

CRESCIMENTO, PIGMENTAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM AZOLLA SPP. CULTIVADA EM QUATRO NÍVEIS DE DENSIDADE DO FLUXO RADIANTE¹

EDSON FERREIRA DE CARVALHO² e NEI FERNANDES LOPES³

RESUMO - Os efeitos da densidade do fluxo radiante (30, 50, 70 e 100% da radiação solar (DFRS) incidente) sobre o crescimento, fixação de N₂, pigmentação e fatores de adaptação luz/sombra foram avaliados em três espécies de *Azolla* (*A. microphylla*, *A. caroliniana* e *A. pinnata*). As três espécies de *Azolla* apresentaram taxas máximas de crescimento diário (G_m) e menor tempo de duplicação da fitomassa (T_d) em torno do oitavo dia após a inoculação em todos os níveis de luz. Exceto para *A. pinnata* a plena luz, cujo G_m foi atingido no 12º dia e menor T_d no 10º dia após a inoculação. A luz solar plena, *A. microphylla* apresentou maiores valores de taxa de fixação de N₂ e teor de antocianina que *A. caroliniana*, enquanto *A. pinnata* valores mínimos desses parâmetros e máximos a 50% de luz, *A. microphylla* mostrou ser mais adaptada à luz solar plena, vindo a seguir a *A. caroliniana*. Por outro lado, *A. pinnata* foi a que mais se adaptou a 50% da luz solar incidente. O teor de antocianina aumentou e o de clorofila decresceu com o incremento da densidade do fluxo radiante nas plantas superficiais, enquanto as da subsuperfície não apresentaram mudanças na pigmentação foliar.

Termos para indexação: clorofila, antocianina, fixação de dinitrogênio, níveis de luz.

GROWTH, PIGMENTATION AND NITROGEN FIXATION IN AZOLLA SPP CULTIVATED UNDER FOUR LIGHT FLUX DENSITIES

ABSTRACT - The effects of light flux densities (30, 50, 70 and 100% of sunlight) under growth, nitrogen fixation, pigmentation and shade adaptation were evaluated in three *Azolla* species (*A. microphylla*, *A. caroliniana* and *A. pinnata*). These species showed maxima daily growth rates (G_m) and minima duplication time of phytomass (T_d) by the 8 th day following inoculation under all light levels, except *A. pinnata* under full exposure in which G_m was reached by the 12 th day and minimum T_d by the 10 th day after inoculation. Under full sunlight, *A. microphylla* exhibited higher values of nitrogen fixation rates and anthocyanin content than *A. caroliniana* while *A. pinnata* showed minimal values of these parameters and maximal values at 50% of sunlight. *A. microphylla* showed to be more adapted to full sunlight followed by the *A. caroliniana*. *A. pinnata*, however, was more adapted to 50% of sunlight. Anthocyanin content increased and chlorophyll content decreased with the increment in light flux density on the superficial plants; moreover, the change in leaf pigmentation was not observed in the plants bellow this level.

Index terms: chlorophyll, antocyanin, N₂ fixation, light levels.

INTRODUÇÃO

A cianobactéria *Anabaena azollae* é a única espécie conhecida em associação simbiótica com Pteridófitas do gênero *Azolla*. A distribuição geográfica da *Azolla* indica grande adaptabilidade a condições ambientais extremamente variadas. As

espécies de *Azolla* apresentam diversidade de tolerância à densidade do fluxo radiante, e, normalmente, necessitam de certo grau de sombreamento (Lumpkin & Pluckneet, 1980; Tung & Shen, 1981).

As espécies de *Azolla* podem ser mais facilmente caracterizadas com base em aspectos ecológicos do que morfológicos (Peters et al., 1980; Tung & Watanabe, 1983). A temperatura e a densidade do fluxo radiante solar são fatores utilizados para definir o potencial de fixação de N₂ pelo complexo simbiótico *Azolla* - *anabaena* (Zimmerman, 1985a, 1985b).

¹ Aceito para publicação em 1 de setembro de 1993.

² Eng. - Agr., D.Sc., Prof. - Adjunto, Dep. de Ciências Agrárias, Univ. Fed. do Acre, CEP 69900 Rio Branco, AC.

³ Eng. - Agr., Ph.D., Prof. - Adjunto, Bolsista do CNPq, Dep. de Biol. Vegetal, Univ. Fed. de Viçosa, CEP 36570 Viçosa, MG.

Densidades de fluxo radiante elevadas são apropriadas para estudar adaptações fisiológicas de espécies de *Azolla* a estresses de luz. Medidas de crescimento, teor de clorofila, formação de antocianina e de fixação de N_2 são indicadores relevantes para identificação de espécies adaptadas a condições de clima tropical.

A formação de antocianina, embora não tenha sido correlacionada com taxas de crescimento, constitui indicador visível de respostas a estresses de luz e temperatura (Zimmerman, 1985a, 1985b). A função deste pigmento não-fotossintético em *Azolla* pode ser, como em outras plantas vasculares, de proteção do mesófilo foliar contra o excesso de radiação ultravioleta (Holst, 1977).

Segundo Zimmerman (1985a, 1985b), elevados níveis de luz foram mais efetivos que altas temperaturas na inibição do tempo de duplicação de clorofila e indução de produção de antocianina em dois ecótipos de *Azolla caroliniana* Willd da Amazônia Colombiana. O efeito combinado de altas temperaturas (35/31°C) e luminosidade de 450-510 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ diminuiu a taxa de redução de acetileno nos dois ecótipos.

É fundamental conhecer o comportamento das espécies de *Azolla* e as interações com o ambiente, principalmente com fatores energéticos, para que se estabeleça o manejo adequado da associação *Azolla*-arroz.

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Azolla* adaptadas à sombra e à luz solar plena, bem como analisar o efeito de níveis de densidade do fluxo radiante solar incidente sobre o crescimento, fixação de N_2 , pigmentação e fatores de adaptação luz/sombra em espécies de *Azolla*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em 4 de janeiro de 1988, em Viçosa, MG. As plantas de *Azolla* foram pré-cultivadas, em solução nutritiva sem N, a 50% da radiação solar incidente dentro da casa de vegetação, para obtenção de inóculo. Após a multiplicação, as espécies de *Azolla* foram infectadas, distribuindo-se três gramas de matéria fresca por bandeja de plástico (0,42 x 0,36 x 0,07 m), com 3,5 litros de solução nutritiva, que constituiu a unidade experimental.

As bandejas foram distribuídas numa superfície plana coberta por plástico, em ambiente natural. A solução nutritiva de macronutrientes utilizada foi a de Hoagland a 40% sem N (Hoagland & Arnon 1950) e a de micronutrientes a de Johnson et al. (1957) a 40%, renovada semanalmente. O pH da solução nutritiva foi mantido em torno de 5,3, sendo corrigido com NaOH ou HCl sempre que necessário.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, em parcelas subsubdivididas, com três repetições. Cada parcela correspondia a uma época de coleta do material vegetal, constituídas de três subparcelas, correspondentes às espécies de *Azolla* (*A. caroliniana*, *A. microphylla* e *A. pinnata*), sendo formadas por quatro subsubparcelas correspondentes aos níveis de radiação solar incidente (30, 50, 70 e 100%). O sombreamento artificial foi obtido com telas de plástico de cor preta, com pequeno efeito sobre a qualidade espectral da luz transmitida, as quais propiciaram 30, 50 e 70% de redução da radiação solar incidente (Melges et al., 1989).

As coletas foram efetuadas a intervalos regulares de quatro dias, durante o período de crescimento da *Azolla*, num total de sete coletas, a primeira, quatro dias após a inoculação. Em cada coleta, as plantas de *Azolla* foram retiradas manualmente e colocadas sobre tela por 30 minutos para drenar o excesso de água aderido às plantas; depois, determinou-se o peso de matéria fresca. A matéria seca foi obtida em estufa de ventilação forçada, à temperatura de 75 °C, até peso constante.

