

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO DE LEGUMINOSAS TROPICAIS UTILIZADAS COMO ADUBOS
VERDES COM RELAÇÃO AO PADRÃO DE ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E
MOBILIZAÇÃO DE FÓSFORO A PARTIR DE FOSFATO DE ROCHA**

ELI LINO DE JESUS

Tese submetida como requisito parcial para a
obtenção do grau de *Magister Scientiae* em
Agronomia, área de concentração em Ciência do
Solo.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1993

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

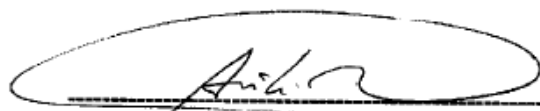
TESE SOB A ORIENTAÇÃO DE:

Prof. Dr. Avílio Antônio Franco (Embrapa - Agrobiologia / DS - IA - UFRRJ)

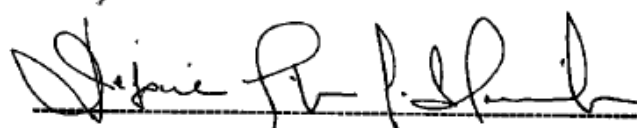
Prof. Dr. Dejair Lopes de Almeida (Embrapa - Agrobiologia / DS - IA - UFRRJ)

Prof. Dr. José Guilherme Marinho Guerra (Embrapa - Agrobiologia / DS - IA - UFRRJ)

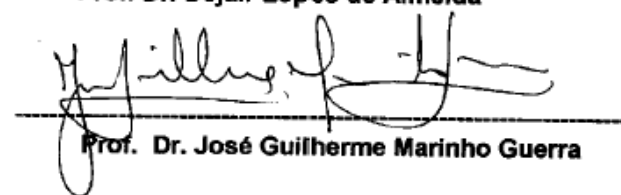
APROVADA EM 29/12/1993



Prof. Dr. Avílio Antônio Franco



Prof. Dr. Dejair Lopes de Almeida



Prof. Dr. José Guilherme Marinho Guerra

**“A Agricultura não é apenas
uma forma de cultivar plantas e
animais, mas sim de cultivar e
desenvolver os seres humanos”**

modificado de Masanobu Fukuoka

Dedico esta Tese:

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio constante.

Aos meus filhos, Hilarion, Davi e Aéolo, pela distância e saudade que esta Tese nos causou.

Às ex-companheiras, Suela e Anna Cecília pelo afeto e apoio durante a elaboração desta Tese.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de Agradecer, inicialmente, ao Dr. Avílio Antônio Franco, pela disposição em aceitar-me como seu orientado e pelo incentivo constante, pelos ensinamentos acerca dos caminhos da ciência experimental e pelo exemplo de dedicação ao estudo e ao serviço público.

Ao Dr. Dejair Lopes de Almeida, pela co-orientação e apoio, incentivo e colaboração constantes, pelo exemplo de dedicação à causa da Agricultura Familiar e Orgânica e ao serviço público.

Ao Dr. José Guilherme Marinho Guerra pela co-orientação, pelo apoio e incentivo constantes, além da grande amizade e do convívio fraterno e enriquecedor, no que incluo sua companheira, Vilma Buxbaum.

Aos colegas da turma de Mestrado (Arlene, Helga, Rosângela, Soraya, Terezinha, Ademir, Francisco, José Américo, José Guilherme, Ronaldo) pelo coleguismo, camaradagem, apoio e atenção.

Aos professores e funcionários do Departamento de Solos da UFRRJ, pelos ensinamentos e pelo apoio técnico - administrativo.

Aos pesquisadores e funcionários da Embrapa-Agrobiologia, pela assistência na instalação, acompanhamento, coleta e análise dos experimentos.

Ao acadêmico Nelson Geraldo de Oliveira, pelo o apoio na edição final do texto, das fotos e das figuras.

À CAPES (Coordenação de Apoio à Formação de Pessoal de Ensino Superior) pela bolsa de Mestrado e à FAPERJ (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro), também pela concessão de bolsa, o que permitiu o desenvolvimento e a elaboração deste longo trabalho de Tese.

BIOGRAFIA

Eli Lino de Jesus, nasceu em 11/10/1956, em Taubaté, no estado de São Paulo. Muito cedo sua família transferiu residência para a cidade do Rio de Janeiro, onde iniciou os estudos primários na Escola Manfredo DeLamare e na Escola Gonçalves Dias. Durante o transcorrer da quarta série do primário, nova transferência, desta feita para a cidade de Criciúma, em Santa Catarina, onde cursou a quarta e quinta séries, no Grupo Escolar Lapagesse. Nova transferência para a cidade de Blumenau, também em Santa Catarina, na qual foram cursados o Ginásio e o Científico, no Colégio Estadual Pedro II.

Prestou vestibular para o curso de Direito na FURB (Fundação Universidade da Região de Blumenau), tendo sido aprovado em sétimo lugar. Iniciou o curso de Direito, o qual no segundo ano foi abandonado, em prol do curso de Agronomia. Sendo que foi prestado novo vestibular e o ingresso deu-se em 1978, tendo sido concluído em 1982, na UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina) em Florianópolis.

Atuou como gerente-técnico e presidente da Coolabore - Cooperativa de Consumo e Produção Orgânica, em Florianópolis, SC, de 1982 a 1984, quando transferiu-se para Lages, em Santa Catarina, para atuar como assessor técnico do Instituto Viannei, entidade ligada ao PTA-FASE (Projeto Tecnologias Alternativas da Fundação de Assistência Social Educacional), depois conhecido como AS-PTA (Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa).

Em março de 1985 mudou para Itaguaí, no estado do Rio de Janeiro, iniciando o Mestrado na UFRRJ. O curso foi interrompido no início de 1987, para atuar como Consultor da Enco-Tahal (Engenharia e Consultoria Agrícola Ltda-*Tahal Consulting Engineers*). Retornou ao Rio de Janeiro em 1988, para assessorar o “Projeto Terra de Educar” em Paracambi, RJ. Em fins de 1988, retorna à UFRRJ/Embrapa, para retomar os trabalhos da Tese. Durante os anos de 1989 e 1990, são montados, colhidos e analisados os experimentos, é efetuada a análise estatística e redigida a Tese de Mestrado.

Em 1991, atuou como consultor do IBASE (Instituto Brasileiro de Análise Sociais e Econômicas), do Instituto Florestal de São Paulo e da AS-PTA, especialmente durante o Fórum Global em 1992. Neste ano retorna à AS-PTA, agora como coordenador do Programa de Solos e do Programa de Pesquisa e Educação em Agroecologia. Finalmente, em Dezembro de 1993 é defendida a presente Tese de Mestrado no Departamento de Solos da UFRRJ.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. CAPÍTULO I. Extrusão de prótons na rizosfera de diversas leguminosas tropicais adubadas com NO_3^- , NH_4^+ ou noduladas, avaliadas <i>in vivo</i> através de métodos semi-quantitativos	03
3. CAPÍTULO II. Balanço cátion-ânion: sua relação com a cinza alcalina e a extrusão de prótons em dez leguminosas tropicais noduladas.....	40
4. CAPÍTULO III. Eficiência de quatro leguminosas tropicais noduladas no aproveitamento de fosfato de Rocha de Patos.....	70
5. CAPÍTULO IV. Eletrodo de Antimônio: Construção e utilização no monitoramento do pH da rizosfera de plantas <i>in vivo</i> .(Anexo1	99
6. CAPÍTULO V. H^+ Extrusion and organic acid synthesis in N_2 fixing symbiosis involving vascular plants. By: John A. Raven; Avílio Antônio Franco; Eli Lino de Jesus and Jorge Jacob-Neto, New Phytologist, 114, 365-389, 1990. (Extrusão de prótons e síntese de ácidos orgânicos em leguminosas fixando N_2 simbioticamente. (Anexo 2, artigo publicado durante o desenvolvimento da presente Tese)	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área da rizosfera acidificada por diversas espécies de leguminosas cultivadas em minirrizotrons e submetidas a três fontes de nitrogênio.....	33
Tabela 2. Espécies de leguminosas cultivadas para o estudo da cinza alcalina, do balanço cátions/ânions e da extrusão de prótons.....	54
Tabela 3. Peso da matéria seca (g) da parte aérea e da raiz de 10 leguminosas tropicais cultivadas em vasos por 50 dias em casa de vegetação.....	55
Tabela 4. Conteúdo e cátions (meq.100 g ms ⁻¹) da parte aérea de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	57
Tabela 5. Acumulação total de cátions por planta em relação a produção de matéria seca de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	57
Tabela 6. Conteúdo de cátions (meq.100 g ms ⁻¹) da parte aérea de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	58
Tabela 7. Somatório de cátions, somatório de ânions, C ⁺ - A ⁻ e cinza alcalina de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	58
Tabela 8. Nitrogênio total da parte aérea de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	59
Tabela 9. pH do solo, pH do rizoplano e pH do rizocilindro de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	62
Tabela 10. Liberação de H ⁺ pela rizosfera de 10 leguminosas tropicais cultivadas por 50 dias em casa de vegetação.....	62
Tabela 11. Peso da matéria seca de 4 leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a quatro diferentes doses e duas fontes de fósforo.....	83
Tabela 12. Acumulação de cátions (Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺ + K ⁺ + NH ₄ ⁺ + Na ⁺) de 4 leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a quatro diferentes doses e duas fontes de fósforo.....	84
Tabela 13. Acumulação de fósforo de 4 leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a quatro diferentes doses e duas fontes de fósforo.....	84
Tabela 14. Porcentagem de fósforo de 4 leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a quatro diferentes doses e duas fontes de fósforo.....	85

