecimento das mesmas fontes de nitrogênio na concentração de 0,5 mM (Dan e Brix, 2009).

Em relação à nodulação, todas as plantas de *I. edulis* cultivadas nodularam após a inoculação, tendo melhor desempenho as plantas tratadas com NH_4^+ (15 mM) possibilitando maior investimento na biomassa dos nódulos, diferente do NO_3^- (7,5 e 15 mM) que afetou negativamente a nodulação, corroborando dados encontrados na literatura (Omena-Garcia *et al.*, 2011). B

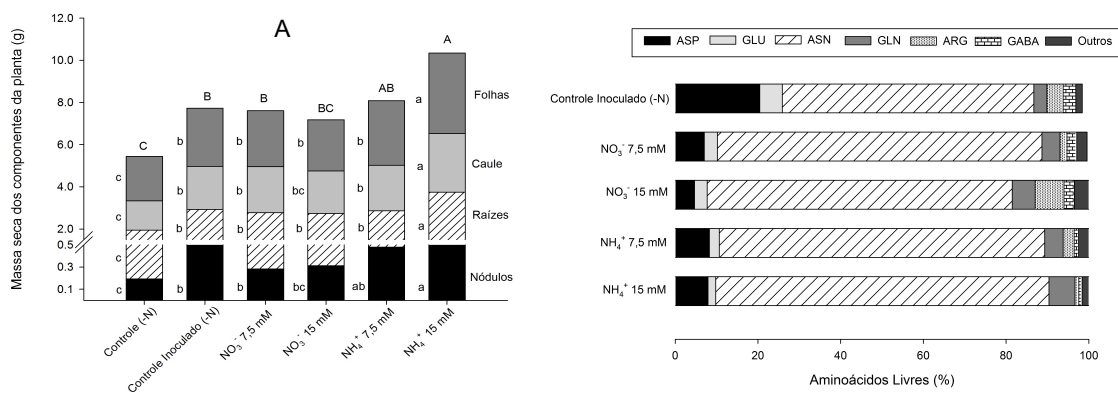


Figura 1. Massa seca total e dos componentes (A) e perfil dos aminoácidos da seiva do xilema (B) de plantas jovens de *Inga edulis* Mart. não noduladas e noduladas recebendo solução nutritiva sem N mineral (-N), contendo 7,5 e 15 mM de nitrato (NO_3^-) e 7,5 e 15 mM de amônio (NH_4^+). Letras minúsculas distintas na horizontal indicam valores significativamente diferentes entre os tratamentos para a massa seca dos respectivos componentes da planta; letras maiúsculas distintas indicam valores significativamente diferentes entre tratamentos para a massa seca total (*Tukey* $p < 0,05$).

Ocorreu alteração nos teores de aminoácidos foliares, sendo as maiores concentrações em plantas que receberam NH_4^+ e NO_3^- , no entanto, não foi observado incremento nos teores de aminoácidos em raízes na presença de fonte externa de N mineral. Em nódulos, os maiores teores foram encontrados no tratamento Controle (-N). Na seiva observou-se mais transporte de aminoácidos em plantas que receberam NH_4^+ nas duas concentrações, para os demais tratamentos não houve aumento significativo. Diferente dos resultados obtidos por Amarante *et al.*, (2006), em todas as seis espécies estudadas os níveis de N transportado na forma de aminoácidos não diferiram entre as plantas simbióticas e não simbióticas. Camargos e Sodek (2010), diferentemente, não verificaram aumentos nos teores de aminoácidos, mas sim de outros compostos nitrogenados nos tecidos de *C. mucunoides* quando as plantas foram tratadas com N mineral.

Os teores de ureídeos foram superiores em folhas e nódulos, principalmente em plantas não inoculadas e que não receberam nenhuma fonte de nitrogênio, sendo observada também uma redução dos teores de ureídeos em plantas que receberam NH_4^+ (7,5 e 15 mM). Nas raízes as maiores concentrações foram verificadas em plantas que receberam NO_3^- (7,5 e 15 mM). O transporte de ureídeos pela seiva, apesar de ter sido em pouca quantidade, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

Foi verificada a presença de nitrato em todos os componentes da planta, principalmente nas raízes de plantas onde houve o fornecimento de NO_3^- nas duas concentrações (7,5 e 15 mM), obtendo-se os valores 129,4 e 216,4 $\mu\text{g/g}$ respectivamente, superiores aos demais tratamentos que tiveram valores inferiores. A presença de altos teores de NO_3^- em folhas de plantas que receberam NO_3^- (7,5 e 15 mM) em solução pode ser associada aos teores de atividade da enzima nitrato redutase (NR), que, em folhas, apresentou atividade um pouco maior. Entretanto, nas raízes, apesar da alta concentração de NO_3^- a atividade da enzima foi reduzida com exceção do tratamento NO_3^- 15 mM.

