

EFEITO DA FERTILIDADE DO SOLO NO CRESCIMENTO, NODULAÇÃO E BIOQUÍMICA DOS NÓDULOS DE *CRATYLIA FLORIBUNDA* BENTH¹

A.A.C. PURCINO² * J.Q. LYND³

RESUMO - Avaliou-se o efeito de tratamentos de fertilidade sobre o vigor de rebrota, nodulação, atividade da nitrogenase e algumas enzimas e carboidratos dos nódulos de *Cratylia floribunda* Benth, quando cultivada em Latossolo Vermelho-Escuro (Typic Eutruxox). O P aumentou a rebrota da parte aérea, o peso seco das raízes, e o número e peso dos nódulos e seus teores de proteína e glicose. A atividade da nitrogenase aumentou nos vasos fertilizados com P ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{vaso/h}$), mas este efeito não existiu quando os resultados foram expressos como $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{g}$ de nódulo fresco/h, e foi negativo quando calculado como atividade enzimática específica ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ de proteína/min). Este efeito também foi observado na desidrogenase do glutamato, na sintetase da glutamina, na sintase do glutamato, e nas transaminases glutamato-oxaloacetato e glutamato-piruvato. O Mg beneficiou a produção de forragem, mas deprimiu as atividades enzimáticas. O S e o K aumentaram a produção de forragem em alguns cortes, mas pouco afetaram as características fisiológicas dos nódulos. O Ca aumentou a atividade da sintase do glutamato, os níveis de α cetoglutarato, fosfatos de piridoxal, proteína solúvel e do amido, mas diminuiu a produção de forragem nos dois primeiros cortes, o crescimento radicular e os níveis de glicose e sucrose.

Termos para indexação: *Cratylia floribunda*, nitrogenase, GDH, GS-GOGAT.

EFFECT OF SOIL FERTILITY ON REGROWTH VIGOR, NODULATION, AND NODULE PHYSIOLOGY OF *CRATYLIA FLORIBUNDA* BENTH

ABSTRACT - The effect of fertility treatments on regrowth vigor, nodulation, nitrogenase, nodule enzymes and carbohydrates of *Cratylia floribunda* was evaluated when cultivated on a Dark-Red Latosol (Typic Eutruxox). P augmented regrowth of aerial parts, root dry weight, and number and weight of the nodules, as well as their levels of protein and glucose. Increased nitrogenase activity was observed in pots fertilized with P ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{pot/hr}$), but non-significant effects were found when results were expressed as $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{g}$ fresh nodule/hr, and a negative effect was noted if nitrogenase was calculated as enzyme specific activity ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{mg protein/hr}$). The same effect was observed on glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, glutamate synthase, and the transaminases glutamate-oxaloacetate and glutamate-pyruvate. Mg had a beneficial effect on herbage yield, but depressed the nodule enzymatic activity. S and K increased herbage production but showed little effect on nodule enzymatic activity, and Ca augmented glutamate synthase activity, levels of α -Ketoglutarate, pyridoxyl phosphates, soluble protein and starch, but depressed herbage production on the first two clippings, root growth and levels of glucose and sucrose in the nodules.

Index terms: *Cratylia floribunda*, nitrogenase, GDH, GS-GOGAT.

INTRODUÇÃO

O estabelecimento permanente da consorciação entre gramíneas e leguminosas em pastagens é altamente desejável. Entretanto, a procura de leguminosas forrageiras que formem pastos permanentes com gramíneas tem sido difícil, principalmente porque poucas delas são capazes de se adaptarem às condições de baixa fertilidade e de acidez da

maioria dos solos utilizados na exploração animal no Brasil.

Apesar de ser a América Latina um grande banco de germoplasma de leguminosas forrageiras tropicais, a maioria das espécies testadas neste continente, em pastagens melhoradas, foi selecionada e desenvolvida na Austrália (Sanchez 1979). Uma comparação entre dados edáficos e climáticos obtidos nestes dois continentes mostra, entretanto, que os resultados obtidos na Austrália, provavelmente, não são transferíveis para a América Latina (Sanchez & Isbell 1979). Portanto, estes dois fatores sugerem que a procura de leguminosas forrageiras mais adaptadas às condições brasileiras deve ser intensificada.

¹ Aceito para publicação em 30 de março de 1984.

² Eng^o - Agr^o, Ph.D., Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Caixa Postal 515, CEP 3000 Belo Horizonte, MG.

³ Professor, Ph.D., Oklahoma State University Departamento de Agronomia, Stillwater, OK, 74078, EUA.

A leguminosa *Cratylia floribunda* Benth, conhecida como copada, usada neste experimento, é uma das muitas espécies nativas na América do Sul com potencial forrageiro ainda desconhecido.