Tabela 15. Porcentagem de nitrogênio de 4 leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a quatro diferentes doses e duas fontes de fósforo.....86

Tabela 16. Nitrogênio total de 4 leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a quatro diferentes doses e duas fontes de fósforo.....87

Tabela 17. Medidas de pH de soluções especiais com o uso de eletrodo padrão (vidro e calomelano) comparadas com o eletrodo de antimônio (Sb) e calomelano104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de minirrizotron desenvolvido para o experimento.....	08
Figura 2. Preparação dos filmes de Agar-Agar com indicador de pH.....	10
Figura 3. <i>Vigna unguiculata</i> (NO_3^-).....	18
Figura 4. <i>Vigna unguiculata</i> (N_2).....	19
Figura 5. <i>Vigna unguiculata</i> . (NH_4^+).....	20
Figura 6. <i>Lupinus albus</i> . (NO_3^-).....	21
Figura 7. <i>Lupinus albus</i> . (N_2).....	22
Figura 8. <i>Lupinus albus</i> . (NH_4^+).....	23
Figura 9. <i>Canavalia ensiformes</i> (NO_3^-).....	24
Figura 10. <i>Canavalia ensiformes</i> (N_2).....	25
Figura 11. <i>Canavalia ensiformes</i> (NH_4^+).....	26
Figura 12. <i>Calopogonium mucunoides</i> (NO_3^-).....	27
Figura 13. <i>Calopogonium mucunoides</i> . (N_2).....	28
Figura 14. <i>Calopogonium mucunoides</i> (NH_4^+).....	29
Figura 15. <i>Vigna angularis</i> (NO_3^-).....	30
Figura 16. <i>Vigna angularis</i> . (N_2).....	31
Figura 17. <i>Vigna angularis</i> (NH_4^+).....	32
Figura 18. Eletrodo de Sb (Antimônio): esquema de construção e modo de operação	102
Figura 19. Utilização do eletrodo de Sb, para medidas de pH de rizosfera de <i>Crotalaria juncea</i> in vivo, tratada com NH_4^+	106

RESUMO

O trabalho de Tese foi dividido em três capítulos e dois anexos. O primeiro capítulo (“Extrusão de prótons na rizosfera de diversas leguminosas tropicais adubadas com NO_3^- , NH_4^+ ou noduladas (N_2) avaliadas *in vivo* através de métodos semi-quantitativos”) teve o objeto de investigar o potencial de acidificação da rizosfera, através da extrusão de prótons, utilizando a metodologia qualitativa de Marschner *et al* (1982; 1983). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em mini-rizotrons, sendo que em torno de 30 dias após o plantio foram avaliadas.

O método demonstra-se eficiente e indicado para determinações preliminares, relativamente rápidas, quando trabalha-se com grande número de plantas e deseja-se caracteriza-las em grupos de maior, média ou menor capacidade de extrudir prótons e acidificar a rizosfera. Foram propostas modificações na metodologia, tanto no tocante ao tipo de mini-rizotrons, quanto na proposição de uma metodologia semi-quantitativa, a qual demonstrou-se rápida, eficiente e adequada aos objetivos do presente trabalho. As espécies que apresentaram elevada acidez rizosférica, quando noduladas (tratamento N_2) foram as seguintes: *Vigna unguiculata*; *Vigna mungo*; *Dolichos lablab*; *Lupinus albus*; *Trifolium subterraneum*, *Pueraria javanica*; *Arachis hypogae*; *Mucuna aterrima*; *Canavalia ensiformes*; *Calopogonium mucunoides*. Neste capítulo, também foi utilizado o Eletrodo de Antimônio (Sb) para algumas medições mais precisas, em determinados sítios da rizosfera das leguminosas *in vivo*. A construção e utilização deste eletrodo é descrita no anexo 1 da presente tese.

No segundo capítulo (“Balanço cátion-ânion: sua relação com a cinza alcalina e a extrusão de prótons em dez leguminosas tropicais noduladas”) foram cultivadas 10 espécies

de leguminosas, em vasos de quatro quilogramas de amostras de solo, em casa de vegetação. Tratou-se de quantificar a extrusão de prótons e a acidificação da rizosfera, através dos métodos convencionais, isto é medindo-se o pH do rizoplane, do rizocilindro e do solo. Foi também determinado o teor dos cátions e ânions do tecido vegetal, para efetuar o balanço cátions -ânions ($C^+ - A^-$) e comparar com os valores de cinza alcalina, já que na bibliografia, há uma correlação entre estes parâmetros, o que não verificou-se em nossas condições. Todas as dez espécies testadas promoveram a acidificação da rizosfera, sendo que *Canavalia ensiformes* apresentou a maior acidificação.

No terceiro capítulo (“Eficiência de quatro leguminosas tropicais noduladas no aproveitamento de fósforo a partir de fosfato de rocha de Patos”) foram cultivadas quatro espécies, em casa de vegetação, em vasos de quatro quilogramas de amostra de solo, onde testou-se o aproveitamento do fosfato de rocha, das espécies, que foram escolhidas à partir do primeiro e segundo capítulos, isto é, aquelas que promoveram boa resposta com relação a extrusão de prótons e a acidificação da rizosfera. Foi utilizado o fosfato de rocha de Patos (MG), em diferentes doses (0, 40, 80 e 160 kg.ha⁻¹) e uma dose de 80 kg.ha⁻¹ de super fosfato triplo). As espécies testadas foram *Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis*, *Mucuna aterrima* e *Mucuna deeringiana*. Não houve efeitos das doses e fontes de fósforo na produção de matéria seca. O fósforo parece não ter limitado o crescimento das plantas até o momento da coleta. Desta forma, como tratou-se de um experimento de casa de vegetação, recomenda-se a realização de experimentos de maior duração e em condições de campo, para que sejam obtidas respostas conclusivas referentes ao aproveitamento do fosfato de rocha pelas leguminosas.

No anexo 1 (“Eletrodo de Antimônio (Sb): construção e utilização no monitoramento do pH da rizosfera de plantas *in vivo*”) é descrita a construção e a utilização deste eletrodo no monitoramento do pH rizosférico de plantas *in vivo*. Os resultados obtidos com o eletrodo de antimônio(Sb)-calomelano, comparados com os métodos colorimétricos e com a calibração com tampões especialmente desenvolvidos para a aferição de pHmetros, medidos também com eletrodos de vidro-calomelano, permitem concluir que o Eletrodo de Antimônio (Sb) apresentou bons resultados e é adequado às medidas de pH *in vivo*, na ausência de soluções problema, como é o caso da interface solo-raíz, em mini-rizotrons.