A taxa de crescimento diário da *Azolla* (G) foi calculada segundo a fórmula $G = 10(\log Y_v/t) - 1$, descrita por Yatazawa et al. (1980), em que Y_v é a razão de reprodução vegetativa, ou seja, a relação entre a matéria fresca produzida e a matéria fresca infectada, e t é o tempo de cultivo em dias.

O tempo de duplicação da massa verde (l_d) foi calculado por $l_d = (0,301 t) (\log Z_t/Z_0)^{-1}$, de acordo com Aziz & Watanabe (1983), sendo t o tempo de cultivo, Z_t e Z_0 as matérias frescas nos tempos t e zero, respectivamente.

O teor de clorofila foi determinado em amostras de 100 mg de massa fresca da parte aérea da *Azolla*, sendo extraída pelo método de Steffens et al. (1976) e o teor calculado conforme Arnon (1949).

O teor de antocianina foi determinado em 500 mg de massa fresca da *Azolla*, sendo extraída pelo método descrito por Tung & Watanabe (1983), e calculando pela fórmula de Creasy (1968). A absorvência encontrada foi convertida em moles de antocianina por 10 gramas de matéria fresca, usando o coeficiente de extinção molar de 34300 para absorção máxima a 530 nm (Siegelman & Hendricks 1958).

O N foi extraído da matéria seca por meio de digestão sulfúrica (Lindner, 1944) e dosado pelo método de Nessler (Umbreit et al., 1972).

A capacidade de fixação de N_2 foi calculada pela multiplicação da taxa de crescimento diária da matéria seca pela concentração de N na matéria seca da *Azolla*.

A temperatura da superfície da camada de *Azolla* foi medida às 9, 12 e 15 horas, em três dias nublados e três dias ensolarados, em todas as subsubparcelas, em três repetições, com o uso do termômetro a infravermelho Barnes, modelo PRT 10L, conforme descrição de Fuchs & Tanner (1966) e Hatfield (1979). Já a determinação da temperatura da solução nutritiva foi feita no mesmo esquema anterior, com termômetro comum. A radiação solar total incidente foi obtida com um solarímetro Kipp-Zonen, modelo CM6, acoplado a um milivoltímetro registrador. As temperaturas mínimas, máximas e médias, bem como a umidade relativa do ar, foram registradas por um termoigrógrafo Lambrecht, modelo 252. Todos os dados meteorológicos foram registrados no próprio local do experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A densidade do fluxo radiante solar (DFRS) (Fig. 1A) apresentou valores baixos nos oito primeiros dias após a inoculação e valores altos até o final do ciclo da *Azolla*. A baixa radiação solar nesse período foi consequência da alta nebulosidade da região, na época em que se realizou o experimento, conforme evidenciado na Fig. 1C. As temperaturas máxima e média do ar apresentaram variações semelhantes às da radiação solar. A temperatura mínima mostrou pequena variação durante todo o período experimental (Fig. 1B). A temperatura, radiação e umidade relativa média do ar situaram-se em torno das normais da região, naquela época do ano.

A temperatura da solução nutritiva e da superfície da camada de *Azolla* avaliada em dias nublados (Tabela 1) apresentou pequenas oscilações dentro e entre cada horário de medição e dentro de cada nível de luz. A temperatura da solução nutritiva e da superfície foram menores nos maiores níveis de sombreamento, em razão, principalmente, da redução da energia solar incidente sobre a camada de plantas.

As temperaturas da solução nutritiva e da camada de *Azolla*, avaliadas em dias ensolarados

(Tabela 2), dentro de cada horário de medição e em cada nível de luz, apresentaram pequenas oscilações, sendo maior na superfície das plantas, nos

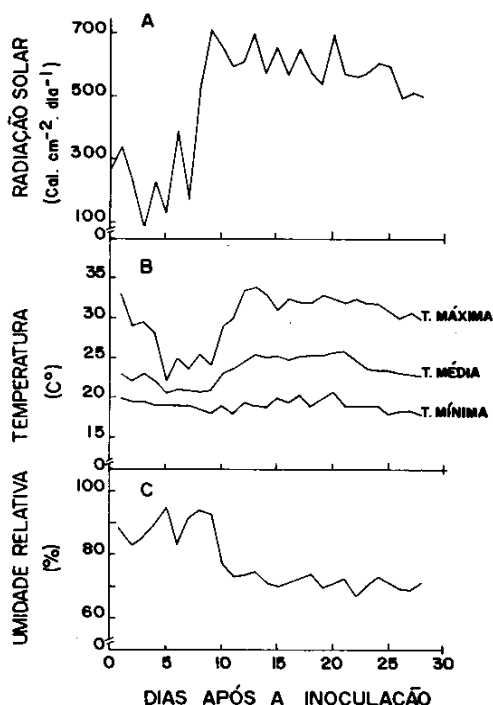


FIG. 1. Radiação solar total incidente (A), temperaturas máxima, média e mínima (B) e umidade relativa média do ar (C), no período de 04.01.88 a 31.01.88.

TABELA 1. Efeito de níveis de densidade do fluxo radiante solar (DFRS) na temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da água (A) e da superfície da camada de *Azolla* (B). Valores obtidos em três dias nublados (médias de três repetições).

Hora do dia	Nível de DFRS (%)							
	30		50		70		100	
	A	B	A	B	A	B	A	B
..9	25	25	25	25	26	26	27	28
12	26	26	26	27	27	28	29	29
15	25	26	26	26	28	26	27	26

TABELA 2. Efeito de níveis de densidade do fluxo radiante solar (DFRS) na temperatura (°C) da água (A) e da superfície da camada de *Azolla* (B). Valores obtidos em três dias ensolarados (médias de três repetições).

Hora do dia	Nível de DFRS (%)							
	30		50		70		100	
	A	B	A	B	A	B	A	B
9	25	25	25	25	26	28	26	29
12	30	29	30	31	33	35	34	36
15	30	29	31	30	34	34	35	35

maiores níveis de luz. As temperaturas da solução nutritiva e da superfície diminuíram com o aumento do sombreamento nos três horários de medição. Dentro de cada nível de luz, as temperaturas da solução nutritiva e da superfície foram maiores às 12 e às 15 horas.

Em dias nublados, a temperatura do substrato de crescimento e da superfície das plantas apresentou variação máxima de 3°C entre os níveis de 30 e 100% de luz incidente, enquanto essa diferença foi de 5 e 7°C em dias ensolarados. O decréscimo da temperatura nos tratamentos sombreados provavelmente diminuiu a atividade enzimática, a respiração e a produção de fitomassa.

Existe grande variabilidade entre as espécies de *Azolla* quanto à tolerância aos extremos de temperatura. Algumas espécies de *Azolla* podem sobreviver, por tempo variável, numa faixa de temperatura de -5°C a 45°C (Talley et al., 1977; Lumpkin & Pluckneet, 1982). Experimentos demonstraram que *A. mexicana* é capaz de resistir a maiores temperaturas ambientes que *A. pinnata* e que *A. filiculoides* cresce melhor a temperatura abaixo de 25°C. As temperaturas de 23°C, durante o dia, e 18°C, à noite, foram as mais favoráveis para *A. caroliniana* (Peters & Mayne, 1974).

A temperatura influi na fixação de N e na produção de fitomassa, sendo que a temperatura mais favorável para *A. pinnata* varia entre 20 e 30°C (Lumpkin & Pluckneet, 1980). Portanto, temperaturas superiores a 30°C, em dias ensolarados (Tabela 2), devem ter exercido influência negativa sobre a produção de fitomassa e o acúmulo de N nessa espécie.

Os resultados indicam que as espécies de origem americana, como *A. caroliniana* e *A. microphylla*, são mais adaptadas a temperaturas elevadas do que *A. pinnata*, de origem asiática.

