

EFEITO SAZONAL SOBRE O DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *AZOLLA*¹

ALAIDES PUPPIN RUSCHEL²

RESUMO - Foi conduzido um experimento de campo, com cinco espécies de *Azolla*, a fim de pesquisar o efeito sazonal sobre o desenvolvimento (peso da planta), a atividade da nitrogenase e os teores de nitrogênio e fósforo acumulados nas plantas. O experimento foi repetido, mensalmente, de junho de 1983 até agosto de 1984, em Piracicaba, SP, permanecendo as plantas por 21 dias sob condições experimentais em cada época. Foram estudadas as espécies *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. microphylla*, *A. mexicana* e *A. pinnata*. Todas as espécies apresentaram o máximo de produção (peso planta) e de N total, no mês de novembro. As espécies que apresentaram melhor desenvolvimento durante o período mais longo foram a *A. filiculoides* e a *A. microphylla*. A relação matéria verde/matéria seca esteve, em média, acima de 25. A atividade da nitrogenase variou somente no período de clima frio. Os níveis máximos de nitrogênio acumulados foram 29, 29 e 37 kg/ha, e de P absorvido 3,1; 3,6 e 4,6 kg/ha respectivamente, pela *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla*. A época de menor desenvolvimento da *Azolla* deu-se em pleno verão (janeiro e fevereiro).

Termos para indexação: nitrogenase, fósforo.

SEASONAL EFFECT ON GROWTH AND SIMBIOTIC NITROGEN FIXATION OF DIFFERENT *AZOLLA* SPECIES

ABSTRACT - A field trial was set up to study the seasonal effect on *Azolla* growth, nitrogenase activity, symbiotic nitrogen fixation and P-accumulation in an experiment repeated, monthly, June 1983 to August 1984 at Piracicaba, São Paulo, Brazil, being plants growing for 21 days. Five *Azolla* species (*A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. microphylla*, *A. mexicana* and *A. pinnata*) were studied. There was a differential effect among species related to the time of the year for all parameters analysed. All species showed high yield and N-content in November (late spring). Maximum yield and total nitrogen over longer periods were shown by *A. filiculoides* and *A. microphylla*. The average ratio plant weight/plant dry weight was above 25. Nitrogenase activity varied among species at winter time only. Maximum N-yields were 29, 29 and 37 kg/ha of N for *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* respectively, and for P accumulation 3.1, 3.6, and 4.6 kg/ha of P respectively. The poorest development for all species occurred during summer (January and February).

Index terms: nitrogenase, phosphorus.

INTRODUÇÃO

A *Azolla*, uma planta aquática da família das Azollaceas, vive em simbiose com a cianobactéria *Anabaena azollae*, a qual é capaz de fixar o nitrogênio em altas taxas. Esta planta possui forma arredondada com diâmetro de 1-2 cm, folhas paripenadas alternadas com folíolos de 0,5 a 1,0 mm, os quais possuem cavidades no lóbulo dorsal onde se localiza a *Anabaena*. Possuem rizoma com raízes individuais ramificadas (1 a 3 cm) em determinados pontos. O tempo de duplicação de *Azolla* va-

ria de três a seis dias. A fixação simbiótica nesta planta pode chegar a 5 kg/ha.dia, de N, em condições ideais de desenvolvimento. No Vietnam (Twan & Thuyet 1979, China (Chu 1979) e Índia (Singh 1981) foram alcançados, anualmente, de 450 a 860 kg/ha de nitrogênio.

Em virtude de sua capacidade de enriquecer-se e conseqüentemente aumentar o nitrogênio do ambiente, a *Azolla* tem sido usada, desde a antiguidade, como adubo verde, em arroz irrigado (Chevalier 1926).

No Brasil, as pesquisas com *Azolla* foram iniciadas na década passada (Malavolta et al. 1978), para conhecer sua biologia, capacidade de fixação de N₂ e efeito de deficiências de nutrientes (Fiore & Ruschel 1981, 1982). A *Azolla* encontra-se distribuída em todo o território nacional, mas algu-

¹ Aceito para publicação em 30 de julho de 1986. Pesquisa executada no CENA-USP, Piracicaba, SP.