No anexo 2 (“ H^+ extrusion and organic-acid synthesis in N_2 -fixing symbioses involving vascular plants, New Phytologist, 114, 369-389, 1990) foi apresentado este trabalho de revisão, pelo Dr. John Raven (Universidade de Dundee, Escócia, RU) do qual o autor da presente tese e seu principal orientador (Dr. Avílio Antônio Franco) participam como co-autores, também participou o Dr. Jorge Jacob-Neto (DF-IA-UFRRJ).

ABSTRACT

This thesis was divided in three chapters and two annexes. The first chapter (“Proton extrusion in the rhizosphere of several tropical leguminous plants fertilized with NO_3^- , NH_4^+ or nodulated (N_2) assessed *in vivo* with semi-quantitative methods”) was designed to investigate plant’s rhizosphere acidification power, using the qualitative methodology of MARSCHNER *et al* (1982) and MARSCHNER and RÖMHELD, (1983). The plants were cultivated in mini-rhizotrons and 30 days after planting they were evaluated.

It was demonstrated that the method fits with large screening experiments, with many species, for just a first characterization, separating plants in three groups: strong, moderated and weak acidification power. There were proposed improvements on the qualitative method of MARSCHNER *et al.* (1982) and MARSCHNER and RÖMHELD (1983) for a semi-quantitative approach.

Species that presented higher levels of rhizosphere acidification at N_2 treatment were: *Vigna unguiculata*; *Vigna mungo*; *Dolichos lablab*; *Lupinus albus*; *Trifolium subterraneum*, *Pueraria javanica*; *Arachis hypogae*; *Mucuna aterrima*; *Canavalia ensiformes*; *Calopogonium mucunoides*. In this chapter it was also used an antimon-electrode to measure *in vivo* rhizosphere pH. The construction and utilization of this electrode is described at annex 1.

In the second chapter (“Cation- anion balance: it’s relation to the ash alkalinity and to the proton extrusion in nodulated tropical legumes”). Ten species were cultivated in pots (4.0 kg of soil samples) in a greenhouse experiment. Proton extrusion was assessed through conventional methods, *i.e.*, rhizoplane, rhizocylinder and bulk soil pH measures.

Plant tissue cations and anions were determined (to make the $C^+ - A^-$) and the results were compared with ash alkalinity. There are data that support close relationship of $C^+ - A^-$ and ash alkalinity, although not confirmed on results presented here. All species tested acidified their rhizospheres and *Canavalia ensiformes* gave best acidification results.

In the third chapter (“Patos rock phosphate utilization efficiency of nodulated tropical legumes”) it was researched the ability of four tropical legumes in mobilizing phosphorus from low available sources. The experiment was a greenhouse one, with different treatments (0, 40, 80, and 160 kg.ha⁻¹ of Patos rock phosphate and 80 kg.ha⁻¹ with super triple phosphate). The species tested were chosen from previous experiments and were the following: *Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis*, *Mucuna aterrima* e *Mucuna deeringiana*. Phosphorus seems not to be limiting plants growth and in this way it is recommended that long run field experiments should be conducted to get conclusive answers about the ability of these plants in mobilize phosphorus from Patos rock phosphate.

Annexe 1 “Antimon-Electrode (Sb): construction and utilization for *in vivo* rhizosphere pH evaluation” it is described the construction and use of this electrode (Sb) to evaluate *in vivo* rhizosphere pH. Results obtained and compared with qualitative experiments and with glass-calomel electrode against antimon-calomel electrodes, using standard prepared buffers (from pH= 3,5 to pH= 8,0 in 0,5 to 0,5 pH scale) showed good results for *in vivo* measures, where solutions probes are not available, as in the case soil-root interfaces, in mini-rhizotrons.

Annexe 2 “H⁺ extrusion and organic-acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants” (New Phytologist, 114, 369-389, 1990). It was presented a scientific review, by Dr. John Raven (from the University of Dundee, Scotland, UK), with

participation from the present thesis author and the principal thesis advisor (Dr. Avílio Antônio Franco, Embrapa-Cnpab) also participated, Dr. Jorge Jacob-Neto (DF-IA-UFRRJ).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crise energética da década de setenta e a crise econômica das décadas de oitenta e noventa, levantaram sérias dúvidas sobre a sustentabilidade do modelo agrícola hegemônico, baseado na intensiva demanda de energia, proveniente, na maior parte das vezes, de fontes não renováveis, como o petróleo. Por outro lado, o impacto ambiental causado pelo uso indiscriminado de fertilizantes industrializados e pesticidas, tem levado os cientistas e a sociedade, à busca de alternativas de produção que sejam viáveis economicamente e sustentáveis energeticamente, apresentando um menor impacto ambiental e humano.

A abordagem científica mais avançada e adaptada à busca de modelos agronômicos equilibrados, vem dando ênfase à utilização de plantas e microorganismos eficientes na mobilização e na utilização dos nutrientes. Os agroecossistemas precisam também ser orientados, de forma a alcançar os objetivos conservacionistas e produtivos, acima especificados.

Dentre os mecanismos biológicos, um que se destaca é o da fixação biológica de nitrogênio do ar atmosférico. As quantidades de nitrogênio que podem ser introduzidas em um agroecossistema via fixação biológica, são de tal ordem, que pode-se até prescindir da compra deste importante insumo. No entanto, com relação ao fósforo, elemento bastante escasso em solos do Brasil, ao menos em termos de disponibilidade às plantas, ainda são necessários maiores estudos para assegurar a sua reciclagem e o fornecimento do nutriente,

de forma segura, prescindindo das fontes solúveis e industrializadas de fósforo, as quais demandam enormes quantidades de energia.

Estimativas recentes , GUERRA (1992), indicam que o cultivo continuado dos cerrados brasileiros, usando-se uma dose anual de 40 kg de P_2O_5 por hectare, esgotariam as reservas brasileiras de fósforo em cerca de 100 anos. Sabe-se ainda, que 80 a 90% dos superfosfatos aplicados aos solos tropicais tornam-se indisponíveis, principalmente através da fixação em óxidos e hidróxidos de alumínio e ferro. Dessa forma, sistemas agrícolas que possam ser eficientes, tanto no aproveitamento do N_2 atmosférico, quanto na mobilização reciclagem e utilização de fósforo, oriundos de fosfatos naturais, teriam grande importância no estabelecimento de agroecossistemas mais eficientes e adaptados às condições predominantes no Brasil. A acidificação da rizosfera de plantas fixando biologicamente o N_2 atmosférico, poderia também contribuir no aumento da eficiência do uso de fosfatos naturais.

O objetivo do presente trabalho é : a) conhecer a resposta de diversas leguminosas, com relação a intensidade de acidificação de suas rizosferas: b) estudar a relação entre a acidificação da rizosfera, o balanço cátion-ânion e a cinza alcalina: c) estudar a relação entre a geração da acidez na rizosfera das leguminosas e a mobilização e o aproveitamento de fósforo, a partir de fontes pouco solúveis, como de rochas fosfatadas de reservas brasileiras.

2. CAPÍTULO I

**EXTRUSÃO DE PRÓTONS NA RIZOSFERA DE DIVERSAS
LEGUMINOSAS TROPICAIS CRESCENDO EM NO_3^- , NH_4^+
OU NODULADAS (N_2) AVALIADA *in vivo* ATRAVÉS DE
MÉTODOS SEMI-QUANTITATIVOS**

2.1 INTRODUÇÃO

A acidificação ou alcalinização na rizosfera das plantas é comandada por diversos fatores, entre os quais se destaca a forma iônica com que o nitrogênio é absorvido. A assimilação do íon NH_4^+ no citoplasma celular produziria, pelo menos, um H^+ por NH_4^+ assimilado, ao passo que a fixação de N_2 geraria entre 0,1 e 0,2 H^+ por N assimilado. Já a assimilação de NO_3^- consumiria um H^+ por N assimilado. O excesso, tanto de H^+ quanto de OH^- , dependendo da forma como o N é assimilado, são neutralizados através de mecanismos como: carboxilação / descarboxilação; “pH stat” bioquímico ou através de transporte até as raízes, onde ocorreria a extrusão, conforme discutido por RAVEN e SMITH (1976).

