

CRESCIMENTO E COMPOSTOS NITROGENADOS DE PLANTAS JOVENS NODULADAS DE *Inga macrophylla* BENTH. FERTILIZADAS COM DIFERENTES FORMAS DE NITROGÊNIO

Jussara de Souza LOPES¹

José Francisco de Carvalho GONÇALVES²

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador INPA/CDAM

INTRODUÇÃO

As florestas tropicais possuem grande diversidade de espécies da família Fabaceae. Algumas dessas espécies contribuem para a riqueza de nitrogênio em solos de florestas tropicais mediante a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico (N₂) (Batterman *et al.* 2013). Contudo, estudos têm demonstrado que espécies fixadoras de nitrogênio são capazes de alterar suas taxas de fixação mediante a disponibilidade de nitrogênio (N) mineral no solo, N que pode ser encontrado, principalmente, na forma de nitrato (NO₃⁻) e de amônio (NH₄⁺). Em alguns casos, a planta deixa de fazer simbiose e utiliza as formas de nitrogênio presentes no solo, ocorrendo redução da nodulação e da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Batterman *et al.* 2013). Mas, algumas evidências têm demonstrado que certas espécies podem apresentar respostas favoráveis da FBN (ex: aumento da massa e do número de nódulos) frente à disponibilidade das formas minerais de nitrogênio, dependendo da forma e da concentração de N mineral presente no substrato de crescimento (Omena-Garcia *et al.* 2011). Plantas inoculadas podem também exibir maiores taxas de crescimento e ganho de biomassa do que as plantas que dependem apenas da FBN (Omena-Garcia *et al.* 2015).

Informações que relacionam o efeito da nutrição mineral e a sua relação com a FBN são necessárias para melhor compreensão do uso do nitrogênio e, por conseguinte, o crescimento e ganho de biomassa em leguminosas de interesse econômico e ecológico na Amazônia, em particular, devido ao expressivo número de espécies arbóreas da família Fabaceae. Dentre essas espécies, destaca-se *Inga macrophylla*, que apresenta elevada capacidade de nodulação (Souza 2012).

Este trabalho teve como objetivo investigar as respostas de crescimento e as possíveis alterações de compostos transportados via xilema em plantas jovens noduladas de *Inga macrophylla* Benth. cultivadas com diferentes formas de nitrogênio mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em regime de casa de vegetação e as análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV), campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Sementes da espécie *Inga macrophylla* Benth. foram germinadas em bandejas plásticas, contendo areia como substrato. Após 60 dias do início da germinação, as mudas foram transferidas para sacos de polietileno de 5 kg contendo areia e submetidas à aclimação na casa e vegetação do LFBV. Posteriormente, foram transferidas para sacos de polietileno de 5 kg contendo vermiculita como substrato. Para efeito de instalação de experimento, as mudas foram padronizadas de acordo com a uniformidade de altura, número de folhas e estado fitossanitário. Com a padronização, as mudas foram inoculadas com coquetel contendo 7 estirpes de bactérias, adquiridas do banco de germoplasma de rizóbios do INPA, que foram isoladas a partir de nódulos obtidos de outras espécies do gênero *Inga* nativas da Amazônia e selecionadas com base na capacidade de promover a formação de nódulos. A preparação do inoculante seguiu a metodologia descrita por Vincent (1970).

Os tratamentos foram estabelecidos em número de quatro e descritos da seguinte maneira: **T1- Controle (-N)**: Plantas não inoculadas que receberam solução nutritiva sem adição de nitrogênio; **T2- Controle Inoculado (-N)**: Plantas inoculadas que receberam solução nutritiva sem adição de nitrogênio; **T3- NO₃⁻ (5 mM)**: Plantas inoculadas que receberam solução nutritiva com 5 mM de nitrato; **T4- NH₄⁺ (5 mM)**: Plantas inoculadas que receberam solução nutritiva com 5 mM de amônio.

Durante todo o período experimental as plantas receberam duas vezes por semana 100 mL de solução nutritiva que compreendia macro e micronutrientes, solução modificada de Hoagland e Arnon (1950).

Massa seca: No fim do experimento as plantas foram seccionadas em folhas, caule, raízes e nódulos que foram armazenados em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa a (65 °C) por um período de 72 h para posterior pesagem.

Extração de compostos nitrogenados: A extração dos compostos nitrogenados foi realizada segundo a metodologia descrita por Bielecki e Turner (1966). Para a extração, 1 g de material fresco (folhas, raízes e nódulos) foi macerado em nitrogênio líquido e acrescentado 10 mL de solução MCA (Metanol, Clorofórmio e Água, 60:25:15 v/v/v). O material permaneceu em repouso durante 24 horas. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de H₂O para cada 4 mL de sobrenadante. Após 24 horas, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi coletado. Posteriormente, o sobrenadante permaneceu durante 18 horas em banho-maria à 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 (ureídeos, nitrato e amônio).