² Eng.-Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Caixa Postal 179, CEP 74000 Goiânia, GO.

mas espécies observadas na Ásia e mesmo nas Américas do Norte e Central não têm sido encontradas sob nossas condições (Lumpkin & Plucknett 1980).

Tendo em vista, o alto preço dos adubos nitrogenados, o alto potencial de fixação de *Anabaena* em simbiose com a *Azolla* e a possibilidade de sua utilização na agricultura, são necessárias pesquisas para se conhecer o potencial de adaptação de espécies de *Azolla* sob condições de campo. No presente experimento foi estudado o efeito sazonal sobre o desenvolvimento, capacidade fixadora e acúmulo de nitrogênio e fósforo de cinco espécies de *Azolla*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de campo, em que se estudaram cinco espécies de *Azolla*, foi repetido mensalmente, por quinze meses, em campo experimental na sede do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo, em Piracicaba, SP, Brasil (22°45'S e 47°30'O, temperatura média 21,6°C, com máxima 23,7°C – fevereiro, e mínima 18,4°C – julho, precipitação de 1.049 mm, com verão chuvoso e inverno seco, e altitude de 635 m).

O inóculo inicial consistiu-se de plantas desenvolvidas em solução nutritiva isenta de nitrogênio. Quinze gramas de *Azolla* (inóculo) foram colocados em canteiro (parcela) de 1,0 m² a 20 cm de profundidade, escavado no solo. Este canteiro foi revestido por um plástico transparente, continha uma lâmina d'água de 10 cm e 5 kg de solo adubado com 30 e 20 kg/ha de P e K₂O, respectivamente, sob a forma de superfosfato simples (15 g/parcela) e cloreto de potássio (4 g/parcela). Solo e adubos, da mesma procedência, foram repostos a cada início de experimento. No total, haviam 20 canteiros no experimento.

Foram utilizados os seguintes tratamentos (espécies de *Azolla*), com quatro repetições: *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* e *A. pinnata*.

O experimento foi repetido de junho de 1983 a agosto de 1984, permanecendo as plantas por três semanas, nas condições normais de campo, quando foram colhidas e determinados o peso da planta, o peso da matéria seca, a atividade da nitrogenase (N₂-ase) e os teores de nitrogênio e de fósforo respectivamente determinados pelo método de Kjeldahl e molibdênio-vanadato.

A atividade da nitrogenase foi analisada por redução de acetileno (Hardy et al. 1968), incubando-se de cinco a sete plantas de cada parcela sob atmosfera de 10% de acetileno em vidros, com capacidade para 35 ml, contendo 5 ml da solução sobrenadante, onde a *Azolla* estava desenvolvendo-se. Os frascos foram selados com rolha de borracha, sendo substituídos 10% da atmosfera do frasco por

acetileno e incubados (1.00 h) à luz de lâmpadas (General Electric "luz do dia"). O etileno evoluído foi analisado com auxílio de cromatógrafo de gás Beckman GC 65. Afim de obter-se resultados (nmol etileno/g.h) comparáveis entre tratamentos, as plantas, após incubação sob acetileno, foram secadas em estufa 65°C e pesadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se o peso das plantas (Tabela 1), observou-se um efeito diferencial em relação à espécie e à época do ano. O maior desenvolvimento ocorreu nos meses de agosto a novembro, para três espécies: *A. caroliniana*, *A. filiculoides* e *A. microphylla*, sendo que a *A. mexicana* desenvolveu-se melhor em novembro e dezembro, e a *A. pinnata*, em novembro. Houve diferença entre as espécies nos meses de junho a dezembro (exceto novembro), e de abril a julho, indicando que a mesma espécie não pode ser cultivada durante todo o ano.

