

NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM *ADESMIA ARAUJOI* BURK

SCHEFFER-BASSO, Simone M.¹, CARNEIRO, Cerci M.¹, VOSS, Márcio²

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Caixa Postal 611, Cep: 99001-970, Passo Fundo, RS. E-mail: simone@upf.tchê.br.

²Embrapa-trigo, Caixa Postal, 569, Passo Fundo.
(Recebido para publicação em 08/11/99)

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) e as características da nodulação de leguminosas nativas do Sul do Brasil têm sido assuntos pouco estudados, apesar de sua importância. Esse trabalho teve como objetivo investigar a morfologia e anatomia dos nódulos de *Adesmia araujoii* Burk, bem como a eficiência do processo simbiótico. O experimento foi conduzido sob condições de casa de vegetação, empregando-se solução nutritiva, em vasos de Leonard com areia e vermiculita (1:1). As sementes foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio, enquanto vasos, substrato e solução nutritiva foram autoclavados. Os tratamentos foram: Testemunha, Inoculação e Nitrogênio mineral. As plantas do tratamento Inoculação receberam, alguns dias depois da emergência das plântulas, 0,5ml de nódulos frescos esmagados. As plantas foram colhidas 90 dias após a semeadura. Usou-se os procedimentos de SASS (1951) para os estudos anatômicos dos nódulos. Observou-se baixa eficiência da simbiose; plantas noduladas acumularam cerca de 17% de matéria seca na parte aérea em relação àquelas que receberam nitrogênio-mineral. Os nódulos mostraram uma forma esférica característica, com meristema contínuo e tipo determinado de crescimento. Quatro regiões anatômicas e histológicas diferentes foram encontradas: córtex, feixes vasculares, meristema e zona bacteriana, sendo que essa região estava subdividida em três zonas. No parênquima cortical foi observado amido. A subdivisão da zona bacteriana e a presença de amido são constatações inéditas para o gênero *Adesmia*.

Palavras chave: *Adesmia*, fixação biológica de nitrogênio, nódulos.

ABSTRACT

NODULATION AND BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN *ADESMIA ARAUJOI* BURK. The biological nitrogen fixation and nodulation characteristic of wild leguminous of South Brazil have been little studied, in spite of its importance. This study had the objective of investigating the morphology and anatomy of *Adesmia araujoii* Burk nodules as well as the efficiency of symbiotic process. The experiment was carried out under greenhouse conditions using nutrient solution, in Leonard jars with sand and vermiculite (1:1). Seeds were superficially sterilised with sodium hypochlorite, and jars, substrate and nutrient solution were autoclaved. The treatments were control, inoculation and mineral-nitrogen. Plants of the inoculation treatment received 0,5ml of fresh nodules juice some days after seedling emergence. Plants were harvested 90 days after sowing. SASS procedures were used in anatomical studies of nodules. Low efficiency of the inoculant used was observed; plants with nodules accumulated approximately 17% of dry matter above ground in relation to those that received mineral-nitrogen. The nodules showing a characteristic spherical form, with continuous meristem and determined growth type. Four anatomically and histologically diverse regions were found: cortex, vascular systems, meristem and bacterioid zone. This region was subdivided in three zones and there was starch in the cortical parenchyma. The subdivision of bacterioid zone and starch presence are new registers for the *Adesmia* genus.

Key words: *Adesmia*, biological nitrogen fixation, nodules.

INTRODUÇÃO

A simbiose rizóbio-leguminosa, responsável pela fixação anual de, pelo menos, 35 milhões de toneladas de nitrogênio (N), segundo dados da National Academy of Science, de 1979 (FREIRE, 1992), tem sido estudada quase que exclusivamente em espécies cultivadas. Informações a respeito de tal processo em leguminosas nativas, seja do Brasil ou de outro país, são restritas. As questões envolvem desde a simples ocorrência da simbiose até a eficiência de tal associação.