Hooker & Jackson (1893) listam seis espécies de *Cratylia* nativas no Brasil, Bolívia e norte da Argentina. Aparentemente, a *C. floribunda* é bem adaptada às condições brasileiras, pois já foi encontrada como nativa na Bahia (Menezes 1949), Minas Gerais (Costa et al. 1978), Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Acre, Pará (Ducke 1949, Hetch 1979), Amazonas (Serrão & Simão Neto 1975), Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Paraná (Maxwell 1977). Em Minas Gerais, Maxwell (1977) lista a *Cratylia* como sendo nativa em Santa Bárbara, Bento Rodrigues, Ponte Nova, Viçosa, Coronel Pacheco, Teófilo Otoni, Serro e Barra do Rio Piranha. Estas observações indicam ainda que este gênero pode se adaptar tanto a solos pobres do Trópico Úmido da Amazônia, como à aridez severa do Piauí e Bahia. No norte de Minas Gerais, esta planta é encontrada nativa numa área que mostra transição entre floresta e cerrado, com um déficit hídrico variando de 200 a 600 mm, entre abril e outubro (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1976).

Hymowitz (1967) reporta que dez ecótipos de *Cratylia* haviam sido introduzidos no Instituto de Pesquisas IRI em Matão até 1967, e Menezes (1949) indica que a espécie *floribunda* é uma boa forrageira para solos pobres na Bahia. No Pará, Hetch (1979) observou, em Paragominas, que esta espécie ocorre espontaneamente na comunidade arbustiva, invadindo áreas de pastagens melhoradas, degradadas por limitações de fertilidade do solo.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito qualitativo de tratamentos de fertilidade do solo no crescimento, nodulação e bioquímica dos nódulos de *Cratylia floribunda* Benth, quando cultivada em casa de vegetação, sob regime de cortes.

MATERIAL E MÉTODOS

O solo utilizado foi o epipedon 0-20 cm de um Latossolo Vermelho-Escuro (Typic Eustrustox), coletado no Distrito Agroindustrial de Jaíba, no norte de Minas Gerais, onde a *Cratylia floribunda* é encontrada entre a vegetação nativa.

As suas características são apresentadas na Tabela 1.

Os vasos foram cheios com uma mistura de 100 g de solo e 400 g de areia quartzosa branca. Os grãos de areia tinham, em sua maioria, um tamanho médio e foram previamente lavados, uma vez, com solução de 0,1 N de HCl e depois, várias vezes, com água destilada para remoção do excesso de HCl (testado com AgNO_3).

Para estabelecimento dos tratamentos de fertilidade, os macronutrientes P, S, Ca, Mg e K foram arrançados em um fatorial completo 2^5 . Os 32 tratamentos assim estabelecidos aparecem na Tabela 2, e as fontes e níveis de cada tratamento, na Tabela 3. A ausência de resposta à fertilização com boro, molibdênio, zinco e cobre foi detectada em um experimento preliminar, quando a parte aérea das plantas foi cortada cinco vezes, em espaços de 35 dias.

Devido à utilização de $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ como fonte de fósforo, todos os tratamentos que não receberam P foram balanceados com $\text{NH}_4 \text{Cl}$ de tal maneira que todos recebessem a mesma quantidade de N como íon amônio. Os níveis de Ca, Mg e K foram balanceados de acordo com a relação $K/\sqrt{\text{Ca} + \text{Mg}} = 1$. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, com três repetições.

As sementes foram escarificadas e germinadas em vermiculita, e o transplante para os vasos foi realizado quando as plântulas apresentavam um par de folhas verdadeiras. Durante o transplante, o solo e as plântulas foram inoculadas com 3 ml de um meio líquido contendo mais de 10^8 células viáveis de *Rhizobium leguminosarum*, obtidas de nódulos de *Strophostyles* sp.

Durante o decorrer do experimento, os vasos foram mantidos perto da capacidade máxima de retenção de umidade; utilizou-se refrigeração para manter a temperatura da casa de vegetação abaixo de 32°C.

TABELA 1. Características do epipedon 0-20 cm do Latossolo Vermelho-Escuro de Jaíba.

Características	
pH (H_2O)	6,1
CTC - eq. mg/100 g	25,4
Matéria orgânica %	3,3
Cátions trocáveis - eq. mg/100 g	
Ca	13,8
Mg	2,5
K	0,4
Al	não detectado
P (Bray I) ppm	7,5
Fe ppm	680
Mn ppm	208
Zn ppm	1
Areia %	24,5
Limo %	19,5
Argila %	56,0
Textura	argilosa

TABELA 2. Combinações de cátions e ânions utilizadas nos tratamentos de fertilidade do solo.

Tratamento	Combinação	Tratamento	Combinação
1	O	17	PKCa
2	P	18	PKMg
3	K	19	PKS
4	Ca	20	PCaMg
5	Mg	21	PCa S
6	S	22	PMgS
7	PK	23	K CaMg
8	PCa	24	K Ca S
9	P Mg	25	K Mg S
10	PS	26	Ca Mg S
11	K Ca	27	P K Ca Mg
12	K Mg	28	P K Ca S
13	KS	29	PK Mg S
14	Ca Mg	30	P Ca Mg S
15	Ca S	31	K Ca Mg S
16	Mg S	32	P K Ca Mg S

TABELA 3. Fontes e níveis de nutrientes utilizados nos tratamentos de fertilidade do solo.