A divergência dos dados na literatura sobre exigência e tolerância das espécies adaptadas de *Azolla* a temperaturas ótimas, infra e supra-ótimas provavelmente decorre dos diferentes métodos de avaliação empregados. No entanto, é certo que existem grandes diferenças entre os genótipos de *Azolla* quanto à adaptação aos extremos de temperatura. Iluminância média em torno de 40 a 60 klux que corresponde 1,8 a 2,7 cal.cm⁻².min⁻¹, temperatura entre 20 e 30°C e umidade relativa entre 80 e 90% são consideradas condições mais favoráveis ao crescimento das espécies de *Azolla* (Moore, 1969; Ashton, 1974; Becking, 1979; Lumpkin & Pluckneet, 1982; Fiore & Ruschel, 1982).

A produção de matéria fresca, média das três espécies na última colheita, presenteou, em função dos níveis de luz, tendência quadrática, alcançando valor máximo a 70% da radiação solar (Fig. 2). Entretanto, não se observaram diferenças

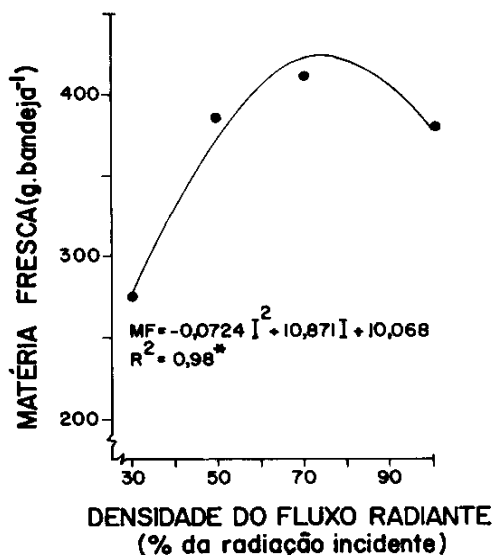


FIG. 2. Produção de matéria fresca de *Azolla* (média das três espécies), em quatro níveis de radiação solar incidente. *Significativo a 5% de probabilidades.

significativas ($P \leq 0,05$) na produção de matéria fresca entre os níveis de 50,70 e 100% de DFRS, e somente a produção obtida a 30% de DFRS foi inferior às demais ($P \leq 0,05$). Observou-se a tendência de diminuição da produção de matéria fresca entre 80 a 100% de DFRS.

A produção final de matéria fresca (Fig. 3) de *A. caroliniana* e *A. pinnata* em função dos níveis de DFRS, apresentou tendência quadrática, com pontos de máximo em 70 e 50% de luz, respectivamente. Já *A. microphylla* mostrou tendência linear, evidenciando maior adaptação a luz solar plena. Nos níveis de 30 e 50% de DFRS, não houve diferença significativa entre as três espécies de *Azolla*. Nos níveis de 70 e 100% de DFRS, a *A. pinnata* apresentou menor produção de matéria fresca que *A. caroliniana* e *A. microphylla*, que não diferiram entre si.

As três espécies dentro de todos os níveis de DFRS apresentaram taxa de crescimento diário (G) máxima (Fig. 4) em torno do oitavo dia após a inoculação, à exceção de *A. pinnata* a 100% de DFRS, que foi no 12º dia. Isso pode ser devido à

maior disponibilidade de espaço e nutrientes no início do período experimental, o que possibilitou alta taxa de crescimento. A menor G da *A. pinnata* a 100% de DFRS pode ter sido em razão de sua menor adaptação à luz solar plena.

Todas as espécies, dentro dos quatro níveis de DFRS, apresentaram menor tempo de duplicação (T_d) em torno do oitavo dia após a inoculação, exceto *A. pinnata* a 100% de DFRS, que foi no 10º dia (Fig. 5). Inicialmente, os valores de T_d foram altos, em razão, provavelmente, da diminuta quantidade de inóculo de *Azolla* e da pequena superfície foliar de captação da energia solar. Com o rápido aumento do crescimento da área foliar, alta disponibilidade de nutrientes e espaço para crescimento, o tempo de duplicação alcançou valores mínimos, e, em seguida, com a diminuição do espaço disponível, passou a ser fator limitante do crescimento, e a população de *Azolla* começou a crescer cada vez mais lentamente.

As três espécies de *Azolla* dobraram a fitomassa a cada dois ou três dias, durante a primeira semana de crescimento, sendo que na segunda

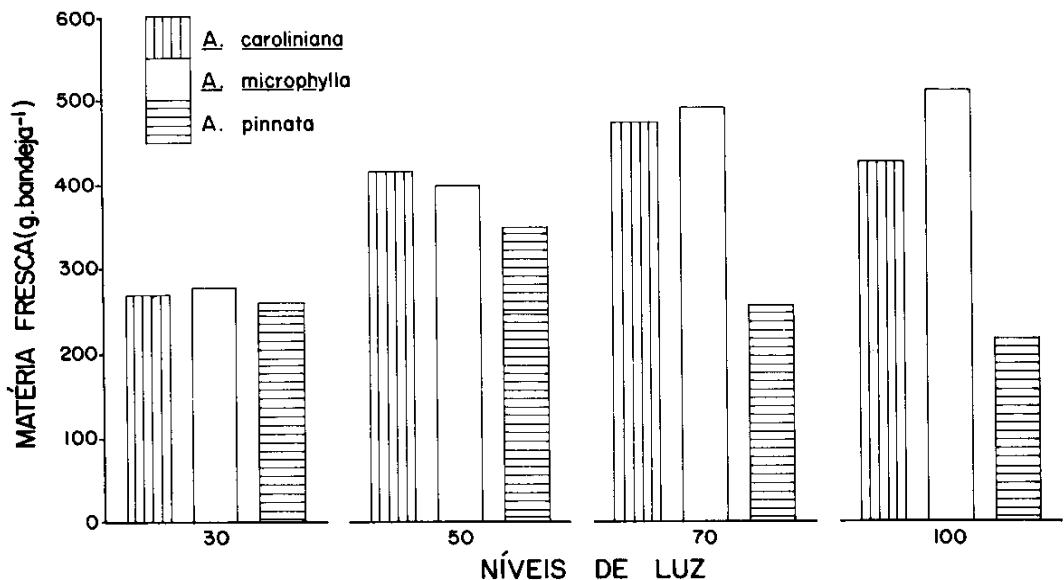


FIG. 3. Produção de matéria fresca de três espécies de *Azolla* em quatro níveis de radiação solar incidente, após 28 dias de cultivo.

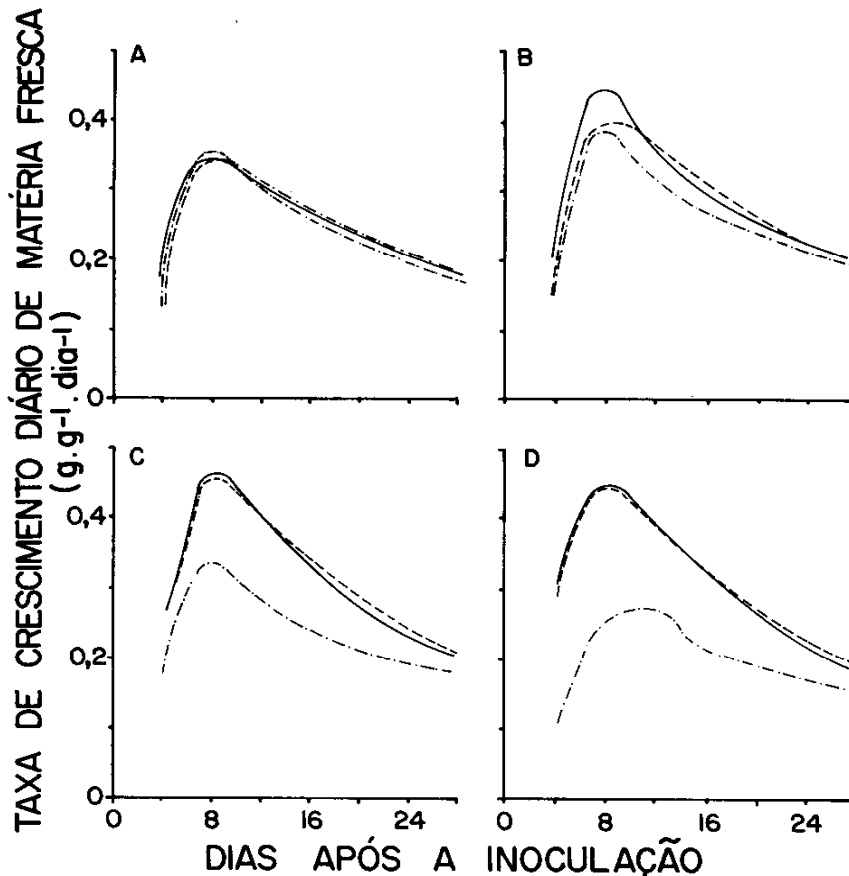


FIG. 4. Taxa de crescimento diário de matéria fresca de *A. caroliniana* (—), *A. microphylla* (---) e *A. pinnata* (- . - .), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%).