Na maior parte das plantas, cultivadas em solos aerados, a forma predominante de nitrogênio que é absorvida é o NO_3^- , mas no caso das leguminosas, a forma predominante é o N_2 atmosférico, via fixação simbiótica. Neste caso, ocorre um excesso de cargas positivas, pois sendo o nitrogênio absorvido numa forma neutra (N_2), o somatório de cátions absorvidos excede o somatório de ânions absorvidos, resultando num excesso de cargas positivas, desencadeando o mecanismo de extrusão de prótons, para reequilibrar o pH citoplasmático das plantas (ISRAEL e JACKSON, 1978). Essa acidificação, devido ao desequilíbrio de cargas é a acidificação mais significativa, sendo ainda adicional àquela gerada pela assimilação do N_2 via fixação simbiótica (RAVEN et al. 1990).

Além dos aspectos fisiológicos a acidificação da rizosfera também pode interferir na mobilização de nutrientes tendo, dessa forma, importância agrônômica. A disponibilidade de fósforo às plantas pode ser substancialmente afetada pela acidificação da rizosfera

(BLAIR *et al.*, 1971; RILEY e BARBER, 1971; SMILEY, 1974; SOON e MILLER, 1977; MARSCHNER *et al.*, 1982). Além disso, a solubilidade de fosfatos de rocha, também pode ser aumentada pela extrusão de prótons (AGUILAR e DIEST, 1981; BEKELE *et al.*, 1983).

Embora o ciclo completo do nitrogênio no solo seja neutro HELYAR (1976), pode ocorrer a acidificação do solo cultivado com leguminosas, dependentes da simbiose como, como relatado por HAYNES (1983) e NYATSANGA e PIERRE (1973). Essa acidificação pode ocorrer, nos casos em que parte da planta, ou grãos, sejam retirados do sistema. No caso da adubação verde, quando toda a planta é incorporada ao solo, não há acidificação, a não ser pela remoção do NO_3^- por lixiviação, ou então, erosão (FRANCO e SOUTO, 1983).

Os trabalhos de NYATSANGA e PIERRE (1973), mostraram que uma fixação de N_2 atmosférico, de 270 kg de N por hectare, seria responsável pela geração de uma acidez, a qual necessitaria de 600 kg de CaCO_3 por hectare, para ser neutralizada.

No caso de plantas usadas para a adubação verde, em alguns casos, é possível substituir a adubação nitrogenada, pela incorporação desse material ao solo, conforme demonstrado por CHADA e DE POLLI (1988). Outros trabalhos tem evidenciado a capacidade das leguminosas em mobilizar fósforo, a partir de fontes pouco solúveis, como os fosfatos de rocha (SILVA *et al.*, 1985), permitindo então o aproveitamento do fósforo por outras espécies, contribuindo para a melhoria da eficiência dos sistemas agrícolas (AGUILAR e DIEST, 1981).

As plantas apresentam variação com relação a capacidade de acidificar a rizosfera. Segundo MARSCHNER e RÖHMHELD (1983); HÄUSSLING, (1985) e

RÖMHELD(1986), essa diferença depende da espécie vegetal, da variedade, da forma iônica da fonte nitrogenada, e do tampão do solo em relação ao pH, entre outros fatores. Mesmo entre as leguminosas, ocorrem variações, havendo espécies que, apesar de adubadas com nitrato, ainda assim provocam acidificação na rizosfera, como no caso do grão de bico (MARSCHNER e RÖMHELD, 1983), amendoim (SCHALLER e FISCHER, 1985), feijão-de-porco (ASHER e EDWARDS, 1983). RAVEN *et al* . (1990), apresentam uma lista com diversas leguminosas, na qual é possível observar diferenças em relação a acidificação da rizosfera em diferentes espécies, submetidas a fixação biológica de N₂ atmosférico.

É amplamente conhecido, o fato de que as leguminosas desempenham um importante papel na manutenção e melhoria da fertilidade dos solos. Esse fato se deve, a incorporação de matéria orgânica e principalmente de nitrogênio, aos sistemas agrícolas. No entanto, a possibilidade de que as leguminosas possam vir a contribuir para a melhoria da fertilidade dos solos, com relação ao fósforo, foi levantada mais recentemente, por diversos autores AGUILAR e DIEST (1981); GARDNER *et al* . (1982); BEKELE *et al* . (1983); MARSCHNER (1985); MARSCHNER (1986) e SWART e DIEST (1987). Esse efeito depende principalmente, da capacidade leguminosa em ser eficiente na mobilização e absorção do fósforo, a partir de fontes pouco solúveis.

Existem poucas informações a respeito do potencial de acidificação da rizosfera das leguminosas tropicais, levantando-se inclusive a hipótese de que essas plantas gerariam menos acidez do que as leguminosas de clima temperado (ANDREW e JOHNSON, 1976). Torna-se necessário então, conhecer melhor o comportamento dessas espécies tropicais, com relação a acidificação da rizosfera.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a acidificação da rizosfera de diversas leguminosas tropicais, com potencial para uso como adubo verde, utilizando-se da metodologia de avaliação *in vivo*, desenvolvida por MARSCHNER *et al* . (1982); MARSCHNER e RÖHMHELD (1983). É proposto ainda um procedimento metodológico semi - quantitativo para a metodologia qualitativa, descrita pelos autores acima.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em minirrizotrons, com capacidade para 1,0 kg de solo. Os minirrizotrons foram construídos a partir do modelo de MARSCHNER *et al* . (1982), com adaptações, substituindo-se o “plexiglass” por vidro sendo a armação adaptada a partir de FRITZSCH (1989, comunicação pessoal). Consistia de um tubo de borracha transparente dobrada, dentro do qual passava um fio de metal resistente mas dobrável, formando um arco entre dois vidros. Cada vidro tinha 30 x 30 cm. Todo este conjunto era fixado com tiras de borracha vulcanizada. Veja a Figura 1.

Utilizou-se os 20 cm superficiais de solo Podzólico Vermelho-Amarelo - série Itaguaí, com as seguintes características: pH = 4,7 ; Al = 0,4 meq.100 gcm⁻³; Ca = 2,3 meq.100 g cm⁻³; Mg = 1,9 meq.100 cm⁻³; K = 47 ppm; P = 2,1 ppm; C = 0,75 % e N = 0,058 %. O pH do solo utilizado foi corrigido para pH 6,2 com calcáreo dolomítico, através de curva de calagem, para que ficasse compatível com a faixa de atuação do indicador de pH utilizado na avaliação da acidez. Os demais nutrientes foram corrigidos na base de 120 kg.ha⁻¹ de K₂O, para K e 180 kg .ha⁻¹ de P₂O₅ para P. Foi aplicada uma solução nutritiva