A *A. microphylla* desenvolveu-se bem, comparativamente às demais, no período compreendido entre junho a dezembro (1983); a *A. filiculoides*, nos meses de abril, junho a setembro (exceto julho 1983) e de novembro a dezembro (Tabela 1). A *A. mexicana* e a *A. pinnata* foram as que menos se desenvolveram; no entanto, a primeira alcançou maior produção em novembro e dezembro e, a segunda, em julho, agosto e novembro. Observou-se que os meses de janeiro e fevereiro podem ser excluídos do calendário de cultivo da *Azolla*.

Houve grande variabilidade da relação matéria verde/matéria seca (MV/MS) entre épocas e entre espécies de *Azolla* (Tabela 2). Entre épocas, a variação foi de 16 a 66, 17 a 59, 12 a 44, 18 a 41 e 10 a 40, respectivamente, para *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* e *A. pinnata*.

As *Azollas* que tiveram maior relação MV/MS foram a *A. mexicana* e *A. microphylla*. Não foi observada diferença para a relação mencionada nos meses de novembro a abril. Ocorreu um alto coeficiente de variação para este parâmetro, o que se atribui ao excesso d'água retido no sistema radicular, impossível de ser eliminado sem causar efeito no peso da parte aérea. Na prática, é difícil obter-se um padrão de metodologia para a avaliação da massa verde para cálculo dos nutrientes disponíveis.

TABELA 1. Peso da matéria seca (g/m²), mensal, de diferentes espécies de *Azolla*, de junho/83 a agosto/84, após três semanas de desenvolvimento. Médias de quatro repetições (parcelas).

	1983												1984																	
	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
<i>A. caroliniana</i>	13,1a*	14,6b	17,5ab	16,5b	23,4b	38,6	31,9ab	5,8	1,5	6,6	9,9bc	23,5a	4,0c	6,0c	10,8	13,1a*	14,6b	17,5ab	16,5b	23,4b	38,6	31,9ab	5,8	1,5	6,6	9,9bc	23,5a	4,0c	6,0c	10,8
<i>A. filiculoides</i>	8,6a	14,2b	19,9ab	25,8a	28,7b	58,6	23,8ab	0,8	2,4	6,7	15,8a	6,8bc	7,8a	15,9a	20,0	8,6a	14,2b	19,9ab	25,8a	28,7b	58,6	23,8ab	0,8	2,4	6,7	15,8a	6,8bc	7,8a	15,9a	20,0
<i>A. mexicana</i>	2,4b	3,5d	5,6c	5,5c	5,7c	63,5	30,3ab	5,7	3,8	12,1	13,7ab	9,8bc	6,4ab	9,4b	14,0	2,4b	3,5d	5,6c	5,5c	5,7c	63,5	30,3ab	5,7	3,8	12,1	13,7ab	9,8bc	6,4ab	9,4b	14,0
<i>A. microphylla</i>	7,3ab	22,2a	23,8a	20,5ab	56,7a	77,0	51,4a	34,1	5,0	13,4	12,5ab	13,5b	4,4bc	7,0bc	11,3	7,3ab	22,2a	23,8a	20,5ab	56,7a	77,0	51,4a	34,1	5,0	13,4	12,5ab	13,5b	4,4bc	7,0bc	11,3
<i>A. pinnata</i>	6,5b	6,8c	14,0ab	4,8c	3,4c	34,8	4,4b	4,6	4,4	11,6	3,9c	3,2c	5,5bc	8,0bc	5,2	6,5b	6,8c	14,0ab	4,8c	3,4c	34,8	4,4b	4,6	4,4	11,6	3,9c	3,2c	5,5bc	8,0bc	5,2
dms	6,3	4,5	9,8	6,5	10,4	ns	31,6	ns	ns	ns	5,4	9,5	2,1	2,5	ns	6,3	4,5	9,8	6,5	10,4	ns	31,6	ns	ns	ns	5,4	9,5	2,1	2,5	ns
CV (%)	36,9	13,5	27,0	9,8	19,2	50,2	49,4	164,0	67,4	84,0	21,7	37,0	16,3	12,5	72,3	36,9	13,5	27,0	9,8	19,2	50,2	49,4	164,0	67,4	84,0	21,7	37,0	16,3	12,5	72,3

* Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

TABELA 2. Relação da matéria verde/matéria seca de diferentes espécies de *Azolla*. Dados mensais de junho/83 a agosto/84.

