



EFEITO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO INICIAL DE *ANADENANTHERA FALCATA* (BENTH.) SPEG. (LEGUMINOSAE - MIMOSOIDEAE)

F. L. de Macedo¹

J.G. Silva¹; M. P. M. Aidar¹

1.Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Avenida Miguel Stéfano, 3687, 01061 - 970, São Paulo, Brasil e - mail: fernandalmacedo@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos principais bioelementos, essencial para a estrutura e função de proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, e muitas outras moléculas vegetais (Werner & Schmidt 2002). Desta forma ele é considerado um dos maiores fatores limitantes que influencia na dinâmica, biodiversidade e funcionamento de muitos ecossistemas (Vitousek *et al.*, 1997). Na Biosfera o N está disponível para as plantas em diferentes formas: N molecular N², óxidos de N (NH₃, NO_x), N mineral (NH₄⁺, NO₃⁻) e N orgânico (aminoácidos e peptídeos) (Wirén *et al.*, 1997). Embora quase 80% da atmosfera seja composta de N₂, ele não pode ser utilizado diretamente pelas plantas (Crews 1999). Somente um limitado número de bactérias e Archaea desenvolveram a capacidade de converter N₂ em N reativo (Galloway *et al.*, 2004). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos processos biológicos mais importantes da Terra (Graham 2008) e a mais significativa rota para introdução do N da atmosfera. Um dos mais importantes locais de ocorrência da FBN é em nódulos formados em raízes de leguminosas como resultado da simbiose entre a planta hospedeira e bactérias do gênero *Rhizobium* (Vitousek *et al.*, 1997).

A principal fonte de N em ecossistemas savânicos provém da FBN, pois normalmente os solos são pobres e lixiviados e as formas de N inorgânicas e orgânicas estão pouco disponíveis (Schmidt & Lamblea, 2005). Diversos estudos envolvendo a FBN vêm sendo realizados com espécies economicamente importantes em solos de cerrado, como a soja, amendoim, alfafa e espécies forrageiras, no sentido de maximizar a eficiência do uso de N em sistemas agrícolas (Bredemeier e Mundstock, 2000). Porém são poucos os estudos encontrados com espécies nativas. Há falta de informações precisas sobre a nodulação em leguminosas arbóreas tropicais, independentemente da formação vegetacional onde são encontradas (Cordeiro, 2002). As leguminosas possuem o mecanismo simbiótico mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas superiores com bactérias fixadoras de N₂ (Döbereiner, 1990), característica que con-

fere a família leguminosae extrema importância, não só na estrutura da vegetação dos cerrados, como também na de florestas e matas, sendo a preservação desta fundamental para a dinâmica populacional destas comunidades (Fidelis & Godoy, 2003). Alguns estudos vêm sendo realizados com espécies nativas do cerrado e entre eles é possível encontrar trabalhos sobre o desenvolvimento de nódulos em raízes de leguminosas como a espécie *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae-Mimosoideae). O angico do cerrado, como é popularmente conhecido, é uma espécie de ampla dispersão no cerrado brasileiro, que apresenta nodulação em suas raízes (Cordeiro & Beltrati, 1989). Estudos florísticos - fitossociológicos mostram que a família Leguminosae, especialmente a espécie *A. falcata* é dominante na gleba Pé - de - Gigante, Parque Estadual do Vassununga, Santa Rita do Passa Quatro, SP, com 1212,92 ha e altitude de 590 - 740m. Esta área é um dos maiores remanescentes do cerrado no estado de São Paulo (Fidelis & Godoy, 2003). Este bioma ocupa mais de 2 milhões de Km² no país possuindo a “mais rica flora entre as savanas do mundo, com alto grau de endemismo” (Klink e Machado, 2005). O Cerrado apresenta uma “ampla extensão e heterogeneidade de ecossistemas, abrigando uma enorme biodiversidade, que representa em torno de 5% da biodiversidade do Planeta.