semana esse tempo aumentou, como resultado, certamente, da ocupação do espaço disponível. Tal fato também foi observado por diversos pesquisadores (Talley et al., 1977; Watanabe et al., 1977; Peters et al., 1980; Zimmerman, 1985a, 1985b).

Houve tendência de diminuição do teor de N (%) à medida que aumentaram a quantidade de matéria seca e os níveis de luz (Fig. 6). O teor de N diminuiu com o aumento de DFRS, em razão de maior produção de matéria seca e do efeito de diluição, fato também observado por Rocha et al. (1970). Não houve diferença significativa entre os teores de N das três espécies de *Azolla*, dentro dos

quatro níveis de DFRS. A 30 e a 70% de DFRS (Fig. G-AC), não houve efeito de época de colheita no teor de N, embora tenha sido observado pequeno declínio com a idade das populações de *Azolla*, enquanto a 50 e a 100% de DFRS (Fig. 6-BD) houve decréscimo significativo no teor de N à medida que aumentaram a idade da população e a quantidade de matéria seca produzida.

O teor de N variou entre 2,5 e 4,5%. Essa variação pode ter sido influenciada pelo efeito de diluição. A matéria seca de *Azolla* normalmente contém de 3 a 6% de N (Moore, 1969; Talley et al., 1977; Watanabe et al., 1977; Talley & Rains,

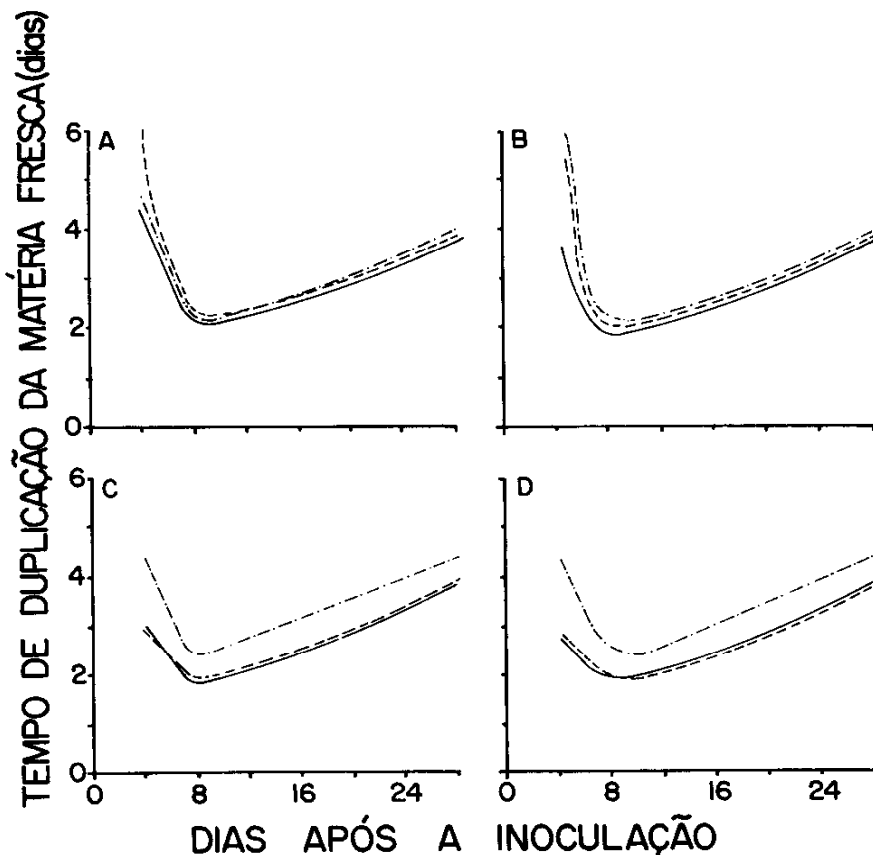


FIG. 5. Tempo de duplicação da matéria fresca de *A. caroliniana* (—), *A. microphylla* (---) e *A. pinnata* (-.-.-), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%).

1980; Ruschel, 1987). Os valores dentro dessa amplitude são extremamente influenciados pelas condições de crescimento, principalmente pela disponibilidade de nutrientes e variações da densidade do fluxo radiante.

A diminuição progressiva do N com o aumento da idade da população neste experimento está de acordo com os princípios gerais do crescimento de plantas. A fase de crescimento linear da *Azolla* é caracterizada pelo baixo teor de lignina, sendo que esse teor aumenta com o crescimento da população de plantas (Van Hove et al., 1987). Assim, o teor de N diminui progressivamente em velhos

segmentos e com a idade das plantas e há aumento correspondente na relação C/N (Kaplan & Peters, 1981).

O conteúdo de N seguiu tendência logística (Fig. 7). O conteúdo de N das espécies *A. caroliniana* e *A. microphylla* aumentou com os níveis de DFRS; Já *A. pinnata* aumentou até o nível de 50%, reduzindo drasticamente o conteúdo de N a 100% de DFRS. Em todos os níveis de radiação, *A. pinnata* apresentou menor conteúdo de N que *A. caroliniana* e *A. microphylla*, sendo esta diferença maior à medida que aumentaram os níveis de DFRS.

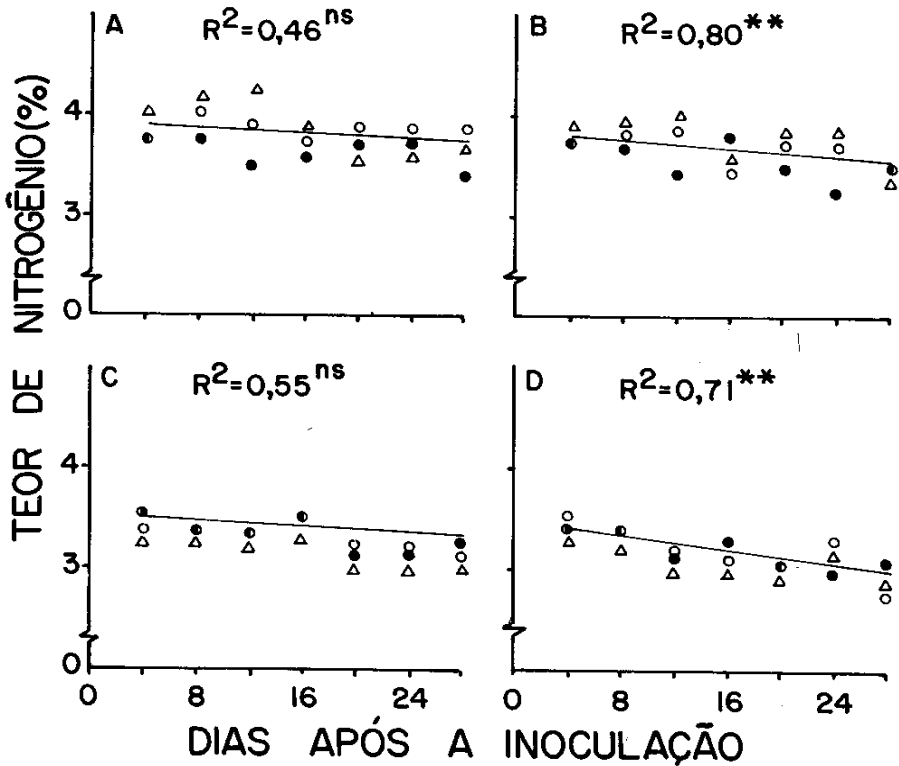


FIG. 6. Teor de nitrogênio de *A. caroliniana* (O), *A. microphylla* (•) e *A. pinnata* (Δ), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%). ns e ** não significativo e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente.