	1983												1984																	
	Jun*	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Jun*	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago
<i>A. caroliniana</i>	-	21	16ab	19a**	58a	19	20	37	66	25	36	27ab	19b	21ab	29	-	21	16ab	19a**	58a	19	20	37	66	25	36	27ab	19b	21ab	29
<i>A. filiculoides</i>	-	25	17a	20a	59a	21	19	19	24	29	25	30a	25ab	21ab	40	-	25	17a	20a	59a	21	19	19	24	29	25	30a	25ab	21ab	40
<i>A. mexicana</i>	-	19	12b	14b	26b	20	44	21	25	30	28	25ab	30a	31a	43	-	19	12b	14b	26b	20	44	21	25	30	28	25ab	30a	31a	43
<i>A. microphylla</i>	-	26	18a	21a	41ab	25	25	23	29	34	33	26ab	22b	16ab	29	-	26	18a	21a	41ab	25	25	23	29	34	33	26ab	22b	16ab	29
<i>A. pinnata</i>	-	22	16ab	15b	18b	25	40	21	26	21	28	19b	21b	10b	22	-	22	16ab	15b	18b	25	40	21	26	21	28	19b	21b	10b	22
dms	-	9	4	4	25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	9	6	19	4	-	9	4	4	25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	9	6	19	4
CV (%)	-	18	11	9	28	20	51	65	118	31	29	16	11	42	34	-	18	11	9	28	20	51	65	118	31	29	16	11	42	34

* Não foi determinado o peso das plantas verdes.

** Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

A atividade da nitrogenase, por ser um parâmetro variável em relação a efeitos do meio ambiente (luminosidade, temperatura ambiental e da água, chuvas, hora do dia em que foi feita a determinação), apresentou um coeficiente de variação alto (Tabela 3). Observou-se diferenciação de atividade da nitrogenase entre as espécies, de julho a setembro e de maio a julho do ano seguinte. No primeiro período, as espécies *A. filiculoides* e *A. microphylla* apresentaram maior atividade, e a *A. pinnata*, menor que as demais. No segundo período mencionado, novamente a *A. pinnata* apresentou baixa atividade em relação às demais espécies, destacando-se a *A. caroliniana*, com maior atividade da nitrogenase.

O teor de N (%) variou entre espécies e de acordo com a época do ano. Generalizando, observaram-se variações de 2% a 5%, sendo que as espécies que apresentaram menor teor foram a *A. mexicana* e a *A. pinnata* (Fig. 1). No inverno (junho e julho) o teor de N das *Azollas* foi mais baixo que nas demais épocas analisadas, exceto para *A. filiculoides*, cujas plantas apresentaram menor teor deste elemento em maio.

O nitrogênio total (Tabela 4) foi variável em relação às espécies de *Azolla* estudadas, na maioria das épocas. Excluem-se os meses de novembro, janeiro a março e agosto/84. *A. filiculoides* apresentou N-total elevado, nos meses de junho, agosto e setembro (1983), e abril, junho e julho (1984); e a espécie *A. microphylla*, nos meses de julho, agosto, setembro e dezembro (1983). Esta mesma espécie apresentou maior acúmulo de N nos meses de outubro a dezembro. O máximo de acúmulo de N ocorreu no mês de novembro, variando de 14 a 37 kg/ha de N em três semanas. Quando foi observada diferença estatística dentro da época, *A. pinnata* e *A. mexicana* sempre apresentaram menor N-total que as demais, exceto em junho (*A. pinnata*) e dezembro e abril (*A. mexicana*).