Do ponto de vista ecológico a FBN é considerada um processo de adaptação a situações de desequilíbrio, sendo que as espécies de leguminosas típicas do cerrado podem desempenhar papel preponderante no restabelecimento desse ecossistema, especialmente no Estado de São Paulo, onde poucas áreas com esse tipo de vegetação ainda estão preservadas (Cordeiro, 2002). Além disso, a diversidade nas estratégias de uso do N tem sido interpretada como característica crucial para a manutenção da diversidade em ambientes com stress nutricional e hídrico como no cerrado (Bustamante *et al.*, 2004), e o seu estudo torna - se ainda mais necessário pelo fato deste bioma ser considerado um dos 34 pontos com prioridade de conservação do planeta-os chamados Hotspots-(Myers *et al.*, 2000).

As razões para a falta de informações precisas sobre a

nodulação em leguminosas arbóreas tropicais, independentemente da formação vegetacional onde são encontradas, incluem desde as dificuldades de localização de nódulos em espécimes adultos até a aparente falta de nódulos em florestas em equilíbrio (Cordeiro, 2002). No cerrado a presença de espécies da família das leguminosas é notável, entretanto pouco é conhecido sobre seu potencial de fixação simbiótica, apesar de a capacidade de fixar N biologicamente nos trópicos ser considerável. É urgente a obtenção de mais informação sobre a relação entre o suprimento de N, associações microbianas, mecanismos fisiológicos e ecológicos que regulam o crescimento da planta e a composição de espécies das comunidades vegetais, sendo o armazenamento, a capacidade de assimilação e o transporte consideradas características fundamentais para um melhor entendimento dos processos de utilização de N em plantas. Este conhecimento deverá auxiliar também na maior compreensão sobre a funcionalidade do ciclo de N no ecossistema em estudo, já que segundo Phoenix *et al.*, (2006) o aumento na deposição atmosférica de N pode reduzir a diversidade de plantas em ecossistemas naturais e semi-naturais, e isto pode ser extremamente desastroso principalmente em áreas de "Hotspots", tal como o cerrado.

OBJETIVOS

Avaliar o desenvolvimento inicial de plântulas *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae-Mimosoideae) sujeitas a diferentes fontes de N, incluindo a fixação biológica de nitrogênio, crescidas em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae-Mimosoideae) foram coletadas na Gleba Pé de Gigante (Parque Estadual do Vassununga) em agosto de 2008. As sementes foram retiradas dos frutos manualmente, imersas em solução de hipoclorito de sódio 5 % durante 5 minutos e então lavadas em água corrente abundantemente. A germinação foi realizada em bandejas com vermiculita, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas em câmaras de germinação do tipo B.O.D. Plântulas com protusão da radícula maior que 1 cm foram transferidas para vasos contendo apenas vermiculita e mantidas em casa de vegetação, sendo regadas diariamente. Ao atingirem 60 dias, as plântulas foram inoculadas com estirpes de *Rhizobium* sp IBRC - 101 provenientes do Banco de Rizóbios da Unesp de Rio Claro, cedidas pela Dra. Marlene Schiavinato, do Departamento de Fisiologia, Universidade Estadual de Campinas. A inoculação consistiu em adicionar - se 1 mL do meio de cultura líquido contendo rizóbios no substrato em volta de cada planta. Após 7 dias foi realizada uma nova inoculação. Após 15 dias da inoculação as plântulas foram divididas nos seguintes tratamentos, cada um com N=100: a) plântulas sem inoculação com fonte de N na solução nutritiva (Sem Nod); b) plântulas inoculadas com adição de N na solução nutritiva (Nod +N); c) plântulas inoculadas sem adição de N na solução nutritiva (Nod -N). A forma de N adicionada a solução nu-

tritiva foi o amônio (sulfato de amônio) estabelecido com base nos resultados obtidos por Macedo *et al.*, (2006) que demonstraram que a espécie se desenvolve melhor quando nutrida com N inorgânico na forma de amônio. A solução nutritiva fornecida às plântulas foi utilizada com base na solução usada por Camargos (2007): KH₂PO₄ (6 mM); CaSO₄.2H₂O (2 mM); MgSO₄.7H₂O (2mM); H₃BO₃ (0,46 mM); MnCl₂.4H₂O (0,091 mM); ZnSO₄.7H₂O (7,65 mM); CuSO₄.5H₂O (3,20 mM); H₂MoO₄ (0,56 mM) e Fe - EDTA (Na₂ - EDTA (33,2 g/L); FeSO₄.7H₂O (25 g/L) e NaOH (3,65 g/L). Para as solução com N foi adicionado 2 mM de (NH₄)₂SO₄ o que equivale a 4 mM de NH₄⁺. O pH da solução foi corrigido em torno de 6,0 e 6,5 antes da aplicação ao substrato.