Nutrientes	Fonte	Nível *
Fósforo	NH ₄ H ₂ PO ₄	50 ppm
Enxofre	Na ₂ SO ₄	50 ppm
Cálcio	Ca CO ₃	6 meq/100 g
Magnésio	Mg Cl ₂ 6. H ₂ O	2 meq/100 g
Potássio	K Cl	2 meq/100 g

* Em relação ao peso de substrato nos vasos (500 g)

Quatro cortes da parte aérea, espaçados por 35 dias, foram realizados antes da coleta da parte radicular. O peso seco deste material foi obtido após secagem a 105°C, por 24 horas.

O método da redução de C₂H₂ para C₂H₄, como proposto por Hardy et al. (1968), foi utilizado para determinação da atividade da nitrogenase. Os resultados serão discutidos em termos de produção de μmoles C₂H₄ por vaso/h, por grama de nódulo/h e por miligrama de proteína/min.

Depois da análise de redução de C₂H₂, os nódulos foram separados das raízes, contados e pesados. Todas as outras determinações foram realizadas no citosol dos nódulos, e os extratos nodulares foram obtidos por ultrassom a 7,3 pulsos de frequência e centrifugação a 12 x 10³ g por 10 minutos (Grimes & Fottrell 1966, Brown & Dilworth 1975).

A atividade das seguintes enzimas foi medida: desidrogenase do glutamato (GDH) (Schmidt 1974), sintetase da

glutamina (GS) (Shapiro & Stadtman 1970), sintase do glutamato (GOGAT) (Ryan & Fottrell 1974), transaminase glutamato - oxaloacetato (GOT) (Bergmeyer & Bernt 1974a) e da transaminase glutamato - piruvato (GPT) (Bergmeyer & Bernt 1974b).

As atividades enzimáticas foram expressas como unidades internacionais (U) e definidas como a quantidade de enzima que causa a transformação de 1 μmole de substrato por minuto e serão discutidas em termos de U/g de nódulo e U/mg proteína.

Entre os carboidratos, foram medidos a glicose (Bergmeyer & Bernt 1974d), a sucrose (Bergmeyer & Bernt 1974e) e o amido (Keppler & Decker 1974).

O intermediário do ciclo de Krebs alfa cetoglutarato (αKG) foi determinado de acordo com o método de Bergmeyer & Bernt (1974c), os fosfatos de piridoxal (PLP) foram medidos como proposto por Johnson & Metzler (1970), e a percentagem de proteína no citosol do nódulo foi determinada segundo Lowry et al. (1951).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento serão discutidos em termos da significância para o contraste ausência e presença de um determinado nutriente, como definido pelo efeito principal no esquema de tratamento delineados como fatorial, baseado no teste estatístico de F.

Na Tabela 4 aparecem os efeitos dos nutrientes aplicados ao solo na quantidade de matéria seca obtida nos quatro cortes da parte aérea, no peso seco das raízes e no número e peso fresco dos nódulos.

O fósforo foi o nutriente que mais beneficiou o crescimento da parte aérea, e seu efeito foi observado nos quatro cortes realizados. O magnésio mostrou efeitos benéficos nos três primeiros cortes, enquanto o enxofre influenciou a produção de matéria seca somente nos dois primeiros. A influência do potássio foi observada no segundo e terceiro corte. Por outro lado, um efeito negativo foi observado nos dois primeiros cortes, nos vasos que receberam adubação com cálcio.

O efeito dos nutrientes no desenvolvimento radicular foi muito semelhante ao efeito observado na parte aérea das plantas, por ocasião do primeiro corte.

Um sistema radicular bastante desenvolvido foi observado nos vasos fertilizados com fósforo, com um pequeno aumento naqueles em que se adicionou magnésio. O efeito depressivo do cálcio foi

TABELA 4. Efeito da fertilidade do solo no crescimento da parte aérea e da raiz, e no peso fresco e número de nódulos de *Cratylia floribunda*, g/vaso.

	Peso seco parte aérea				Peso seco raiz	Peso fresco nódulos	Número nódulos
	1º Corte	2º Corte	3º Corte	4º Corte			
P ausente	0,78***	0,30***	0,24***	0,58***	0,49***	0,14***	36,5***
P presente	1,39	1,70	1,54	0,96	1,12	0,35	67,0
S ausente	1,04*	0,92***	0,88 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,25 ^{ns}	49,0 ^{ns}
S presente	1,13	1,08	0,90	0,75	0,81	0,25	55,3
Ca ausente	1,16***	1,04 [≠]	0,86 ^{ns}	0,78 ^{ns}	0,85 [≠]	0,27 ^{ns}	57,4 ^{ns}
Ca presente	1,01	0,96	0,92	0,74	0,76	0,22	47,0
Mg ausente	1,04*	0,94*	0,84*	0,74 ^{ns}	0,76 [≠]	0,24 ^{ns}	53,3 ^{ns}
Mg presente	1,12	1,05	0,95	0,78	0,85	0,25	51,0
K ausente	1,09 ^{ns}	0,93**	0,75***	0,76 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,25 ^{ns}	57,8 ^{ns}
K presente	1,08	1,07	1,03	0,76	0,76	0,24	46,7

Os símbolos [≠], *, ** e *** indicam significância P < 0,1; 0,05; 0,01 e 0,001, respectivamente, para comparações de ausente x presente dentro de cada parâmetro;

^{ns} = não-significativo.

novamente observado. Aparentemente, nem o enxofre nem o potássio tiveram influência no desenvolvimento das raízes.