No Rio Grande do Sul, cuja área de pastagens naturais abrange cerca de 10 milhões de hectares, há uma considerável participação de leguminosas na dieta alimentar dos rebanhos bovino e ovino. Importantes informações em nível de taxonomia têm sido divulgadas, enquanto os aspectos ligados à morfofisiologia e à fixação de N têm sido pouco estudados. SCHEFFER-BASSO *et al.* (1995), num levantamento da nodulação de leguminosas presentes nos campos do Planalto Médio do RS, observaram diferentes graus de nodulação, desde ausência de nodulação em *Galactia pretiosa* até abundante nodulação em *Adesmia araujoii*, *Lupinus aureonitens*, *Rhynchosia hauthalli*, *Stylosanthes leiocarpa* e *Trifolium riograndense*.

Dentre os gêneros nativos do RS, cujas espécies são consideradas promissoras como forrageiras, encontra-se *Adesmia* DC. Suas espécies, chamadas vulgarmente de "babosas", tem merecido atenção de pesquisadores da Argentina, Brasil e Uruguai. A sua presença em solos ácidos e de pouca fertilidade é um dos principais motivos do interesse da pesquisa, cujos resultados têm estimulado a continuidade dos trabalhos. MIOTTO & LEITÃO FILHO (1993) citaram a ocorrência de 17 espécies para o Brasil, limitadas à região Sul.

Com respeito à fixação de N as informações são contraditórias, sendo que BURKART (1952) cita *Adesmia* DC. como inefetivo. No Uruguai, COLL & ZARRA (1992) consideram *Adesmia bicolor* (Poir.) DC. como uma espécie com elevada capacidade de fixação de N, devido à alta produção de matéria seca em solos arenosos e pobres nesse elemento. VIDOR & NETO (1992) referem-se à *Adesmia tristis* Vog. como uma leguminosa com excelente nodulação. Embora o aspecto geral da nodulação no sistema de raízes não indique necessariamente eficiência na fixação de N, tais relatos sugerem a necessidade de investigação.

Além das informações de caráter agrônomo, os aspectos relacionados à morfologia dos nódulos tem importância fundamental nos estudos dessa natureza, e também no enfoque taxonômico. Os trabalhos de ROTHSCCHILD (1967) com *A. bicolor*, *A. capitellata* (Clos) Hauman e *A. latifolia* (Spreng.) Vog. foram decisivos para a taxonomia do gênero, sendo um dos critérios utilizados por Burkart para colocar *Adesmia* na tribo *Hedysareae* (CORBY, 1981).

Dentre as espécies de *Adesmia*, *A. araujoii* (babosa-serrana) é uma das mais encontradas no Planalto Médio do

RS, cujo crescimento é hiberno-primaveril. Sua efetividade em fixar nitrogênio, bem como as características dos nódulos, não foram descritas até o momento. Objetivou-se examinar a resposta de *Adesmia araujoi* Burk ao nitrogênio-mineral e à inoculação, de forma a obter informações acerca de sua efetividade e morfologia nodular.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação (Embrapa-trigo), em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições, com os seguintes tratamentos: a) testemunha (plantas sem suprimento externo de N), b) inoculação com isolados de *Rhizobium* a partir de nódulos macerados e c) N-mineral. As sementes foram obtidas de plantas de ocorrência em campo nativo no município de Passo Fundo. Antes da semeadura, as sementes foram imersas em uma solução comercial de água sanitária (hipoclorito de sódio a 2%), durante cinco minutos, e em seguida enxaguadas cinco vezes com água destilada e esterilizada. Posteriormente foram escarificadas manualmente com lixa nº 40, previamente flambada. O substrato foi preparado com uma mistura de areia lavada e vermiculita (1:1) e colocado 500ml nas unidades experimentais, que consistiram de vasos de Leonard (VINCENT, 1970). A solução nutritiva foi composta de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2mM) e micronutrientes (boro, cobre, manganês, molibdênio, zinco) a 1/10 da concentração descrita por HOAGLAND & ARNON (1938). O nitrogênio mineral (tratamento c) foi aplicado na forma de NH_4NO_3 (5%). Tanto os vasos quanto a solução nutritiva foram autoclavados. A semeadura foi efetuada em 30 de maio, sendo utilizadas quatro sementes/vaso; após quinze dias foi feito o desbaste, deixando-se 2 plantas/vaso. A solução nutritiva foi renovada duas vezes no tratamento com N e uma vez nos demais tratamentos. As plantas submetidas ao tratamento N-mineral receberam 7ml de NH_4NO_3 (5%)/vaso e as demais, apenas 1ml, aos 35 dias após a semeadura. As plantas inoculadas