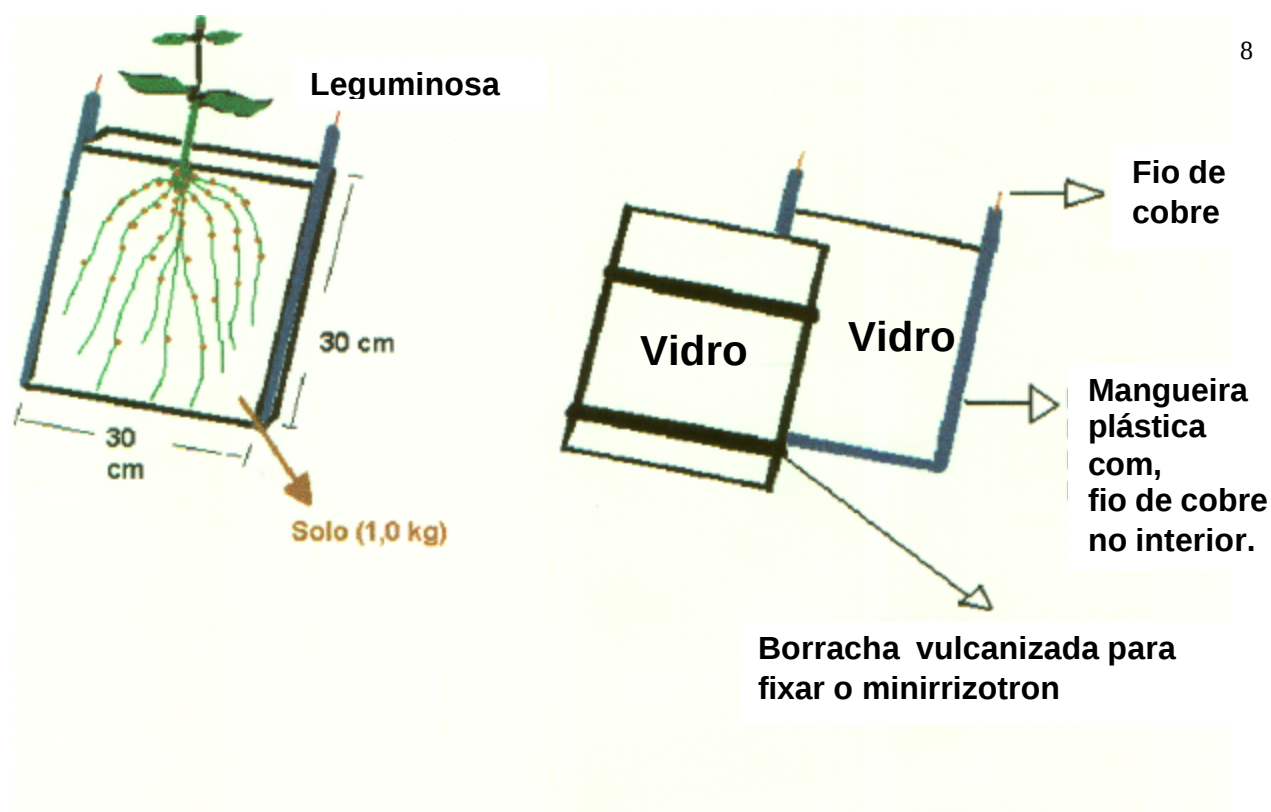


Figura 1. Modelo de minirrizotron desenvolvido para o experimento

completa de micronutrientes, mais Mg e S. Os tratamentos constaram de três fontes de nitrogênio: NO_3^- { $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ }; NH_4^+ { $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ } e N_2 (fixação biológica de N_2 com rizobio específico para cada espécie). O nitrogênio foi fornecido na dose de 66 mg N.kg^{-1} de solo, correspondendo a aproximadamente 132 kg.N.ha^{-1} . A aplicação do N foi dividida em quatro doses, aos 7, 14, 21 e 28 dias após o plantio. Para a extrapolação de kg de solo para hectare, considerou-se $2,0 \times 10^6 \text{ kg}$ de solo em um hectare.

Os minirrizotrons foram dispostos em três bandejas, uma para cada tratamento nitrogenado, e em cada bandeja colocava-se 10 minirrizotrons em cada avaliação. Eles eram dispostos de forma inclinada, procurando o ângulo de 45° , para permitir o desenvolvimento radicular na interface solo/vidro. Após cerca de 30 dias, os minirrizotrons eram retirados das bandejas e colocados em posição horizontal. Os vidros eram então

retirados e sobre a superfície do solo e das raízes, eram aplicados os filmes de agar com indicador de pH, conforme descrito por MARSCHNER et al . (1982) e MARSCHNER e RÖMHELD (1983), com as modificações que serão descritas no próximo parágrafo. Após o tempo necessário para a reação completa do indicador de pH (de 2 a 3 horas), foram tomadas fotos coloridas. Em seguida , filmes plásticos de 30cm x 30 cm foram aplicados sobre o agar-agar, com as mudanças de cor (no caso amarela) já desenvolvidas e foram feitos desenhos, contornando as áreas acidificadas, os quais foram posteriormente coloridos com caneta preta adequada . Estes filmes plásticos, com os desenhos das áreas acidificadas, foram então passados em equipamento medidor de área foliar e desta forma foi obtida uma medida da capacidade dessas espécies em acidificar suas rizosferas. Em alguns casos, também foram realizadas medidas de pH em microsítios, com um eletrodo de antimônio, construído conforme descrito em SCHALLER e FISCHER (1981) e MARSCHNER e RÖMHELD (1983), vide Anexo 1.

Preparação dos filmes de Agar - Agar com Indicador de pH

Foram usados, por litro de solução: 20 g de agar - agar Difco, 0,35 g de Ca SO_4 e 0,06 g de Púrpura de Bromocresol. Após a adição desses reagentes a um balão volumétrico, adicionou-se água destilada, até completar o volume desejado. Corrigiu-se o pH, utilizando-se KOH, para $\text{pH} = 6,8$. Após a fervura, colocou-se a solução numa forma de vidro pré-aquecida, com dimensões de 30 cm x 30cm. Após o resfriamento, os filmes de agar - agar foram armazenados em refrigerador, até o momento de uso. Para ter uma

melhor visualização do processo de preparação dos filmes de agar-agar, com indicador de pH, veja a Figura 2.

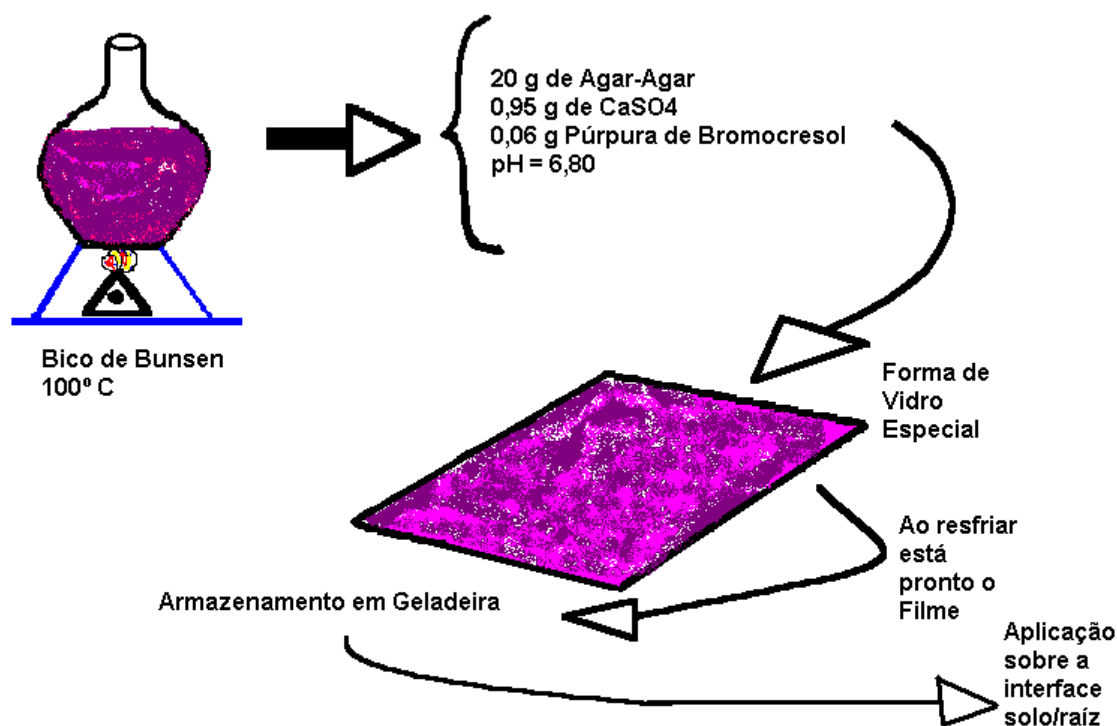


Figura 2 Preparação dos filmes de agar-agar com indicador de pH

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido ao número relativamente grande de espécies para serem testadas e a disponibilidade reduzida de minirrizotrons, a seleção preliminar, realizada para separar espécies com comportamento contrastante foi realizada sem repetições. Além disso, trata-se de um método semi - quantitativo, que fornece uma razoável informação sobre a acidificação na rizosfera das leguminosas, podendo servir como método preliminar de caracterização e seleção.

De forma geral, a acidificação da rizosfera das plantas testadas foi maior no tratamento com NH_4^+ , tendo o tratamento N_2 uma acidificação intermediária e o tratamento NO_3^- a menor e em alguns casos, nenhuma acidificação. Em diversas espécies houve nodulação no tratamento com NO_3^- , indicando que a quantidade de N adicionado não foi suficiente para inibir completamente a nodulação. Isto explica porque os resultados com NO_3^- não provocaram uma maior alcalinização do meio, conforme seria esperado, a partir de outros relatos (MARSCHNER e RÖMHELD, 1983 e RAVEN *et al.* 1990).