As espécies *A. caroliniana* e *A. microphylla* apresentaram pequenas diferenças no conteúdo de N durante a maior parte do período de 24 dias. A 30 e a 50% de DFRS (Fig. 7-AB), *A. caroliniana* apresentou maior conteúdo final de N que *A. microphylla*, invertendo essa situação a 70 e a 100% de DFRS (Fig. 7-CD).

O maior acúmulo de N (Fig. 7) e de crescimento (Fig. 2 e 3) evidencia que a eficiência da fixação de N_2 e do CO_2 está intimamente interligada e é fortemente dependente da radiação solar. Pelo processo de fotossíntese da *Azolla*, a energia solar armazenada nas ligações de carbono é utilizada pela *Anabaena azollae* na fixação do N_2 . Há dependência da luz para a atividade da nitrogenase que, em condições escuras e aeróbicas, depende das reservas de fotoassimilados, como fontes de

redutores (Peters & Mayne, 1974; Tyagi et al., 1981). Na ausência de luz, a nitrogenase tem como fator limitante o fornecimento de ATP. Assim, pode-se inferir que a maior atividade fotossintética, avaliada pela taxa assimilatória líquida, promoveu incrementos no acúmulo de matéria seca e nas taxas de crescimento e de crescimento relativo (dados a serem publicados), na taxa de fixação de N_2 (Fig. 8) e no conteúdo de N (Fig. 7).

As taxas de fixação de N_2 (Fig. 8) de *A. caroliniana* e *A. microphylla* foram tanto maiores quanto maiores os níveis de DFRS, enquanto as de *A. pinnata* aumentaram até o nível de 50%, diminuindo a seguir. *A. microphylla* apresentou os maiores valores máximos de taxa de fixação de N_2 de *A. pinnata* os menores (Fig. 8). Resultados obtidos por Ruschel (1987) mostram que *A. azollae*

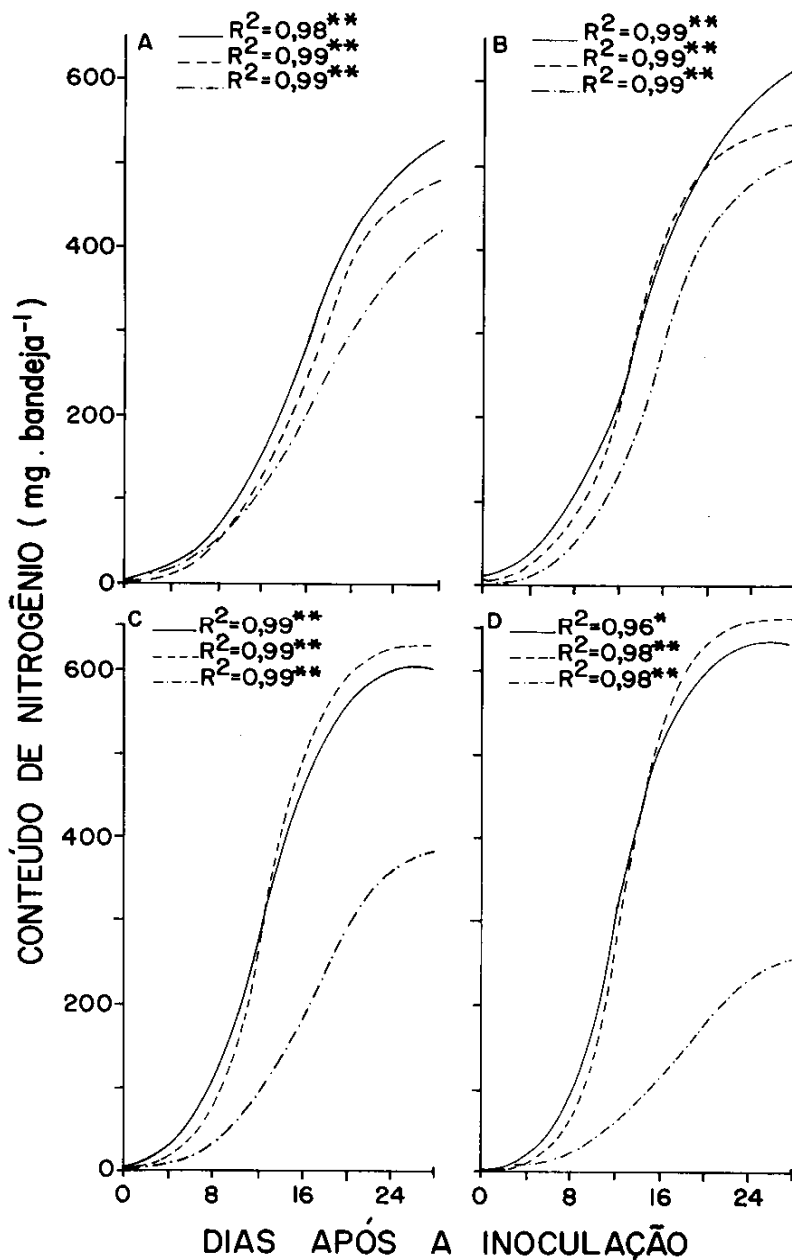


FIG. 7. Conteúdo de nitrogênio de *A. caroliniana* (—), *A. microphylla* (---), e *A. pinnata* (-.-.-), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%. * e ** significativos a 5 e a 1% de probabilidade, respectivamente.