Assimilação de NO_3^- pode ocorrer tanto em raízes quanto na parte aérea das plantas (Munzarova *et al.*, 2006), e por causa da vantagem de reduzir a um baixo custo energético NO_3^- em tecidos fotossintéticos, tem sido sugerido que as folhas podem ser o principal órgão para redução do NO_3^- . Além disso, NO_3^- por ser um íon que não apresenta efeitos tóxicos as planta é transportado com facilidade a partir das raízes para as folhas através do xilema.

De acordo com os dados da figura 1B fica nítido que os aminoácidos importantes formas de transporte de N em *I. edulis*, independente da forma N fornecida. Dentre os aminoácidos transportados, destaca-se a asparagina (ASN) em todos os tratamentos. De acordo como (Amarante *et al.*, 2006) *I. edulis* transporta preferencialmente ASN para a parte aérea, como a maioria das leguminosas não-transportadoras de ureídeos. Os teores de glutamato (GLU) no geral foram muito baixos, destacando-se apenas em plantas inoculadas (-N), sofrendo uma redução maior em resposta ao amônio. Os teores de aminoácido glutamina (GLN) no entanto, foram superiores em plantas recebendo NO_3^- e NH_4^+ na concentração de 15 mM. Bacanamwo e Harper (1997) reportaram que o acúmulo de ASP na parte aérea está envolvido na regulação e controle da atividade de nitrogenase por feedback. O aumento de ASP está sempre relacionado à redução em GLN e ureídeos, como resposta à exposição ao NO_3^- , o que é correlacionado com a inibição da N-fixação, o que foi observado pra esta espécie.

4. Conclusão

As diferentes fontes de nitrogênio (N_2 , NO_3^- ou NH_4^+) influenciaram nos parâmetros de crescimento, no acúmulo de biomassa, e o estabelecimento e crescimento dos nódulos em plantas de *I. edulis*. A combinação da FBN com o NH_4^+ foi o melhor tratamento. A ação da enzima redutase do NO_3^- foi superior em folhas, onde também foram observadas as maiores concentrações de nitrato e aminoácidos. Dentre os aminoácidos encontrados na seiva do xilema houve uma predominância da ASN.

5. Referências Bibliográficas

- 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.
- Bacanamwo, M.; Harper, J.E., 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. *Physiology Plant*, 100: 371-377.
- Bieleski, 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.
- Davanzo, V.M.; Souza, L.A.; Medri, M.E.; Pimenta, J.A.; Bianchini, E. 2002. Photosynthesis, growth and development of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. (Bignoniaceae) in flooded soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45: 375-384.
- Hageman, R.H.; Reede, A.J. 1980. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymol.* 69: 270 – 280.
- Helali, S.M.; Nebli, H.; Kaddour, R.; Mahmoudi, H.; Lachaâl, M.; Oureghi, Z. 2010. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, 74: 336-365.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. University of California Agricultural Experimental Station, Berkeley, USA. 347 pp.
- Jarret, H.W.; Cooksy, K.D.; Willist, T.; Anderson, J.M., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica column. *Analytical Chemistry*, 153:189-198.
- Munzarova, E.; Lorenzen, B.; Brix, H.; Vojtkiskova, L.; Votrubova, O. 2006. Effect of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ availability on nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in wetland helophytes *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Environmental and Experimental Botany*, 55: 49–60.
- Rogers, A.; Ainsworth, E.A.; Leakey, A.D.B. 2009. Will elevated carbon dioxide concentration amplify the benefits of nitrogen fixation in legumes? *Plant Physiology*, 151: 1009 – 1016.
- Schulze, J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167: 127 – 135.
- Oldroyd, G.; Downie, J.M. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 519–546.
- Omena-Garcia, R.P.; Justino, G.C.; Soodek, L.; Gonçalves, J.F.C. 2011. Mineral nitrogen affects nodulation and amino acid xylem transport in the Amazonian legume *Inga edulis* Mart. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3: 3-6.
- Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell.

- Vogels G.D.; Van Der Drift C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivates. *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. *Analytical Biochemistry*, 80: 209 – 213.