As fotos de um a onze, são exemplos do desenvolvimento de coloração no Agar-Agar mais Púrpura de Bromocresol, representando a acidificação (amarelo) ou alcalinização (violeta). As figuras de número três a dezoito, foram obtidas a partir de filmes plásticos colocados sobre o Agar-Agar, nos quais desenhou-se as áreas ácidas com caneta especial. Esses desenhos foram posteriormente coloridos de preto e passados no medidor de área foliar, obtendo-se uma área (cm^2) que representa a capacidade de acidificação da rizosfera da planta, constituindo uma semi-quantificação do método qualitativo de MARSCHNER, *et al.* 1982 e MARSCHNER e RÖMHELD, 1983.

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos a partir do estudo de dezoito espécies de leguminosas, tanto tropicais quanto temperadas. As fotos de um a onze são exemplos de algumas das plantas cultivadas nos minirrizotrons, nas quais foram avaliadas as áreas acidificadas, conforme descrito no Material e Métodos, para a elaboração da tabela 1.

Entre as espécies que promoveram os maiores resultados referentes a área acidificada, encontramos tanto espécies de origem tropical quanto temperada. Isto indica a possibilidade de que entre as leguminosas tropicais também possa-se encontrar espécies com alto potencial de acidificação da rizosfera. Além disso, a maior área acidificada no

tratamento N₂, foi observada em *Vigna unguiculata*, altamente adaptada a solos tropicais ácidos, de regiões úmidas. Isto contraria a hipótese de ANDREW e JOHNSON (1976), que afirmaram que as espécies de origem tropical, acidificariam menos a rizosfera, do que as espécies de clima temperado, adaptadas a solos menos ácidos.

Alguns trabalhos tem relatado a acidificação da rizosfera, mesmo quando a fonte de nitrogênio é o NO₃⁻ (ASHER e EDWARDS, 1983; SCHALLER e FISCHER, 1985 e MARSCHNER e RÖMHELD, 1987).

Foto 1. Cores desenvolvidas à partir dos padrões de pH (conforme o *Chemical Handbook*, 1984), aplicados ao agar-agar com Púrpura de Bromocresol. Amarelo Forte pH= 4,0 Violeta Forte pH=7,0, intermediários de 0,5 em 0,5 pH).

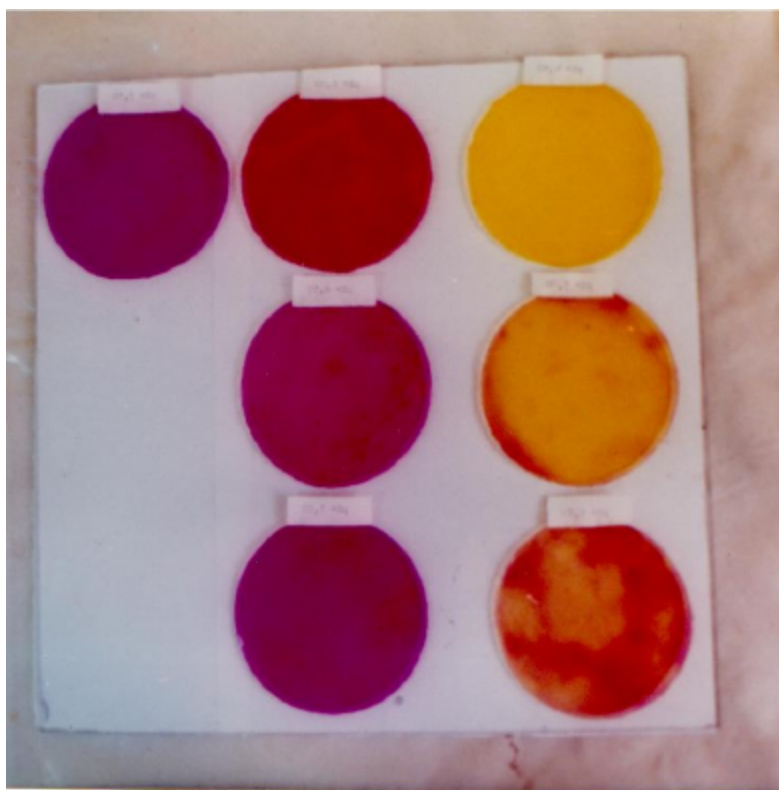


Foto 2. *Glycine max*, tratamento N_2 , mostrando detalhe de intensa acidificação. Observar presença de nódulos.



Foto 3. *Vigna mungo*, tratamento NO_3^- , mostrando a esperada alcalinização, mas com áreas de acidificação próximas aos nódulos.

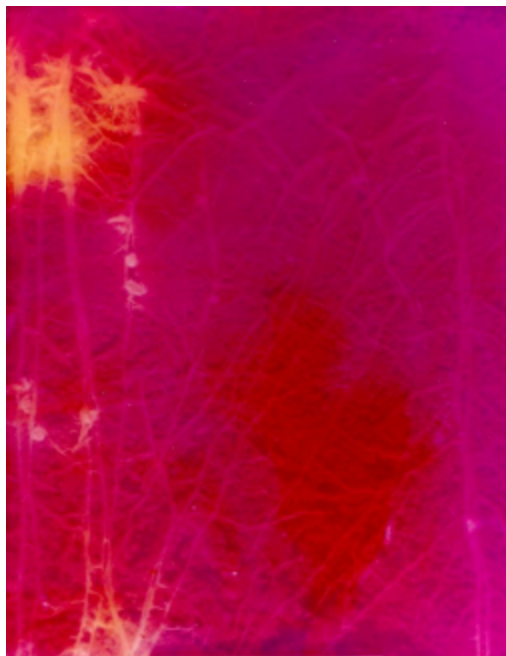


Foto 4. *Vigna mungo* N₂



Foto 5. *Vigna mungo* NH₄⁺

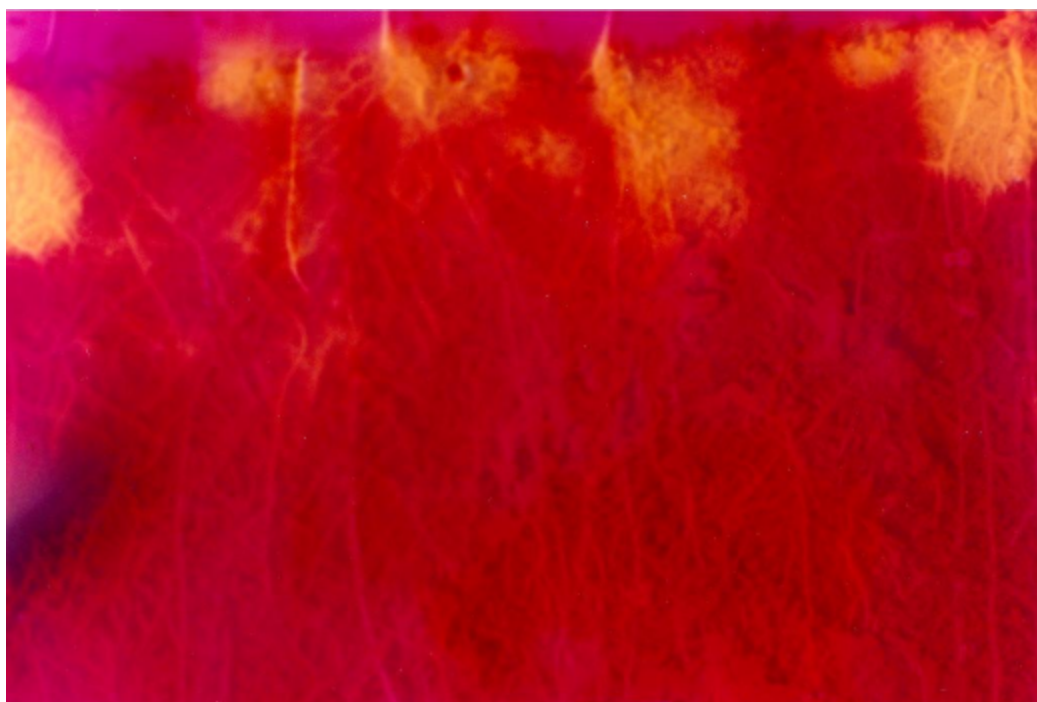


Foto 6. *Lupinus albus*, tratamento NO_3^- , mostrando alcalinização forte e pequenos pontos de acidificação