Com respeito à nodulação das plantas, somente o fósforo foi capaz de aumentar tanto o número quanto o peso fresco dos nódulos, depois dos quatro cortes que sofreu a parte aérea das plantas.

Carvalho et al. (1971), em trabalhos de campo, utilizando um Latossolo Vermelho-Escuro fase mata, também notaram que o fósforo limitava o desenvolvimento e nodulação de várias leguminosas forrageiras.

O efeito benéfico observado para a fertilização com potássio neste solo também foi observado anteriormente nas mesmas condições deste trabalho quando se plantou o feijão-alado (*Psophocarpus tetragonolobus*) (Purcino et al. 1981), mas os efeitos negativos, observados para o cálcio, não tinham sido detectados ainda.

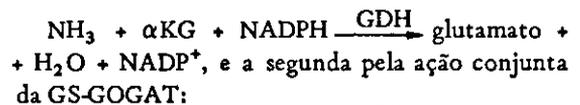
Experimentos conduzidos com milho no Latossolo Vermelho-Escuro da Jabba indicam que a resposta à adubação do solo pode ser bastante contrastante quando se comparam resultados obtidos com leguminosas e gramíneas, como o milho (Purcino 1977).

Leguminosas noduladas, como a utilizada neste

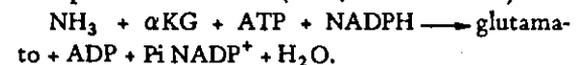
ensaio, podem suprir suas necessidades de nitrogênio, através da redução biológica do N₂ atmosférico pela atividade da enzima nitrogenase encontrada nos bacteróides dos nódulos. A amônia assim produzida é, então, excretada no citosol do nódulo onde deve ser imediatamente incorporada em forma de aminoácidos (Mifflin 1980) ou ureídeos (McClure et al. 1980).

A Fig. 1 representa as duas rotas possíveis de incorporação da amônia em glutamato e, subsequentemente, em aspartato e alanina.

A primeira rota é catalizada pela enzima GDH:



glutamina + $\alpha\text{KG} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GOGAT}} 2 \text{glutamato} + \text{NADP}^+$, que também pode ser representada pelo seu somatório (Tempstead et al. 1970).



Após a síntese do glutamato nos nódulos, várias transaminases são capazes de transferir o grupo α amino deste aminoácido para outros cetoácidos,

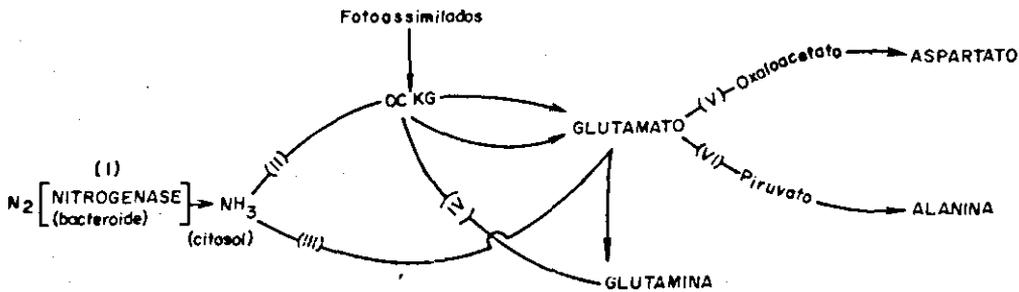


FIG. 1. Incorporação de NH_3 em glutamato via GDH e GS-GOGAT, com transaminação para aspartato e alanina.

1. Nitrogenase (E.C. 1.7.99.2)
2. Desidrogenase do glutamato (GDH) (EC. 1.4.1.3)
3. Sintetase da glutamina (GS) (EC. 6.3.1.2)
4. Sintase do glutamato (GOGAT) (EC. 1.4.1.13)
5. Transaminase glutamato - oxaloacetato (GOT) (EC. 2.6.1.1)
6. Transaminase glutamato - piruvato (GPT) (EC. 2.6.1.2)

formando novos aminoácidos e regenerando o ácido α cetoglutarico. Destas transaminases, a glutamato-oxaloacetado e a glutamato-piruvato já receberam atenção de alguns pesquisadores interessados na bioquímica da incorporação de amônia em aminoácidos (Fottrell & Mooney 1969, Grimes & Fottrell 1966, Lillich & Elkan 1971 e Ryan & Fottrel 1974). Estas enzimas catalizam a síntese do aspartato e alanina, respectivamente.