receberam, no 17º dia, 0,5 ml de um macerado de nódulos frescos obtidos de raízes de *A. araujoi*. Após noventa dias da semeadura foi efetuada a colheita, sendo avaliados: altura, acúmulo de biomassa da parte aérea e raízes, em base seca (secagem em estufa a 70°C até massa constante), localização, cor e morfologia dos nódulos. Alguns nódulos foram fixados em FAA 50% por 48 horas e desidratados em série alcoólica-etílica, álcool:xilol (1:1) e xilol puro; posteriormente foram executadas infiltração e inclusão em parafina. As seções foram obtidas em micrótomo rotatório, com 7µm de espessura, distendidas e fixadas em lâminas com adesivo Haupt's. A coloração foi feita com safranina e *fast-green* (SASS, 1951). Os dados de altura e biomassa foram submetidos à análise da variância, sendo as médias comparada pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância mostrou efeito de fontes de N sobre a altura e biomassa de *Adesmia araujoi* (Tabela 1). Observa-se que plantas que receberam N-mineral foram significativamente ($P < 0,05$) mais altas (36,2cm) às inoculadas (17,1cm); as plantas sem suprimento externo de N ficaram com sua altura reduzida a cerca de 9,6cm. Com relação à biomassa aérea, verificou-se um acúmulo de 775mg de matéria seca (MS)/vaso nas plantas supridas de N-mineral, quase seis vezes mais do que o verificado nas plantas noduladas (135mg MS/vaso). Fato similar foi verificado quanto à biomassa de raízes, embora com menor grandeza relativa, em que as plantas noduladas acumularam cerca de 1,6 vezes menos massa de raízes se comparadas às plantas supridas com nitrato de amônio. Observa-se na Tabela 1 que não houve diferença entre plantas-testemunha e plantas-noduladas com relação à biomassa de raízes, que foi de 53 e 54mg MS/vaso, respectivamente.

TABELA 1 - Altura, acúmulo de biomassa e relação raiz:parte aérea (RPA) de *Adesmia araujoi* em função da fonte de nitrogênio

Fontes de nitrogênio	Parâmetros			
	Altura ----- cm -----	Raiz ----- mg MS/vaso -----	Parte aérea	RPA
Testemunha	9,60 c	53,00 b (54%)*	45,00 c (46%)*	1,17
Inoculação	17,10 b	54,00 b (29%)	135,00 b (71%)	0,40
Nitrogênio	36,20 a	90,00 a (10%)	775,00 a (90%)	0,12
C.V. (%)	10,84	30,29	31,36	

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

* Os percentuais, na linha, representam a repartição da matéria seca das plantas em cada tratamento.

A efetividade do processo simbiótico foi muito reduzida em *A. araujoi*, de forma que considerando-se a parte aérea, o acúmulo de MS foi de aproximadamente 17% em relação ao obtido com a aplicação de nitrato de amônio. Sabe-se que leguminosas supridas exclusivamente pelo N-simbiótico, normalmente não conseguem expressar seu potencial produtivo, uma vez que o processo de fixação de N promove alterações fundamentais na morfologia das plantas, resultando em decréscimo no crescimento. Os nódulos representam um dreno adicional de fotossintatos e nutrientes, competindo com os outros órgãos da planta pelos assimilados (CASSMAN *et al.*, 1980). SCHEFFER-BASSO (1999) observou em *A. latifolia* uma efetividade de 37% na fixação de N, enquanto em *Lotus corniculatus*, leguminosa cultivada como planta forrageira, foi de apenas 29%. A baixa efetividade

em ambos os trabalhos indica que tais leguminosas respondem à aplicação de N e que, por isso, a seleção de estirpes de *Rhizobium* é um fato a ser considerado na melhoria da fixação biológica de N.