Foto 7. *Lupinus albus* N_2

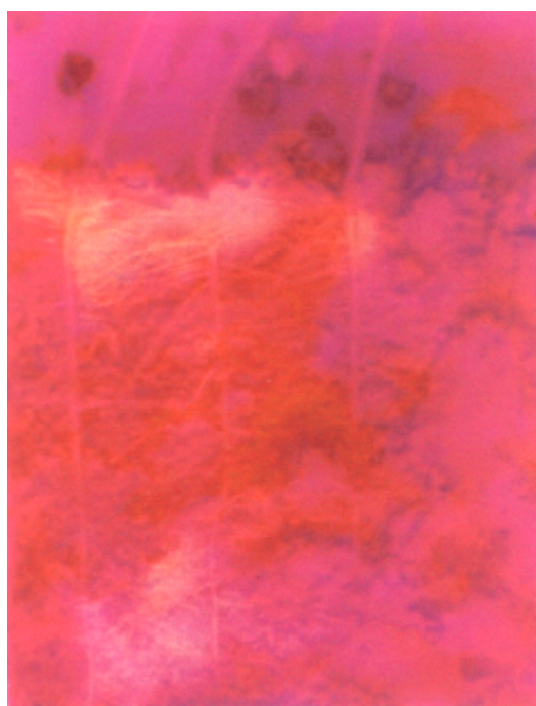


Foto 8. *Lupinus albus* NH_4^+

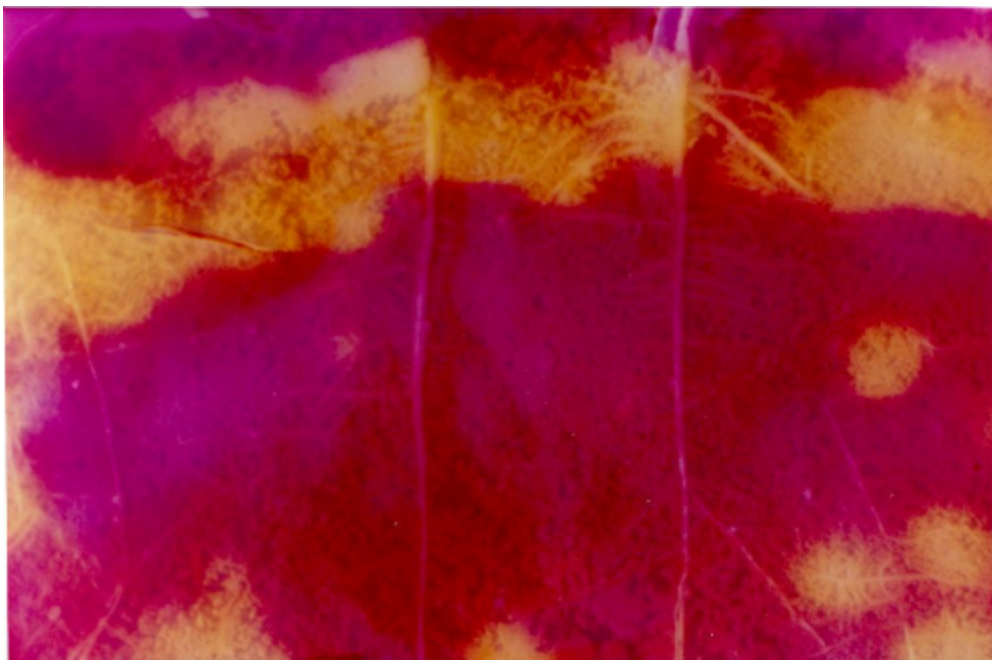


Foto 9. *Mucuna deeringeana* NH_4^+ , mostrando um padrão de acidez homogêneo em toda a rizosfera.



Foto 10. *Phaseolus vulgaris*, tratamento NH_4^+ , apresentando um padrão de acidez concentrado no colo radicular.



Foto11. Visão geral da casa de vegetação, em primeiro plano aparecem as cubas com os minirizitrons. Em cada cuba, está um tratamento nitrogenado. À esquerda aparecem os vasos do Experimento II desta Tese.



Figura 3 a 18. Representação da área acidificada na rizosfera, obtida através do uso de filmes plásticos aplicado sobre Agar-Agar mais púrpuro de bromocresol e posteriormente quantificado no medidor de área folhar.

Figura 3.

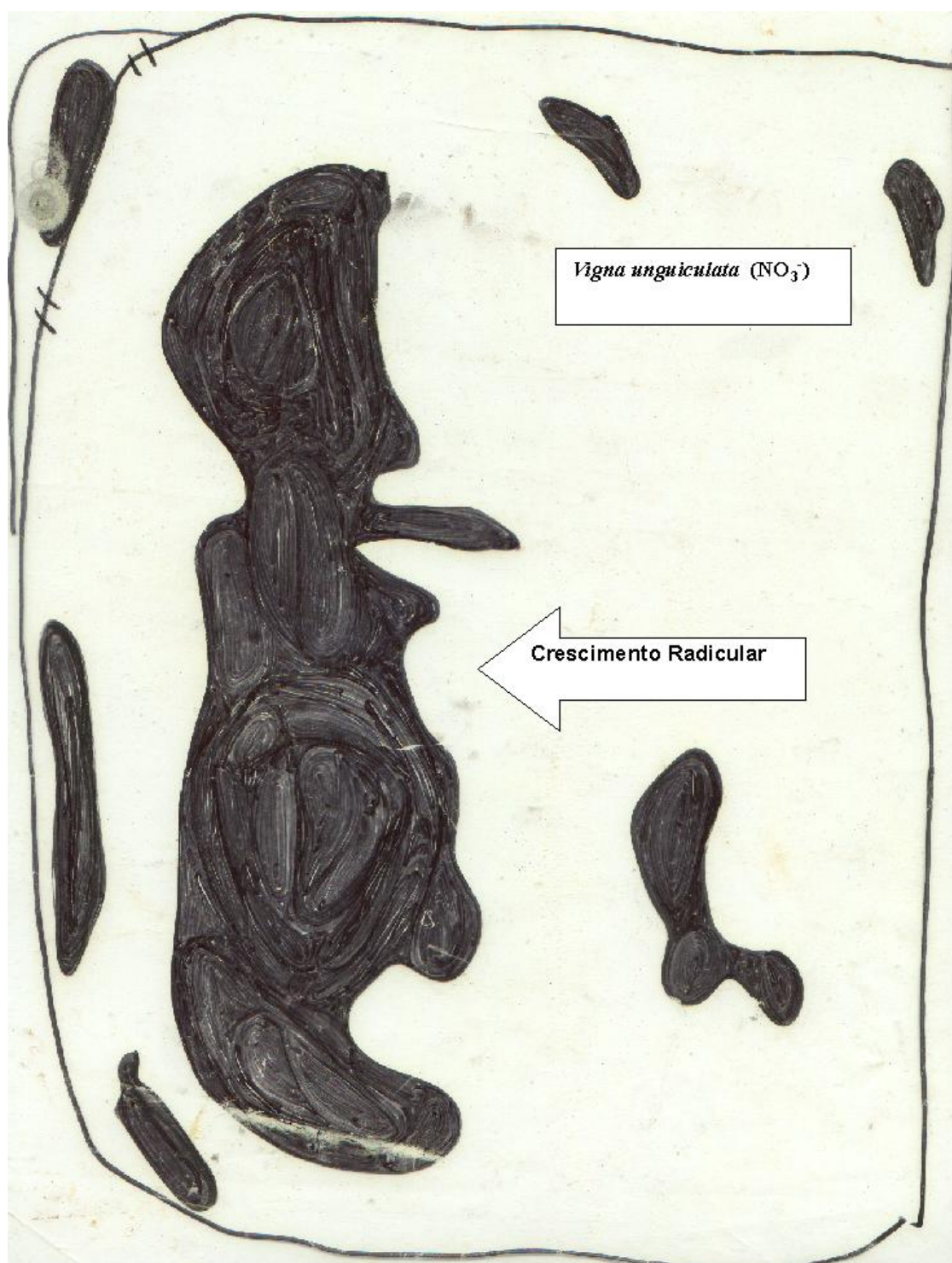


Figura 4.