Análise quantitativa de ureídeos: A quantificação dos ureídeos (alantoína e ácido alantóico) 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. Na quantificação dos ureídeos foram utilizados 100 µL de seiva, 50 µL do extrato de folhas e 30 µL das amostras de raízes e nódulos extraídas em MCA. Para ocorrer a primeira reação, hidrólise da alantoína em ácido alantóico, foram pipetados nos tubos de ensaio as amostras, água destilada para completar o volume em 750 µL, 250 µL de NaOH e 20 µL de fenilhidrazina e, posteriormente, foram aquecidos à 100 °C durante oito minutos e resfriados à temperatura ambiente.

A segunda reação, hidrólise do ácido alantóico em glicoxalato, ocorreu a partir da adição de 250 µL de HCl (0,65 N) e em seguida foram aquecidos à 100 °C durante quatro minutos. Após resfriamento, foram adicionados 250 µL do tampão fosfato e 250 µL de fenilhidrazina, permanecendo em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente e durante cinco minutos imersos em gelo. Por último, foi adicionado 1,25 mL de HCl concentrado e 250 µL de ferricianeto. Após repouso de 15 minutos as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda = 535$ nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro., Armesham Biosciences).

Análise quantitativa de nitrato: Em 50 µL de seiva e das amostras de folhas, raízes e nódulos, extraídas em MCA foram adicionados 0,2 mL de ácido salicílico (5%) e deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foram acrescentados 4,75 mL de NaOH (2 N), e deixado em repouso durante uma hora. As absorbâncias foram acompanhadas em espectrofotômetro a $\lambda = 410$ nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro., Armesham Biosciences). O nitrato de potássio foi utilizado como padrão (Cataldo *et al.* 1975).

Análise quantitativa de amônio: Em 200 µL das amostras de seiva, folhas, raízes e nódulos foram adicionados 2 mL da solução de fenol nitroprussiato de sódio e, posteriormente, 2 mL da solução de NaOH contendo fosfato de sódio e hipoclorito de sódio. Em seguida, os tubos foram incubados à 37 °C durante 35 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, as absorbâncias foram acompanhadas em espectrofotômetro a $\lambda = 625$ nm (Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro., Armesham Biosciences). O sulfato de amônio foi utilizado como padrão (McCullough 1967).

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 (orto-ftaldealdeído), de acordo com o método descrito por Jarret *et al.* (1986).

Delineamento experimental: O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quinze repetições (n=60). Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Lilliefors e homocedasticidade de Levene. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (Anova One Way) e ao teste de comparação de médias de Duncan ($p < 0,05$). O programa estatístico utilizado foi o Statistica 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acúmulo de massa seca total, caulinar e radicular foi influenciado positivamente pela fertilização nitrogenada (Figura 1). Plantas do tratamento I+NH₄⁺ apresentaram acúmulo de massa seca total e foliar cerca de 103 e 127% maior em relação as plantas dos tratamentos C (-N) e I (-N), respectivamente e a fertilização com NO₃⁻ favoreceu o acúmulo de massa seca dos nódulos.

O ingresso adicional de N na forma mineral resultou em diferentes estratégias no uso do N nas plantas de *I. macrophylla* no que diz respeito as repostas de crescimento. Apesar dos melhores resultados de crescimento terem sido em plantas fertilizadas com NH₄⁺, as plantas responderam bem ao fornecimento de NO₃⁻. Neste sentido, a espécie tem a capacidade de usar o N mineral nas duas formas sugerindo boa plasticidade mediante as diferentes condições ambientais. Enquanto que o crescimento de plantas dependentes apenas da FBN foi limitado em relação às plantas fertilizadas com N mineral.

A espécie *Lonchocarpus muehlbergianus* não apresentou diferenças quanto ao acúmulo de massa seca entre plantas somente inoculadas e as inoculadas recebendo nitrato em duas concentrações (7,5 e 22,5 mM) (Moreira *et al.* 2014). Parte deste resultado pode estar relacionada à resposta da espécie e às concentrações fornecidas, uma vez que altas concentrações podem inibir a fixação biológica de N. Contudo, nesta pesquisa, a concentração fornecida não foi prejudicial para o crescimento e acúmulo de massa seca das plantas, indicando que esta concentração não causou efeitos adversos nas plantas.