Além das diferenças de acúmulo de biomassa, pode-se verificar (Tabela 1) que a repartição da mesma foi distinta nos três tratamentos. As plantas bem supridas de nitrogênio deslocaram maior quantidade relativa de fotoassimilados para a parte aérea (90%) em relação às plantas noduladas (71%) e às testemunhas (46%), numa demonstração clara de que sob carência de N há um comprometimento da produção da parte aérea. Sob o aspecto da relação raiz:parte aérea (RPA) a tendência foi a mesma, de forma que observou-se um decréscimo nessa relação, de 1,17 (testemunha) para 0,12

(plantas com N-mineral) à medida que o suprimento de N aumentou.

Quanto à morfologia dos nódulos, os mesmos apresentaram-se esféricos, conforme descrição de ROTHSCHILD (1968) para *Adesmia*. Os nódulos distribuíram-se na base das raízes secundárias, próximo ao colo da planta. No momento da colheita, a maioria deles apresentavam-se internamente com coloração parda, indicando início de degeneração. Também foram observados alguns nódulos brancos, num sintoma típico de ausência de fixação de N. A maioria dos nódulos era composta de unidades individuais, embora tenha ocorrido a formação de nódulos siameses, o que parece ser comum nas espécies de *Adesmia* (ROTSCHILD, 1968). Os cortes histológicos mostraram características de nódulos de crescimento determinado. Foi possível detectar quatro regiões anatômica e histologicamente distintas: córtex, feixes vasculares, meristema nodular e zona bacteriana, conforme Fig. 1.

A massa cortical apresentou-se contínua, como na raiz, com a presença de grãos de amido no parênquima (Fig. 2). Essa característica não foi relatada por ROTHSCHILD (1968) para *Adesmia capitellata*, *A. bicolor* e *A. latifolia*. Tal fato merece investigações posteriores, pois LOHNIS (1930), citado por DART (1977), também encontrou abundância de amido em nódulos inefetivos de ervilha (*Pisum sativum* L.). A zona bacteriana (Fig. 1) mostrou-se dividida em três regiões, ocorrendo entre cada uma feixes vasculares e uma faixa de células parenquimáticas (Fig. 3). Essa divisão não foi observada por ROTHSCHILD (1968) em *Adesmia* spp., onde a zona bacteriana mostrou-se contínua.

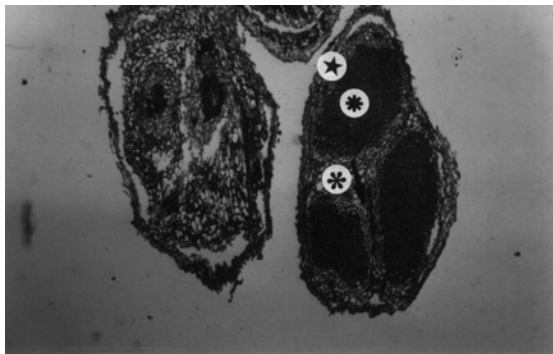


Figura 1 Seção longitudinal de dois nódulos de *Adesmia araujoi*. (→) córtex; (→) feixes vasculares; (✱) meristema nodular; (✱) zona bacteriana. M.F. 40x.

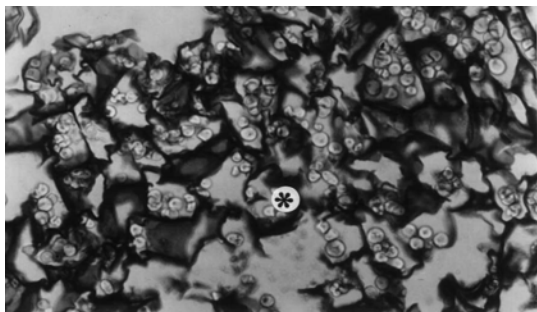


Figura 2 Corte histológico de nódulo de *Adesmia araujoi* mostrando grãos de amido (✱) em células de parênquima. M.F. 40x.