Estas duas transaminases contêm os fosfatos de piridoxal como grupos prostéticos, os quais são essenciais para a atividade enzimática, estando geralmente firmemente ligados às apoenzimas (Jenkins et al. 1959).

Os resultados de avaliação da atividade da nitrogenase pelo método da redução do acetileno aparecem na Tabela 5.

Quando a redução do acetileno foi calculada como μ moles C_2H_4 /vaso/h, foi observado um efeito desejável, altamente significativo, para o fósforo. Entretanto, quando a quantidade produzida de etileno foi expressa como μ moles C_2H_4 /g de nódulo/h, o efeito do fósforo deixou de ser significativo. Mais interessante ainda, foi o fato de que este nutriente apresentou um efeito altamente negativo quando a atividade da nitrogenase foi expressa em termos de μ moles C_2H_4 /mg de proteína/min.

Como se observa nas Tabelas 4 e 8, o fósforo aumentou o número e o peso fresco dos nódulos, além do conteúdo de proteína solúvel nestes. Estes fatos devem então ser considerados na interpretação dos resultados obtidos no estudo do efeito do fósforo na atividade da nitrogenase.

Uma maior atividade da nitrogenase foi observada nos vasos fertilizados com fósforo porque as plantas nestes vasos tinham um maior número e peso fresco de nódulos, e não necessariamente porque este nutriente aumentou a quantidade de enzima presente em cada nódulo individualmente. Na verdade, os dados obtidos, neste experimento, indicam que o acúmulo de proteína nos nódulos não influenciou a quantidade de enzima presente nestes, isto é, a proteína acumulada não apresentava atividade enzimática. Esta afirmativa pode ser feita com base no fato de que o fósforo teve um efeito altamente negativo, quando a atividade da nitrogenase foi calculada tendo como referência a quantidade de proteína solúvel nos nódulos. Resultados semelhantes a este já tinham sido observados anteriormente (Purcino & Lynd 1982).

As Tabelas 6 e 7 mostram o efeito dos nutrientes na atividade das enzimas GDH, GS, GOGAT, GOT e GPT.

Como se observou para a nitrogenase, o efeito

TABELA 5. Efeito da fertilidade do solo na atividade da nitrogenase em *Cratylia floribunda*.

	Nitrogenase		
	$\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{vaso/h}$	$\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{g n\u00f3dulo/h}$	$\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{mg prote\u00edna/min}$
P ausente	16,05 ^{***}	69,56 ^{ns}	0,364 ^{**}
presente	44,35	104,25	0,157
S ausente	31,22 ^{ns}	89,40 ^{ns}	0,201 ^{ns}
presente	39,46	99,61	0,279
Ca ausente	32,50 ^{ns}	75,73 ^{ns}	0,212 ^{ns}
presente	36,49	105,21	0,249
Mg ausente	31,86 ^{ns}	92,36 ^{ns}	0,206 ^{ns}
presente	38,61	92,71	0,270
K ausente	37,63 ^{ns}	91,19 ^{ns}	0,231 ^{ns}
presente	32,00	93,78	0,235

Os s\u00edmbolos ** e *** indicam signific\u00e2ncia $P < 0,01$ e $0,001$, respectivamente, para compara\u00e7\u00f5es de ausente x presente dentro de cada unidade de express\u00e3o da atividade da nitrogenase;

ns = n\u00e3o-significativo.

TABELA 6. Efeito da fertilidade do solo na atividade de algumas enzimas do citosol do n\u00f3dulo de *Cratylia floribunda*, quando a atividade enzim\u00e1tica foi expressa como U/grama de n\u00f3dulo.

	GDH	GS	GOGAT	GOT	GPT
	U/g n\u00f3dulo				
P ausente	1,67*	1,98**	1,24***	5,78***	1,45***
presente	2,41	2,79	2,07	12,12	2,97
S ausente	1,92 ^{ns}	2,46 ^{ns}	1,65 ^{ns}	9,81 ^{ns}	1,45 [#]
presente	2,15	2,31	1,66	8,08	1,98
Ca ausente	1,88 ^{ns}	2,27 ^{ns}	1,29***	8,07 ^{ns}	2,16 ^{ns}
presente	2,20	2,51	2,01	9,83	2,26
Mg ausente	2,36*	2,72*	1,92**	9,38 ^{ns}	2,41 ^{ns}
presente	1,71	2,06	1,39	8,53	2,02
K ausente	2,05 ^{ns}	2,32 ^{ns}	1,63 ^{ns}	9,82 ^{ns}	2,22 ^{ns}
presente	2,02	2,45	1,68	8,07	2,20

Os s\u00edmbolos #, *, ** e *** indicam signific\u00e2ncia $P < 0,1$; $0,05$; $0,01$ e $0,001$, respectivamente, para compara\u00e7\u00f5es de ausente x presente dentro de cada par\u00e2metro;

ns = n\u00e3o-significativo.

dos nutrientes na atividade destas enzimas variou de acordo com a maneira pela qual a atividade enzim\u00e1tica foi expressa.