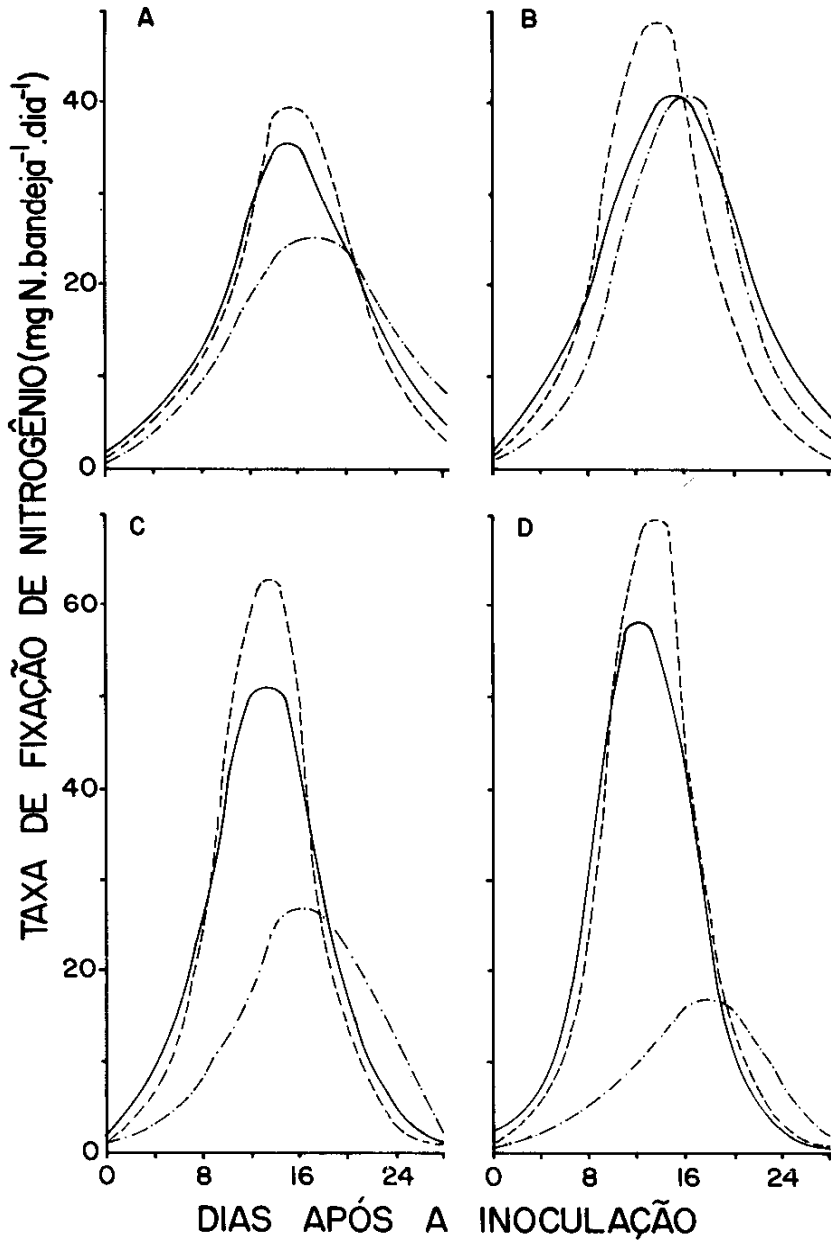


FIG. 8. Taxa de fixação de nitrogênio de *A. caroliniana* (—), *A. microphylla* (---) e *A. pinnata* (-.-.-), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%).

da *A. microphylla* e da *A. caroliniana* possuem maior capacidade de fixação de N_2 que das *A. filiculoides*, *A. mexicana* e *A. pinnata*, sendo que esta última apresentou a menor atividade da nitrogenase. Dados de Ashton (1974) demonstraram que a *A. pinnata* apresentou taxas de crescimento, de

fixação de N_2 e atividade da nitrogenase máximas em 50% da luz solar plena (40-60 klux), decrescendo rapidamente quando ultrapassou esse limite.

As três espécies, dentro dos quatro níveis de DFRS, apresentaram maior capacidade de fixação de N (Fig. 9) em torno do oitavo dia após a inocu-

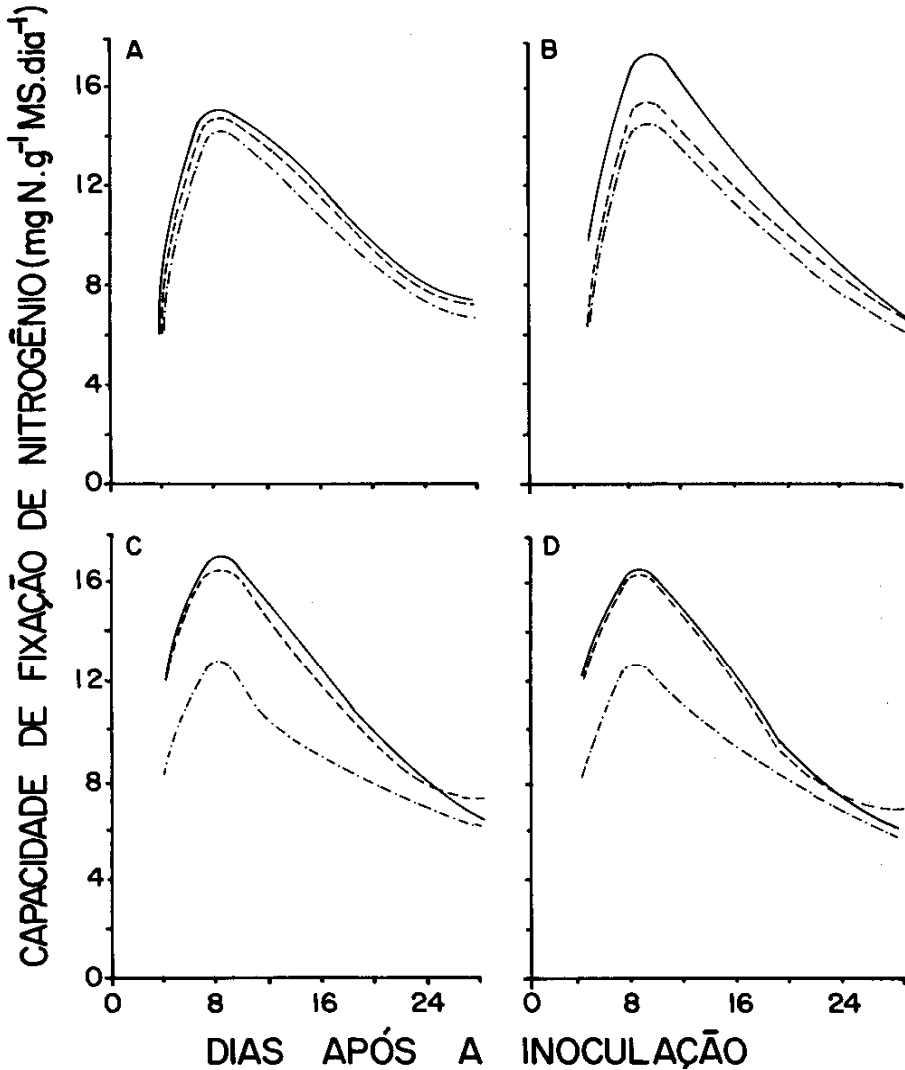


FIG. 9. Capacidade de fixação de nitrogênio de *A. caroliniana* (—), *A. microphylla* (---) e *A. pinnata* (-.-.-), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%).

lação, período em que a disponibilidade de nutrientes e de espaço eram mais favoráveis; período também de maior taxa de crescimento diário (Fig. 4), menor tempo de duplicação da matéria fresca (Fig. 5), maiores taxas de crescimento relativo, e assimilatória líquida e, grande eficiência de conversão de energia solar (dados a serem publicados).

Os valores da taxa de fixação de N_2 de cada espécie não apresentaram grandes diferenças entre os quatro níveis de DFRS. Embora o teor de N na matéria seca das espécies de *Azolla* tenha sido menor nos dois maiores níveis de DFRS. O efeito de diluição compensou, portanto, a maior produção de matéria seca e o menor teor de N nos dois maiores níveis de DFRS.

Nos quatro níveis de radiação, *A. pinnata* apresentou menor taxa de fixação de N_2 que *A. caroliniana* e *A. microphylla*, sendo essa diferença mais significativa nos níveis mais altos de DFRS. Apenas a 50% da radiação incidente, *A. caroliniana* apresentou maior taxa de fixação de N_2 que *A. microphylla*; nos demais níveis as duas espécies apresentaram valores de taxa de fixação de N_2 semelhantes.