O crescimento foi analisado em relação à altura, área foliar, número de folhas, massa seca e número total de nódulos. A área foliar foi obtida através da medida do comprimento x largura em régua e o valor corrigido pelo fator de correção 0,8001, apresentado por Macedo (2007). Este fator foi obtido através do uso de um digitalizador de imagem (scanjet HP 2400) e programa de integração de imagem (Leaf Area Measurement, version 1.3, www.shef.ac.uk/nucpe/). Os dados foram analisados através de teste ANOVA (p < 0.05) em programa estatístico WINSTAT (WinSTAT for Excel; R. Fish Software 2002; www.winstat.com).

RESULTADOS

Os resultados mostram que a área foliar e a massa seca total das plântulas do tratamento Sem Nod ao final do experimento são significativamente maiores que os outros tratamentos. Logo em seguida vem o tratamento Nod +N com valores maiores que o tratamento Nod -N. Gross *et al.*, (2002), Gross *et al.*, (2004) e Mendonça & Schiavinato (1996), também relatam que quando o N é oferecido através apenas da fixação biológica as plântulas apresentam menor acúmulo de massa seca em relação ao tratamento que recebeu N apenas na solução nutritiva. Um menor desenvolvimento do tratamento Nod -N pode ser indicio do maior gasto energético necessário para o processo de FBN, única fonte disponível do nutriente neste tratamento. Esse maior gasto energético é relatado por Csiro (2008) que afirma que plantas não costumam fixar N quando há boa disponibilidade do nutriente no solo, pois o custo energético é extremamente alto (aproximadamente 10 g de carbono por N fixado), quando comparado com a assimilação de N disponível no solo pelas raízes (de 4 a 6 g de carbono por N assimilado). Este resultado pode ser confirmado ao analisar os resultados de massa seca total de nódulos por planta dos tratamentos Nod +N e Nod -N. Durante todo o experimento os valores são muito maiores para Nod -N do que em Nod +N, chegando a ser quase 4 vezes maior em relação ao tratamento Nod +N. Este resultado sugere que a planta que depende apenas da fixação biológica como fonte de N tem um gasto energético muito maior, para poder manter os nódulos em pleno funcionamento. Nódulos radiculares podem cumprir o papel de verdadeiros drenos de carbono na planta, pois em troca dos aminoácidos e/ou amônio fornecidos pelos nódulos (bacterioides) a planta hospedeira, estes necessitam de carbono fornecido pela planta

para manterem suas atividades. A taxa de crescimento relativo (TCR) mostra que há um maior crescimento nas plântulas do tratamento Sem Nod, confirmando os resultados de área foliar, altura e massa seca. A menor TCR nas plantas do tratamento Nod -N reforça a sugestão de maior gasto energético (para manter os nódulos) quando há apenas a fixação biológica como fonte de N para a planta, diminuindo o ritmo de crescimento da planta em relação a fonte inorgânica de N.

CONCLUSÃO

Em relação ao desenvolvimento de plântulas de *A. falcata*, a fonte de N mais eficiente foi o nitrogênio inorgânico, porém a espécie mostrou aptidão para usar qualquer fonte de N disponível, evidenciando a competência da fixação em suprir N para o desenvolvimento da planta.

Agradecimento

A FAPESP pela bolsa de mestrado concedida à aluna Fernanda Lopes de Macedo.

REFERÊNCIAS

Bredemeier, C. & Mundstock, C.M. Regulação da Absorção e Assimilação do Nitrogênio nas Plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria 30 (2): 365 - 372, 2000.

Bustamante, M.M.C.; Martinelli, L.A.; Silva, D.A.; Camargo, P.B.; Klink, C.A.; Domingues, T.F. & Santos, R.V. ^{15}N Natural Abundance in Woody Plants and Soils of Central Brazilian Savannas (cerrado). *Ecological Applications* 14: 200 - 213, 2004.