Muitas espécies de plantas têm exibido maior acúmulo de biomassa quando fertilizadas com alguma forma de N mineral, no entanto, as razões que levam a preferência por uma das formas ainda não são completamente conhecidas. Assim, a preferência por determinada forma de N mineral pode estar relacionada à outros fatores como a melhor adaptação de algumas espécies em solos com altos teores de NH₄⁺, o custo energético, a concentração de cada nutriente no solo e a classe sucessional, uma vez que espécies pioneiras, de crescimento rápido, preferem NO₃⁻ em vez de NH₄⁺ (Helali *et al.* 2010).

Referente aos teores de compostos nitrogenados nas diferentes parte das plantas, não houve diferença dos teores de NH₄⁺ entre os tratamentos nas folhas, raízes e nódulos, no entanto, verificou-se maior acúmulo de NH₄⁺ em relação ao NO₃⁻. Nas folhas, os maiores teores de ureídeos foram observados no tratamento C (-N), enquanto que nos nódulos nos tratamentos C (-N) e I (-N).

As diferentes quantidades de compostos nitrogenados nas espécies vegetais são decorrentes da atividade de enzimas na redução e assimilação nos diferentes tecidos das plantas que podem ser influenciadas pelas condições ambientais, a necessidade do uso dos nutrientes, uma vez que o NO₃⁻ e os ureídeos podem ser estocados nas plantas antes de serem reduzidos a outras formas. No caso do NH₄⁺, a toxicidade pode ser um fator que induz a rápida assimilação pelas plantas (Camargos e Sodek 2010; Tegeder 2014).

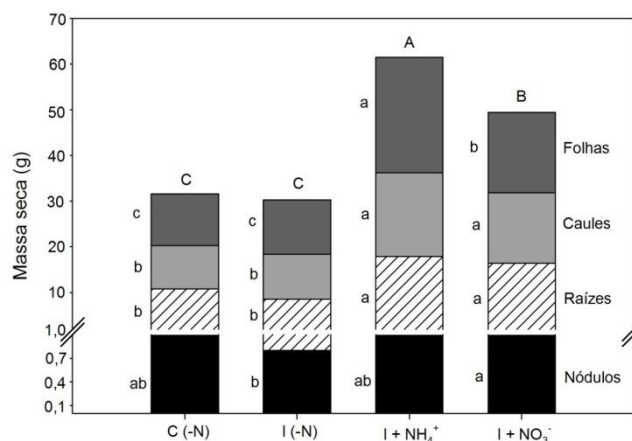


Figura 1. Acúmulo de massa seca total, foliar, caulinar, radicular e de nódulos de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-). Letras minúsculas e maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \geq 0,05$) ($n=15$).

Na espécie *I. macrophylla*, foi verificado baixos teores de NO_3^- em todos os tratamentos quando comparado aos teores de NH_4^+ e ureídeos, o que pode estar relacionado à rápida redução do NO_3^- a NO_2^- e posteriormente a NH_4^+ , o que justifica os elevados teores de NH_4^+ ou ainda por ser resultado da fixação do N_2 . Diferente dos resultados obtidos por *I. macrophylla*, plantas da espécie *Inga edulis* fertilizadas com NO_3^- ou NH_4^+ (5 mM), os teores de NO_3^- foram dez vezes superiores ao encontrado para *I. macrophylla* nos diferentes tecidos das plantas, ao passo que o NH_4^+ foi rapidamente assimilado, não sendo detectado em folhas, raízes e nódulos. Quanto aos teores de ureídeos, os valores encontrados para *I. edulis* foram bastante reduzidos em comparação a *I. macrophylla*, prevalecendo os maiores teores de aminoácidos (Omena-Garcia *et al.* 2015).

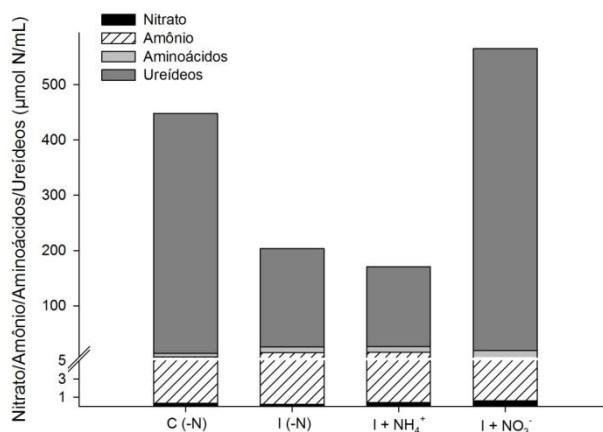


Figura 2. Distribuição do conteúdo de nitrato, ureídeos, amônio e aminoácidos na seiva do xilema de plantas jovens noduladas e não noduladas de *Inga macrophylla* recebendo solução nutritiva sem nitrogênio mineral (-N) e contendo 5 mM de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-).