Os teores de antocianina das três espécies de *Azolla* somente foram detectados nas maiores densidades do fluxo radiante (Fig. 10). A 30% de DFRS, não foi detectada a presença de antocianina nas três espécies de *Azolla*. A 50% de DFRS, embora visualmente algumas plantas apresentassem coloração avermelhada, não se detectou a presen-

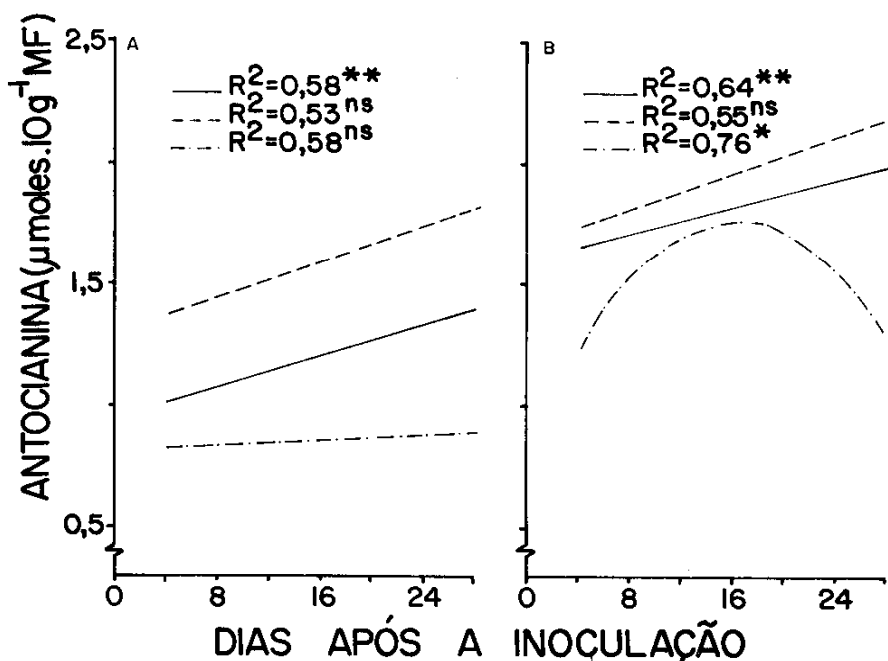


FIG. 10. Teor de antocianina de *A. caroliniana* (—), *A. microphylla* (- - -) e *A. pinnata* (- . - .), cultivadas em dois níveis de radiação solar incidente (A = 70 e B = 100%). * e ** significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

ça de antocianina, possivelmente em razão da interferência dos maiores teores de clorofila. A 70% de DFRS (Fig. 10A), o teor de antocianina da *A. caroliniana* aumentou linearmente com a idade da população, enquanto o teor de antocianina de *A. microphylla* e *A. pinnata* não foi influenciado pelas épocas de coletas. A espécie *A. microphylla* apresentou maiores teores de antocianina que *A. caroliniana*, e esta maior que *A. pinnata*.

Na radiação solar plena (Fig. 10B), o teor de antocianina da *A. caroliniana* aumentou linearmente com a idade das plantas. O teor de antocianina de *A. microphylla* aumentou de forma linear, mas este incremento não foi significativo, em razão da grande variação entre os dados. O teor de antocianina da *A. pinnata* evoluiu de forma quadrática, alcançando valor máximo em torno do 16º dia, após a inoculação. Ao comparar-se as três espécies, *A. microphylla* apresentou maiores teores de antocianina que *A. caroliniana* que, por sua vez, foram superiores aos da *A. pinnata*.

Além dos pigmentos fotossintéticos normais, clorofila e carotenóides, a maioria, mas nem todas as espécies e variedades de *Azolla*, produz o pigmento vermelho antocianina quando submetida a condições de estresse. O pigmento antocianínico encontrado na *Azolla* é o glicosídeo-5-luteolinidina e pode conter pequenas quantidades de glicosídeo apigenidina e alguns compostos fenólicos (Holst 1977).

Lumpkin & Pluckneet (1980) relatam que em períodos de estresse a antocianina possui a função de proteger o aparelho fotossintético contra danos causados por altas DFRS, absorvendo uma parte da luz e a convertendo em calor. A formação de antocianina é causada por fatores de estresse, os quais limitam a fotossíntese, como danos por insetos, deficiência de P, faixa desfavorável de pH, baixas e altas temperaturas.

O conteúdo de antocianina não correlaciona

com o crescimento nem com a atividade da nitrogenase (Holst & Yopp 1979). A indução da síntese de antocianina foi relacionada com o prolongado tempo de duplicação de clorofila e está associada com alta DFRS (Zimmerman 1985b). A função desse pigmento vacuolar não-fotossintético em *Azolla* pode ser, como em outras plantas, uma proteção do mesófilo foliar contra o excesso de radiação ultravioleta.

Os teores de clorofila aumentaram com a redução da densidade do fluxo radiante (Fig. 11). A 30% de DFRS (Fig. 11A), não houve diferença significativa nos teores de clorofila entre as três espécies de *Azolla*. A relação entre os teores de clorofila e a época de colheita foi quadrática. A 50% de DFRS (Fig. 11B), também não houve diferença nos teores de clorofila entre as três espécies de *Azolla*, que diminuíram de forma linear à medida que aumentou a idade das plantas. Nos níveis de 70 a 100% de DFRS (Fig. 11CD), os teores de clorofila diminuíram significativamente com o aumento da idade das plantas.

A *Azolla* tornou-se avermelhada nos maiores níveis de luz e manteve coloração verde-escura nos maiores níveis de sombra, fato também observado por outros autores (Moore, 1969; Brotonegro et al., 1981; Lumpkin & Pluckneet, 1982). Embora tenha havido aumento na síntese de antocianina (Fig. 10) e redução do teor de clorofila (Fig. 11), as espécies *A. caroliniana* e *A. microphylla* apresentaram maiores crescimentos (Fig. 3), conteúdo de N (Fig. 7) e taxa de fixação de N (Fig. 8) nos maiores níveis de DFRS. No entanto, as plantas mais superficiais mostram sinais visíveis de estresse, enquanto as da subsuperfície não apresentaram mudanças na pigmentação foliar, mostrando coloração verde normal. Portanto, esse fato conduziu à hipótese de que as plantas superficiais funcionaram como filtro a altas DFRS e que as plantas subsuperficiais continuaram fotossintetizando em níveis adequados para sustentar alta produção de matéria seca.

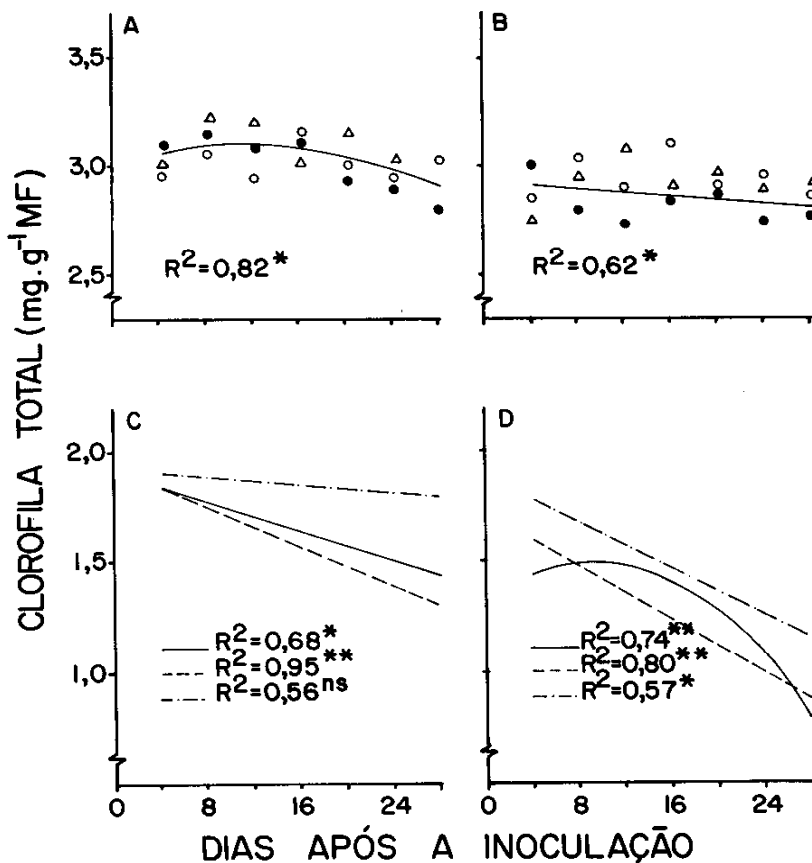


FIG. 11. Teor de clorofila total de *A. caroliniana* (o e —), *A. microphylla* (• e - - -) e *A. pinnata* (Δ e - . - .), cultivadas em quatro níveis de radiação solar incidente (A = 30, B = 50, C = 70 e D = 100%). ns, * e ** não significativo e significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

CONCLUSÕES

1. As taxas de crescimento diário de massa verde e de fixação do dinitrogênio da *A. microphylla* e *A. caroliniana* aumentaram com o incremento da densidade do fluxo radiante, enquanto *A. pinnata* apresentou melhor desempenho a 50% da radiação solar incidente.