Na Tabela 6, s\u00e3o apresentadas as atividades enzim\u00e1ticas como unidades internacionais (U)/grama de n\u00f3dulo, e na Tabela 7 como U/mg de pro-

te\u00edna. Daqui por diante a express\u00e3o U/mg de prote\u00edna ser\u00e1 referida como atividade espec\u00edfica, diferenciando-a da representa\u00e7\u00e3o U/g de n\u00f3dulo.

A atividade da GDH foi bastante aumentada nos vasos fertilizados com f\u00f3sforo quando os resultados foram expressos como U/g de n\u00f3dulo, mas o

TABELA 7. Efeito da fertilidade do solo na atividade de algumas enzimas do citosol do nódulo de *Cratylia floribunda*, quando a atividade enzimática foi expressa como U/mg de proteína (atividade específica).

	GDH	GS	GOGAT	GOT	GPT
	U/mg de proteína				
P ausente	0,769**	1,017**	0,651*	2,291*	0,720*
presente	0,251	0,284	0,207	1,012	0,298
S ausente	0,343 [≠]	0,556 ^{ns}	0,310 ^{ns}	1,281 ^{ns}	0,444 ^{ns}
presente	0,688	0,750	0,555	2,046	0,580
Ca ausente	0,601 ^{ns}	0,800 ^{ns}	0,473 ^{ns}	1,926 ^{ns}	0,590 ^{ns}
presente	0,420	0,501	0,385	1,377	0,429
Mg ausente	0,695*	0,905*	0,585 ^{ns}	1,980 [≠]	0,664 [≠]
presente	0,326	0,396	0,273	1,323	0,335
K ausente	0,684 [≠]	0,799 ^{ns}	0,569 ^{ns}	2,006 ^{ns}	0,598 ^{ns}
presente	0,347	0,516	0,297	1,329	0,426

Os símbolos [≠], * e ** indicam significância P < 0,1; 0,05 e 0,01, respectivamente, para comparações de ausente x presente dentro de cada parâmetro;

ns = não-significativo.

efeito deste nutriente foi negativo quando a atividade enzimática foi calculada como U/mg de proteína. Entretanto, em ambos os casos, observou-se um efeito negativo para a fertilização com o magnésio; aparentemente, isto aconteceu independentemente do efeito do magnésio no número, peso fresco e percentagem de proteína solúvel nos nódulos.

Um efeito negativo para o potássio foi observado na atividade específica da GDH, mas nos vasos fertilizados com enxofre a atividade específica desta enzima aumentou.

Tanto a atividade específica quanto a atividade/g de nódulo da GS foram diminuídas em vasos fertilizados com magnésio, e foram novamente obtidos resultados contrastantes com relação ao fósforo. Para este nutriente, a atividade da GS aumentou como U/g de nódulo, mas efeitos negativos foram observados na atividade específica, provavelmente, devido ao aumento de proteína sem atividade enzimática, no citosol dos nódulos.

Tanto o fósforo quanto o cálcio mostraram um efeito altamente positivo na atividade da GOGAT, quando esta foi expressa como U/g de nódulo, mas um efeito negativo foi observado para o magnésio. Entretanto, quando a atividade da GOGAT foi calculada como U/mg de proteína,

tanto o cálcio como magnésio perderam seus efeitos, enquanto o fósforo mostrou resultados negativos.

Na atividade da GOT, novamente o fósforo mostrou efeitos benéficos, quando esta foi calculada como U/g de nódulos, e efeitos depressivos, quando esta foi expressa como U/mg de proteína. Enquanto este efeito negativo do fósforo na atividade específica da GOT pode ter sido novamente causado por um aumento de proteína nos nódulos sem atividade GOT, o efeito depressivo do magnésio parece ser real.

Quando expressa como U/g de nódulo, a atividade da GPT aumentou com a fertilização com fósforo, e diminuiu quando o enxofre foi adicionado aos vasos. Entretanto, tanto o fósforo como o magnésio diminuíram a atividade específica desta enzima, significativamente.

Finalmente na Tabela 8, aparecem os efeitos dos nutrientes nas concentrações de α KG, PLP, proteína solúvel, glicose, sucrose e amido, presentes no citosol dos nódulos.

Os dados obtidos indicam que os níveis do α KG aumentaram quando as plantas foram fertilizadas com cálcio, mas um efeito negativo foi observado para a fertilização com magnésio. Este efeito po-

TABELA 8. Efeito da fertilidade do solo nas concentrações de α cetogluturato, fosfatos de piridoxal, proteína e alguns carboidratos do citosol do nódulo de *Cratylia floribunda*.