Camargos, L.S. Alterações no metabolismo de composto nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio efeitos na nodulação e na fixação. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2007, 128 p.

Cordeiro, L. Fixação de nitrogênio em Leguminosas ocorrentes no cerrado. In: Klein, A.L. (Org). *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado. 2002, p. 131 - 145.

Cordeiro, L. & Beltrati, C.M. Estrutura e desenvolvimento de nódulos radiculares de *Anadenanthera falcata* Speg. (Leg. Mimosoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 12: 61 - 70, 1989.

Crews, T.E. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs. ecological considerations. *Biogeochemistry* 46: 233 - 246, 1999.

Csiro. Global nitrogen fixation distribution - a plant ecology mystery. Disponível em: <http://www.csiro.au/resources/GlobalNitrogenFixation.html> Acesso em: 01 de fevereiro de 2009. 2008.

Döbereiner, J. Avanços Recentes na Pesquisa em Fixação Biológica de Nitrogênio no Brasil. *Estudos Avançados* 4 (8): 144 - 152, 1990.

Fidelis, A. T.; Godoy S. A. P. Estrutura de um cerrado Stricto sensu na gleba cerrado Pé - de - Gigante, Santa Rita

do Passa Quatro, SP. *Acta. Bot. Bras.* , 17 (4): 531-539, 2003.

Galloway, J.N.; Dentener, F.J.; Capone, D.G.; Boyer, E.W.; Howarth, R.W.; Seitzinger, S.P.; Asner, G.P.; Cleveland, C.C.; Green, P.A.; Holland, E.A.; Karl, D.M.; Michaels, A.F.; Porter, J.H.; Townsend, A.R. & Vorosmarty, C.J. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70: 153-226, 2004.

Graham, P.H. Ecology of Root - Nodule Bacteria of Legumes. In: Dilworth, M.J.; James E.K.; Sprent J.I. & Newton W.E. Nitrogen - Fixing Leguminous Symbioses. *Nitrogen Fixation: origins, applications and research progress*. 2008. 402 p.

Gross, E.; Cordeiro, L. & Caetano, F. H. Nodule ultrastructure and initial growth of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. var. *falcata* (Benth.) Altschul plants infected with rhizobia. *Annals of Botany* 90: 175 - 183, 2002.

Gross, E.; Cordeiro L.; & Caetano, F. H.. Nodulação e Micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 95 - 101, 2004.

Klink, C.A. & Machado, R.B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade* 1 (1): 147 - 155, 2005.

Macedo, F. M.; Martins, M. C. M.; Latansio, S. C. R. & Aidar, M. P. M. 2006. Ecofisiologia da germinação, crescimento inicial e preferência no uso de nitrogênio em plântulas de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg (Leguminosae-Mimosoideae) In: XVI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo-Mudanças Climáticas e Biodiversidade, Piracicaba, 2006.

Mendonça, E.H.M. & Schiavinato, M.A. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio mineral no crescimento e nodulação de duas espécies de angico. *Arquivos em Biologia e Tecnologia* 36 (3): 607 - 611, 1996.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403 (24): 853 - 858, 2000.

Phoenix, G.K.; Hicks, W.K.; Cinderby, S.; Kuylenstierna, J.C.I.; Stock, W.D.; Dentener, F.J.; Giller, K.E.; Austin, A.T.; Lefroy, R.D.B.; Gimeno, B.S.; Ashmore, M.R. & Ineson, P. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology* 12: 470-476, 2006.

Schmidt, S. & Lamblea, R.E. Nutrient dynamics in Queensland savannas: implications for the sustainability of land clearing for pasture production. *The Rangeland Journal* 24: 96 - 111, 2005.

Vitousek, P.M.; Chair, J.A.; Howarth, R.W.; Likens, G.E.; Matson, P.A.; Schindler, D.W.; Schlesinger, W.H. & Tilman, G.D. Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Causes and Consequences. *Ecological Applications* 7: 737 - 750, 1997.

Werner, R.A. & Schmidt, H.L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry* 61:465 - 484, 2002.

Wirén, N.V.; Gazzarrini, S. & Frommer, W.B. Regulation of Mineral Nitrogen Uptake in Plants. *Plant and Soil* 196:191 - 199, 1997.