2. A espécie *A. microphylla* mostrou ser mais adaptada à luz solar plena, seguida da *A. caroliniana*. Por outro lado, a *A. pinnata* foi a que mais se adaptou a 50% da luz solar incidente.

3. O teor de antocianina aumentou e o de clorofila decresceu com o incremento na densidade do fluxo radiante nas plantas da superfície, enquanto as da subsuperfície não apresentaram mudanças na pigmentação foliar, mostrando uma coloração verde normal.

4. As três espécies de *Azolla* dentro dos quatro níveis de luz apresentaram maior taxa de crescimento diário e menor tempo de duplicação de fitomassa em torno do oitavo dia após a inoculação, período em que a disponibilidade de nutrientes e espaço eram mais favoráveis.

REFERÊNCIAS

- ARNON, D.I. Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.
- ASHTON, P.V. The effects of some environmental factors on the growth of *Azolla filiculoides* Lam. In: INST. FOR ENVIR. SCI. **The orange river progress report**. Boen Fouten: University of the O.F.S., 1974. p.123-138.
- AZIZ, T.; WATANABE, I. Influence of nutrients on the growth and mineral composition of *Azolla pinnata* R. Br. (Bicol, Phillipines). **Bangladesh Journal of Botany**, v.12, p.166-170, 1983.
- BECKING, J.H. Environmental requirements of *Azolla* for use in tropical rice production. In: IRRI (Ed.). **Nitrogen and rice**, Los Baños, 1979. p.345-374.
- BROTONEGORO, S.; SUDJAD, M.; PARTOHARDJONO, S.; SUKIMAN, H.; PRIHATINI, T.; HENDRIKS, U. Some experiments on the use of *Azolla* for rice production in Indonesia. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C. (Eds.). **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali, Colombia: CIAT, 1981. p.567-573.
- CREASY, L.L. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. **Phytochemistry**, v.7, p.441-446, 1968.
- FIORE, M.F.; RUSCHEL, A.P. A associação *Azolla-Anabaena*, I. Biologia e significância na agricultura. **Ciência e Cultura**, v.34, p.792-798, 1982.
- FUCHS, M.; TANNER, C.B. Infrared thermometry of vegetation. **Agronomy Journal**, v.58, p.597-601, 1966.
- HATFIELD, J.L. Canopy temperatures: the usefulness and reliability of remote measurements. **Agronomy Journal**, v.71, p.889-892, 1979.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. [S.l.:s.n.], 1950, p.1-31. (Calif. Agr. Exp. Sta Bull., 347).
- HOLST, R.W. Anthocyanins of *Azolla*. **American Fern Journal**, v.64, p.99-100, 1977.
- HOLST, R.W.; YOPP, J.H. Studies of the *Azolla-Anabaena* symbiosis using *A. mexicana*. I. Growth in nature and laboratory. **American Fern Journal**, v.69, p.17-25, 1979.
- JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R.; BROYER, T.C.; CARLTON, A.B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, v.8, p.337-353, 1957.
- KAPLAN, D.; PETERS, G.A. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship. X. N₂ fixation and transport in main stem axes. **New Phytology**, v.89, p.337-346, 1981.
- LINDNER, R.C. Rapid analytical methods for some of the more common inorganic constituents of plant tissues. **Plant Physiology**, v.19, p.76-89, 1944.
- LUMPKIN, T.A.; PLUCKNET, D.L. *Azolla*: botany, physiology and use as green manure. **Economic Botany**, v.34, p.111-113, 1980.
- LUMPKIN, T.A.; PLUCKNET, D.L. ***Azolla* as green manure: use and management in crop production**. Boulder Westview Press, 1982. 229p.
- MELGES, E.; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A. Influência do sombreamento artificial nas condições microclimáticas na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.7, p.857-863, 1989.
- MOORE, A.E. *Azolla*: biology and agronomic significance. **Botanical Review**, v.35, p.17-35, 1969.
- PETERS, G.A.; MAYNE, B.C. The *Azolla-Anabaena* relationship. I. Initial characterization of the association. **Plant Physiology**, v.53, p.813-819, 1974.
- PETERS, G.A.; RAY, T.B.; MAYNE, B.C.; TOIA, R.E. *Azolla-anabaena* association: morphological and physiological studies. In: NEWTON, W.E.; ORME-JORNSON, H.H. (Eds.). **Nitrogen fixation**. Baltimore: Univ. Park Press, 1980. v.2, p.293-309.
- ROCHA, H.M.; ALVIM, P.T.; DÖBEREINER, J. Influência da intensidade da radiação solar sobre o crescimento e a fixação simbiótica do nitrogênio pela soja. **Turrialba**, v.29, p.293-298, 1970.
- RUSCHEL, A.P. Efeito sazonal sobre o desenvolvimento e fixação biológica de nitrogênio de diferentes espécies de *Azolla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.6, p.559-565, 1987.
- SIEGELMAN, H.W.; HENDRICKS, S.B. Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. **Plant Physiology**, v.33, p.185-190, 1958.
- STEFENS, D.; BLOS, I.; SCHOCH, S.; RUGIGER, W. Lichtablangigkeit der phytolakkumulation. Ein

- beitrag zur frage der chlorophyll biosynthese. *Planta*, v.130, p.151-158, 1976.
- TALLEY, S.N.; RAINS, D.W. *Azolla filiculoides*. Lam. as fallow-season green manure for rice in a temperate climate. *Agronomy Journal*, v.72, p.11-18, 1980.
- TALLEY, S.N.; TALLEY, B.J.; RAINS, D.W. Nitrogen fixation by *Azolla* in rice fields. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Basic life science; genetic engineering**. New York: Plenum Press, 1977. p.259-281.
- TUNG, H.F.; SHEN, T.C. Studies of the *Azolla pinnata-Anabaena azollae* symbiosis: growth and nitrogen fixation. *New Phytologist*, v.87, p.743-749, 1981.
- TUNG, H.F.; WATANABE, I. Differential response of *Azolla-Anabaena* associations to high temperature and minus phosphorus treatments. *New Phytologist*, v.93, p.423-431, 1983.
- TYAGI, V.V.S.; RAY, T.B.; MAYNE, B.C.; PETERS, G.A. The *Azolla-Anabaena azollae* relationship. *Plant Physiology*, v.68, p.1479-1484, 1981.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STEAUFFER, J.F. **Monometric and biochemical techniques**. 5. ed. Mineapolis, Minnesota: [s.n.], 1972. 387p.
- VAN HOVE, C.; BAILLONVILLE, T.W.; DIARA, H.F.; GODARD, P.; KOWOMI, Y.M.; SANGINGA, N. *Azolla* collection and selection. In: *AZOLLA* utilization. Manila: [s.n.], 1987. p.67-76.
- WATANABE, I.; BERJA, N.S.; DEL ROSARIO, D. Growth of *Azolla* in paddy field as affected by phosphorus fertilizer. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.26, p.301-307, 1980.
- WATANABE, I.; ESPINAS, C.R.; BERJA, N.S.; ALIMAGNO, B.V. **Utilization of the *Azolla-Anabaena* complex as a nitrogen fertilizer for rice**. Los Baños: IRRI, 1977. 15p. (IRRI Research Paper Series, 11).
- YATAZAWA, M.; TOMOMATSU, N.; HOSODA, N. Nitrogen fixation in *Azolla-Anabaena*, symbiosis as affected by mineral nutrient status. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.26, p.415-426, 1980.
- ZIMMERMAN, W.J. Biomass and pigment production in three isolates of *Azolla*. I. Responses to water stress. *Annals of Botany*, v.56, p.689-699, 1985a.
- ZIMMERMAN, W.J. Biomass and pigment production in three isolates of *Azolla*. II. Responses to light and temperature. *Annals of Botany*, v.56, p.701-709, 1985b.