Tratamento	α KG μ moles/ g nod	PLP μ g/ g nod	Proteína %	mg/g de nódulo		
				glicose	sucrose	amido
P ausente	0,56 ^{ns}	17,78 ^{ns}	0,62 ^{***}	0,99 [‡]	0,17 ^{ns}	0,47 ^{ns}
presente	0,67	20,72	1,15	1,10	0,16	0,51
S ausente	0,67 ^{ns}	21,10 ^{ns}	0,99 ^{ns}	1,19 ^{***}	0,16 ^{ns}	0,52 [‡]
presente	0,55	17,40	0,78	0,92	0,16	0,46
Ca ausente	0,46 ^{**}	15,99 [*]	0,71 [*]	1,10 [‡]	0,20 ^{***}	0,52 [*]
presente	0,76	22,50	1,06	0,99	0,12	0,45
Mg ausente	0,70 [‡]	20,54 ^{ns}	0,90 ^{ns}	1,05 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,52 [*]
presente	0,52	17,96	0,87	1,05	0,18	0,45
K ausente	0,65 ^{ns}	18,84 ^{ns}	0,78 ^{ns}	1,12 [*]	0,16 ^{ns}	0,52 ^{ns}
presente	0,57	19,66	0,99	0,98	0,16	0,47

Os símbolos †, *, **, e *** indicam significância $P < 0,1; 0,05; 0,01$ e $0,001$, respectivamente, para comparações de ausente x presente dentro de cada parâmetro;

ns = não-significativo.

sitivo do cálcio também foi observado nos níveis de PLP.

Um aumento na percentagem de proteína solúvel também foi observado pela fertilização com Ca, e os níveis de proteína nos nódulos quase que dobraram em resposta à fertilização com fósforo.

Como mencionado anteriormente, esta proteína acumulada no citosol dos nódulos, em resposta à adubação fosfatada, não mostrou nenhuma atividade enzimática, fato este refletido no efeito negativo deste nutriente quando as atividades da nitrogenase, GDH, GS, GOGAT, GOT e GPT foram expressas como U/mg proteína. Portanto, é necessário que se tenha cuidado na interpretação destes resultados, já que este efeito depressivo do fósforo, na atividade enzimática dos nódulos, pode ser artificial.

Com relação aos carboidratos, foram observados níveis aumentados de glicose nos vasos fertilizados com fósforo, mas menos glicose foi detectada nos nódulos das plantas fertilizadas com potássio, enxofre e cálcio.

Enquanto o cálcio também aumentou os níveis de sucrose e amido, menores quantidades deste carboidrato foram observadas quando houve fertilização com enxofre e magnésio.

CONCLUSÕES

1. No Latossolo Vermelho-Escuro da Jaíba (*Typic Eutruxox*), o fósforo foi o nutriente que mais limitou o desenvolvimento das plantas e as condições fisiológicas dos nódulos da *Cratylia floribunda*. A fertilização com este nutriente aumentou todas as atividades enzimáticas quando estas foram expressas com U/g de nódulo, mas um acúmulo de proteína solúvel, nestes nódulos, indica efeito negativo deste nutriente se as atividades enzimáticas forem expressas como U/mg de proteína.

2. O magnésio favoreceu o crescimento tanto da parte aérea quando do sistema radicular, mas, consistentemente, deprimiu as atividades enzimáticas dos nódulos.

3. Tanto o enxofre quanto o potássio mostraram efeitos benéficos no crescimento das plantas, mas muito pouca influência nos parâmetros associados com a fixação biológica do nitrogênio e a incorporação do NH_3 em aminoácidos.

4. Os resultados obtidos com o cálcio mostram que este nutriente teve um efeito detrimental no crescimento das plantas, com pequena influência na associação simbiótica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Hortência M.A. Purcino, Fairy Lynd e Bob Berg pela inestimável colaboração na obtenção dos dados.