O P total das plantas (Tabela 5) foi variável entre espécies, nas diferentes épocas analisadas, exceto em novembro (1983), de janeiro a março e agosto de 1984. Houve um maior acúmulo de fósforo nos meses de novembro e dezembro em todas as espécies estudadas. *A. microphylla*, *A. caroliniana* e *A. filiculoides*, na maioria das vezes, apresentaram maior acúmulo de P que as demais espécies.

TABELA 3. Atividade da nitrogenase (n moles C₂H₄/g. h) de diferentes espécies de *Azolla*, mensal, de junho/83 a agosto/84. Médias de 4 repetições (parcelas).

	1983												1984											
	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Jun	Jul	Ago						
<i>A. caroliniana</i>	3111,3	853,5abc*	1036ab	1705ab	1015	1031	851	1444	511	311	565	416a	446a	1349ab	792	446a	416a	416a						
<i>A. filiculoides</i>	2734,8	1449,0a	1727a	2609a	1255	979	601	1995	339	581	779	178bc	359ab	1445a	931	359ab	178bc	178bc						
<i>A. mexicana</i>	2452,3	653,0bc	783bc	1448bc	2609	1024	2631	3818	434	559	649	192bc	309ab	753ab	703	309ab	192bc	192bc						
<i>A. microphylla</i>	2014,5	1221,0a	1347ab	2276ab	1708	744	871	2579	846	465	607	248b	231ab	600b	851	231ab	248b	248b						
<i>A. pinnata</i>	1846,5	395,3c	483c	391c	1589	530	941	2219	547	225	408	111c	131b	667b	388	131b	111c	111c						
dms	n.s	772,7	792,9	1121	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	123,4	244,4	837	ns	244,4	123,4	123,4						
CV (%)	48,0	37,4	32,6	29,4	43,9	30,4	157,8	47,0	43,7	66,2	30,7	23,8	36,7	38,5	40,8	36,7	23,8	23,8						

* Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

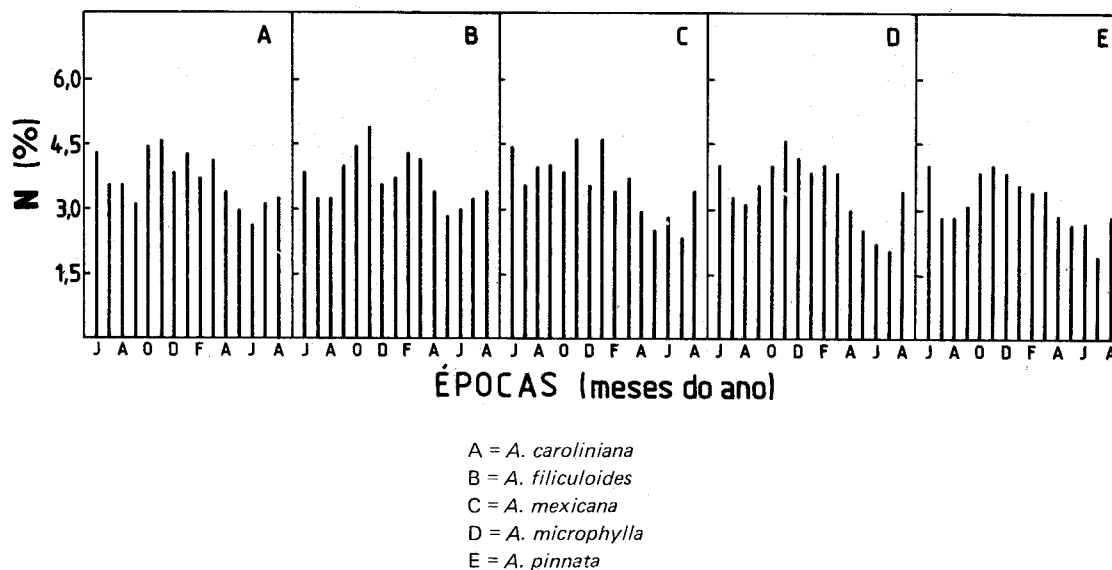


FIG. 1. Percentagem de nitrogênio (N%) em diferentes espécies de *Azolla*, após 21 dias de desenvolvimento.