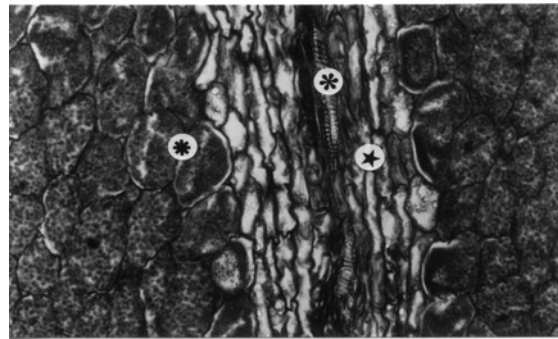


Figura 3 Detalhe da seção de nódulo de *Adesmia araujoi*. (✱) Tecido condutor; (✱) parênquima; (✱) zona bacteriana. M.F. 40x.

CONCLUSÕES

A fixação de N em *A. araujoi* é pouco efetiva, podendo ser implementada pela seleção de estirpes mais eficazes.

Em nódulos de *A. araujoi* encontram-se divisões na zona bacteriana e amido no parênquima cortical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURKART, A. 1952. **Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas**. 2.ed. Buenos Aires, ACM Agency. 569p.
- CASSMAN, K.G.; WHITNEY, A.S.; STOCKINGER, K.R. Root growth and dry matter distribution of soybean as affected by phosphorus stress, nodulation, and nitrogen source. **Crop Science**, Madison, v.20, n.2, p.239-244, 1980.
- COLL, J.; ZARRA, A. 1992. **Leguminosas nativas promisorias: trebol polimorfo y babositas**. Montevideo, INIA, n.22, 19p.
- CORBY, H.D.L. 1981. The systematic value of leguminous root nodules. In: POLHILL, R.M., RAVEN, P.H. (Eds.) **Advances in legume systematics**. Kew, University of Reading, p.657-676.
- DART, P. 1977. Infection and development of leguminous nodules. In: HARDY, R.W.F.; SILVER, W.S. **A treatise on dinitrogen fixation section**. Section III: Biology. New York, p.367-472.
- FREIRE, J.R.J. 1992. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.N., TSAI, S.N.M., NEVES, M.C. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. P.121-140.
- HOAGLAND, D.R.; ARNOLD, D.I. 1938. **The method for ζ plants without water-culture**. Berkeley, University of California Agricultural Experimental Station. 32p. (Circular., 347).
- ROTHSCHILD, D.I. de. 1967. Anatomia del nódulo radical de origen bacteriano en *Adesmia* DC. (*Leguminosae*) - Contribucion a la taxonomia y filogenia de la familia. **Revista del Museu Argentino de Ciencias Naturales " Bernardino Rivadavia"**, Serie Botanica, Buenos Aires, v.3, n.3, p.161-191.
- SCHEFFER-BASSO, S.M. **Caracterização morfofisiológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de Adesmia DC. e Lotus L.** Tese (Doutorado em Zootecnia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 267p. (não publicada).
- SCHEFFER-BASSO, S.M.; CARNEIRO, C.M.; VOSS, M. Nodulation in some herbaceous wild leguminous plants at Passo Fundo (County), Rio Grande do Sul State. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM - SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Proceedings...** Rio de Janeiro: CNPAB/UFRRJ/BAS, 1995a. p.97-98.
- VIDOR, M.A.; NETO, J.S. 1992. Lages preserva espécies vegetais forrageiras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.2, n.5, p.13-15.
- VINCENT, J.M.A. 1970. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell. 119p.
- SASS, J.E. 1951. **Botanical microtechnique**. Iowa, The Iowa College Press. 1951. Numero de paginas