REFERÊNCIAS

- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. Glutamate-oxaloacetate transaminase, UV assay, manual method. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974a. v. 2, p.728-83.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. Glutamate - pyruvate transaminase, UV assay, manual method. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974b. v.2, p.752-8.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. 2 oxoglutarate, UV spectrophotometric determination. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974c. v.3, p.1577-80.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E.D. Glucose: determination with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974d. v.3, p.1205-15.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. Starch. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974e. v.3, p.1127.
- BROWN, C.M. & DILWORTH, M.J. Ammonia assimilation by rhizobium cultures and bacteroides. J. Gen. Microbiol., 86:39-48, 1975.
- CARVALHO, M.M. de; FRANÇA, G.E.; BAHIA FILHO, A.F.C. & MOZZER, O.L. Ensaio exploratório de fertilização com seis leguminosas tropicais em um Latossolo Vermelho-Escuro, fase mata. Pesq. agropec. bras., Ser. Agron., 6(único):285-90, 1971.
- COSTA, N.M.S.; FERREIRA, M.B. & CURADO, T.F.C. Leguminosas nativas do Estado de Minas Gerais. Coleta e avaliações preliminares de alguns gêneros. Belo Horizonte, EPAMIG, 1978.
- DUCKE, A. Notas sobre a flora neotrópica. II. As leguminosas da Amazônia. s.l., Instituto Agrônomo do Nordeste, 1949. (Boletim Técnico, 18).
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, MG. Levantamento de reconhecimento com detalhes dos solos do Distrito Agroindustrial de Jaíba, Minas Gerais. Belo Horizonte, EPAMIG/EMBRAPA/RURALMINAS, 1976. (Boletim Técnico, 54).
- FOTTRELL, P.F. & MOONEY, P. The regulation of some enzymes involved in ammonia assimilation by *Rhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol., 59:211-4, 1969.
- MCCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. & VOLK, R.J. Evaluation of the relative ureide content of xylen sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. Plant Physiol., 66:720-5, 1980.
- MENEZES, A.I. Flora da Bahia. Brasileira, 264:1-264, 1949.
- MIFLIN, B.J. Nitrogen metabolism and amino acid biosynthesis in crop plants. In: CARLSON, P.S. The biology of crop productivity. s.l., Academic Press, 1980. p.255-96.
- PURCINO, A.A.C. Soil fertility interaction response of a dark-red latosol (Typic Eutruxtox) from Jaíba, Minas Gerais, Brazil. Stillwater, Oklahoma State University, 1977. Tese Mestrado.
- PURCINO, A.A.C. & LYND, J.Q. Growth stage effects on nitrogenase, nitrate reductase, and ureide content in nodules of 'Copada'. Soil Sci., 133(3):186-94, 1982.
- PURCINO, H.M.A.; PURCINO, A.A.C. & LYND, J.Q. Soil fertility effects governing growth and nodule parameters at anthesis of two winged bean cultivars with a typical eutruxtox. Pesq. agropec. bras., Brasília, 16(5):633-44, 1981.
- RYAN, E. & FOTTRELL, P.F. Subcellular location of enzymes involved in the assimilation of ammonia by soybean root nodules. Phytochem., 13:2647-52, 1974.
- SANCHEZ, P.A. Tropical pasture research in acid infertile soils of Latin America: Present status and needs for the future. In: SANCHEZ, P.A. & TERGAS, L.E. Pasture production in acid soils of the tropics. Cali, Colombia, s. ed., 1979.
- SANCHEZ, P.A. & ISBELL, R.F. A comparison of the soils of tropical Latin America and tropical Austrália. In: SANCHEZ, P.A. & TERGAS, L.E. Pasture production in acid soils of the tropics. Cali, Colombia, s. ed., 1979.
- SERRÃO, E.A.S. & SIMÃO NETO, M. The forage adaptation of tropical forages in The Amazon region. In: DOLL, E.C. & MOTT, G.O. Tropical forages in livestock production systems. s.l., s. ed., 1975. (ASA Special Publication, 24).
- SHAPIRO, B.M. & STADTMAN, E.R. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*) In: TABOR, H. & TABOR, A. W. Methods in enzymology. s.l., Academic Press, 1970. v. 17 A, p.910-22.
- SCHMIDT, E. Glutamate dehydrogenase. UV. assay. In: BERGMEYER, H.U. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974. v. 17, p. 910-22.
- TEMPEST, D.W.; MEERS, J.L. & BROWN, C.M. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. Biochem., 177:405-7, 1970.
- GRIMES, H. & FOTTRELL, P.F. Enzymes involved in glutamate metabolism in legume root nodules. Nature, 212:295-6, 1966.

- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. The acetyleneethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-207, 1968.
- HETCH, S. Spontaneous legumes of developed pastures of the Amazon and their forage potential. In: SANCHEZ, P.A. & TERGAS, L.E. Pasture production in acid soils of the tropics. Cali, Colombia, s. ed., 1979.
- HOOVER, J.D. & JACKSON, B.D. *Index Kewensis*. s.l., Oxford University Press, 1893. v.1.
- HYMOWITZ, T. Collection and evaluation of tropical and subtropical Brazilian forage legumes. *Trop. Agric.*, 48:103-15, 1967.
- JENKINS, W.T.; YPHANTIS, D.A. & SIZER, I.W. Glutamic aspartic transaminases. I. Assay, purification, and general properties. *J. Biol. Chem.*, 264:51-7, 1959.
- JOHNSON, R.J. & METZLER, D.E. Analyzing spectra of vitamin B6 derivatives. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. *Methods in enzymology*. s.l., Academic Press, 1970. v. 18 A, p.433-71.
- KEPPLER, D. & DECKER, K. Glicogen determination with amyloglucosidase. In: BERGMAYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 2. ed. s.l., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974. v.3, p.1127.
- LILLICH, T.T. & ELKAN, G.H. The biosynthesis of aspartic acid, glutamic acid and alanine in *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, 17:683-8, 1971.
- LOWRY, O.N.; NIRA, J.; ROSEMBROUGH, A.; EARL, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
- MAXWELL, R.H. A resume of the genus *Cleobulia* (Leguminosae) and its relation to the genus *Dioctlea*. *Phytologia*, 38:51-65, 1977.