Em geral, a relação N:P nas *Azollas* esteve na ordem de sete, indicando que esta planta necessita de elevados teores de fósforo, para promover um acúmulo eficiente de nitrogênio, de vez que esta relação é sempre mais ampla para plantas que têm simbiose com microrganismos fixadores de N_2 . Em soja, por exemplo, esta relação está na ordem de nove ou 10:1.

Resultados obtidos na China, por Lumpkin & Plucknett (1982), indicaram crescimento variável durante as diferentes épocas do ano para as espécies analisadas, sendo que a *A. caroliniana* e a *A. filiculoides* mostraram melhor desenvolvimento a partir de abril até novembro, com ligeiro declínio em agosto. O crescimento destas espécies é pequeno em janeiro e fevereiro. As demais crescem melhor de julho a outubro, não havendo crescimento de dezembro a março (inverno).

Os resultados deste trabalho diferem dos de Lumpkin & Plucknett (1982), provavelmente em consequência das condições climáticas, mostrando crescimento da *Azolla* durante todo o ano, com decréscimo acentuado de desenvolvimento de todas as espécies estudadas (Tabela 1), nos meses mais quentes do ano (janeiro e fevereiro).

CONCLUSÕES

1. A *Azolla* desenvolve-se durante todo o ano, havendo diferença entre espécies e época do ano.
2. Melhor desenvolvimento e acúmulo de nitrogênio e fósforo ocorre no mês de novembro.
3. *A. microphylla* e *A. filiculoides* constituem-se em espécies promissoras por apresentarem alta produção e acúmulo de nitrogênio por períodos mais longos que as demais analisadas.

REFERÊNCIAS

- CHEVALIER, A. La culture des azolla pour la nourriture des animaux de basse-cour et comme engrais vert pour les rizieres. *Rev. Bot. Appl. Agric. Colon.*, 6: 356-60, 1926.
- CHU, L.C. Use of azolla in rice production in China. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, Los Baños, Filipinas. *Nitrogen and rice*. Los Baños, 1979. p.375-94.
- FIORE, M.F. & RUSCHEL, A.P. A associação *Azolla-Anabaena*. I. Biologia e significância na agricultura. *Ci. e Cult.*, 34(6):792-8, 1982.
- FIORE, M.F. & RUSCHEL, A.P. Nitrogen fixation by *Azolla-Anabaena* in culture solution. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., ed. *Associative N_2 -fixation*. Boca Raton, CRC Press, 1981. p.213-8.

- HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation; laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-207, 1968.
- LUMPKIN, T.A. & PLUCKNETT, D.L. *Azolla* as green manure; use and management in crop production. Colorado, Westview Tropical Agricultural, 1982. 41p. (Serie, 5)
- LUMPKIN, T.A. & PLUCKNETT, D.L. *Azolla*; botany physiology and use as green manure. *Econ. Bot.*, 34(2):11-53, 1980.
- MALAVOLTA, E.; RUSCHEL, A.P.; MEDEIROS, A.A.; VEIGA, C.L.; STURION, A.C.; KRUG, F.J.; ESCOBAR, L.A.; IGARASHI, L.; ACCORSI, W.R.; BARROS, M.A.A.; SILVA, A.S. da; CARVALHO, J.G.; BELLOTE, A.F.J.; CARRIEL, J.M.; GERALDI, R.N.; EIMORI, I. Efeitos da nutrição mineral sobre o crescimento, aspecto, composição elementar e fixação de nitrogênio em *Azolla*. *An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz*, 35:51-75, 1978.
- SING, P.K. Use of *Azolla* and blue-green algae in rice cultivation in India. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., ed. *Associative N₂-fixation*. Boca Raton, CRC Press, 1981. p.183-96.
- TWAN, D.T. & THUYET, T.Q. Use of *Azolla* in rice production in Vietnam. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, Los Baños, Filipinas. *Nitrogen and rice*. Los Baños, 1979. p.395-405.