A verificação de alterações no padrão de compostos nitrogenados translocados via xilema é uma maneira de avaliar a atividade assimilatória do nódulo, pois a translocação de ureídeos via xilema, compostos diretamente associados com a fixação do N_2 , está intimamente relacionada com a taxa de fixação como demonstrado em outros trabalhos (Amarante *et al.* 2006; Camargos e Sodek 2010). Nesta pesquisa, verificou-se que os ureídeos são a principal forma de transporte de nitrogênio pela seiva do xilema em *I. macrophylla* independente da forma de N fornecida (Figura

2). Desta forma, *I. macrophylla* se enquadra no grupo de leguminosas transportadora de ureídeos, assim como a soja e espécies pertencentes a tribo Phaseoleae (McClure e Israel 1979; King e Purcell 2005). Em contrapartida, a espécie *Inga edulis*, mesmo a nodulação e a massa seca dos nódulos terem sido estimuladas pela fertilização com NH_4^+ (5 mM), os aminoácidos foram a forma predominante na seiva (Omena-Garcia *et al.* 2011).

O transporte das formas de ureídeos é vantajoso para as plantas, uma vez que para cada carbono da constituição dos ureídeos, um N é transportado, o que não ocorre com os aminoácidos comumente transportados pela seiva do xilema de leguminosas, como glutamina e asparagina e suas aminas glutamato e aspartato (Amarante *et al.* 2006). Adicionalmente, os ureídeos são usados como uma forma de estocar N, e utilizados mediante a demanda de N exigida para diferentes processos nas plantas (Tegeder 2014).

Em síntese dos resultados apresentados, a FBN da espécie *I. macrophylla* não foi afetada pelas formas de N mineral fato comprovado pela presença pronunciada dos ureídeos em todas as partes das plantas e por ser o composto majoritário na seiva do xilema, diferindo da maior parte das espécies que demonstram sensibilidade mediante a disponibilidade de N mineral no solo. O comportamento de *I. macrophylla* assemelha-se de um pequeno grupo de espécies tropicais que conseguem utilizar diferentes formas de N.

CONCLUSÃO

Plantas de *I. macrophylla* respondem mais efetivamente a combinação inoculação com NH_4^+ quanto aos parâmetros de crescimento, acúmulo de massa seca, decorrente da maior assimilação de carbono nessa condição. Independente da forma de nitrogênio utilizada, os ureídeos representaram a forma predominante de transporte de nitrogênio via xilema, indicando a capacidade da espécie *I. macrophylla* de utilizar tanto o N mineral (NH_4^+) quanto o proveniente da fixação biológica do nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Batterman, S.A.; Wurzbarger, N.; Hedin, L. O. 2013. Nitrogen and phosphorus interact to control tropical symbiotic N_2 fixation: a test in *Inga punctate*. *Journal of Ecology*, 6: 1400–1408.
- Bielecki, L.R.; Turner, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, 17: 278-293.
- 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.
- 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. 1950. The water culture method for growing plants without soil. University of California Agricultural Experimental Station, Berkeley, USA. 347p.
- Jarret, H.W.; Cooksy, K.D.; Willist, T.; Anderson, J.M., 1986. The separation of o-phtalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica column. *Analytical Chemistry*, 153: 189-198.
- King, C.A.; Purcell, L.C., 2005. Inhibition of N_2 fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology*, 137: 1389-1396.
- McClure P.R.; Israel D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology*, 64: 411-416.

- McCullough, H. 1967. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 17: 297-304.
- Moreira, V.; Justino, G.C.; Camargos, L.S.; Aguiar, L.F. 2014. Características adaptativas da associação simbiótica e da fixação biológica do nitrogênio molecular em plantas jovens de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl., uma leguminosa arbórea nativa do Cerrado. *Rodriguésia*, 65: 517-525.
- 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.
- Omena-Garcia, R.P.; Justino, G.C.; Araújo, V.B.F.; Souza, L.A.G.; Camargos, L.S.; Gonçalves, J.F.C. 2015. Mineral of nitrogen associated changes in growth and xylem-N compounds in Amazonia legume tree. *Journal of Plant Nutrition*, 4: 584-595.
- Souza, L.A.G. 2012. Guia da biodiversidade de Fabaceae do Alto Rio Negro. Elaboração Projeto Fronteiras: Alto Rio Negro – Manaus. 116p.
- 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 derivatives. *Analytical Biochemistry*, 33: 143-157.
- Tegeder, M. Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1865-1878.