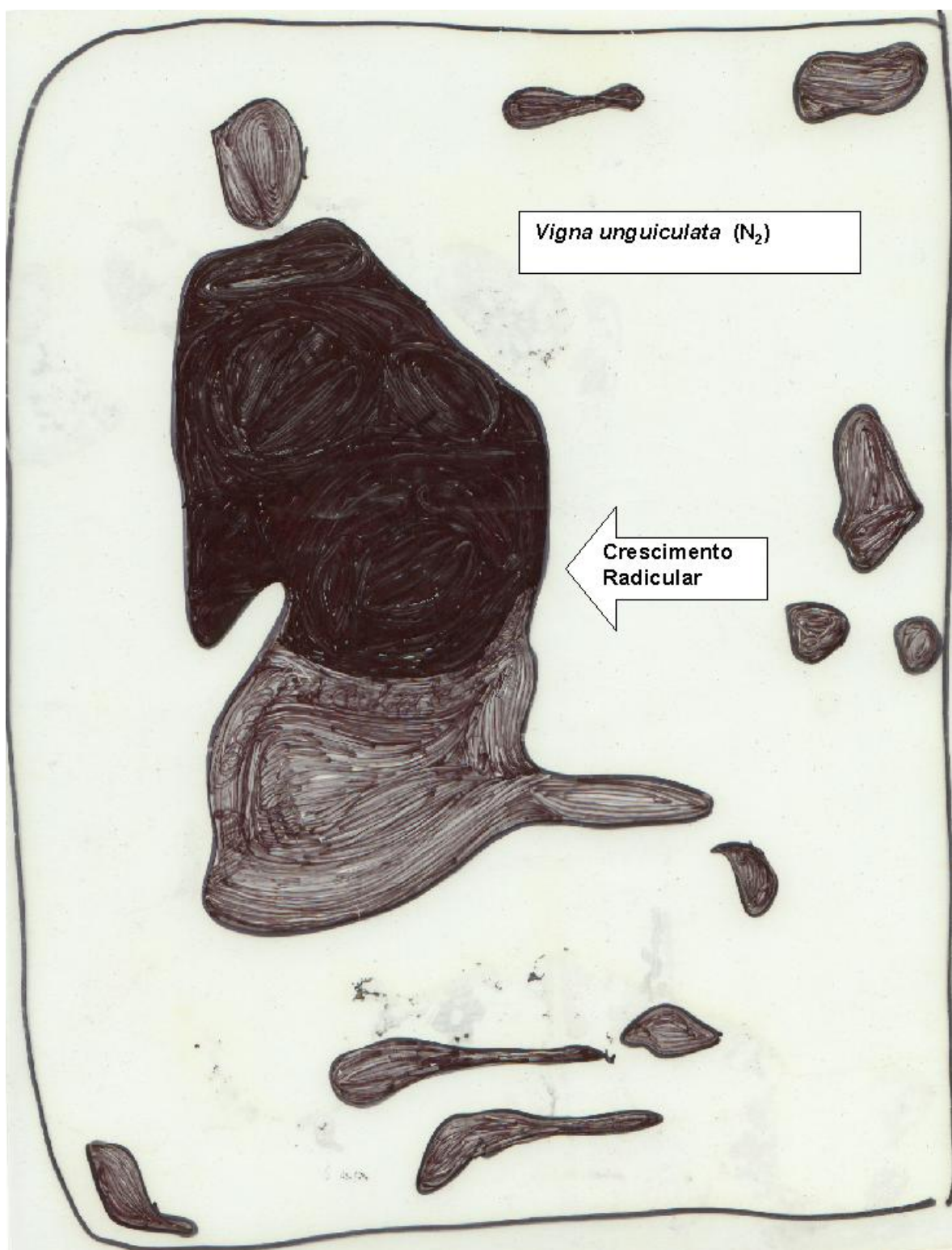


Figura 5.

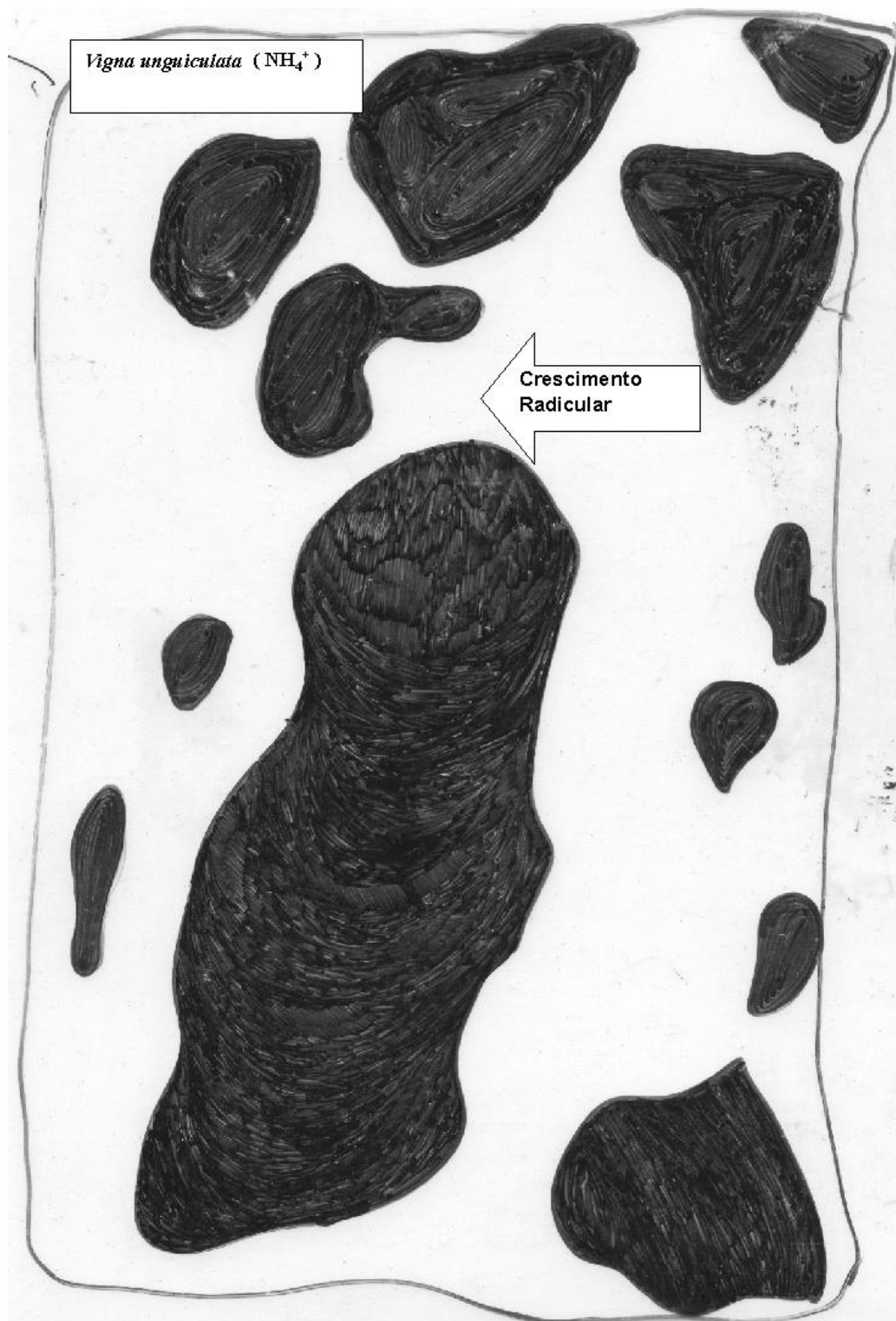


Figura 6.

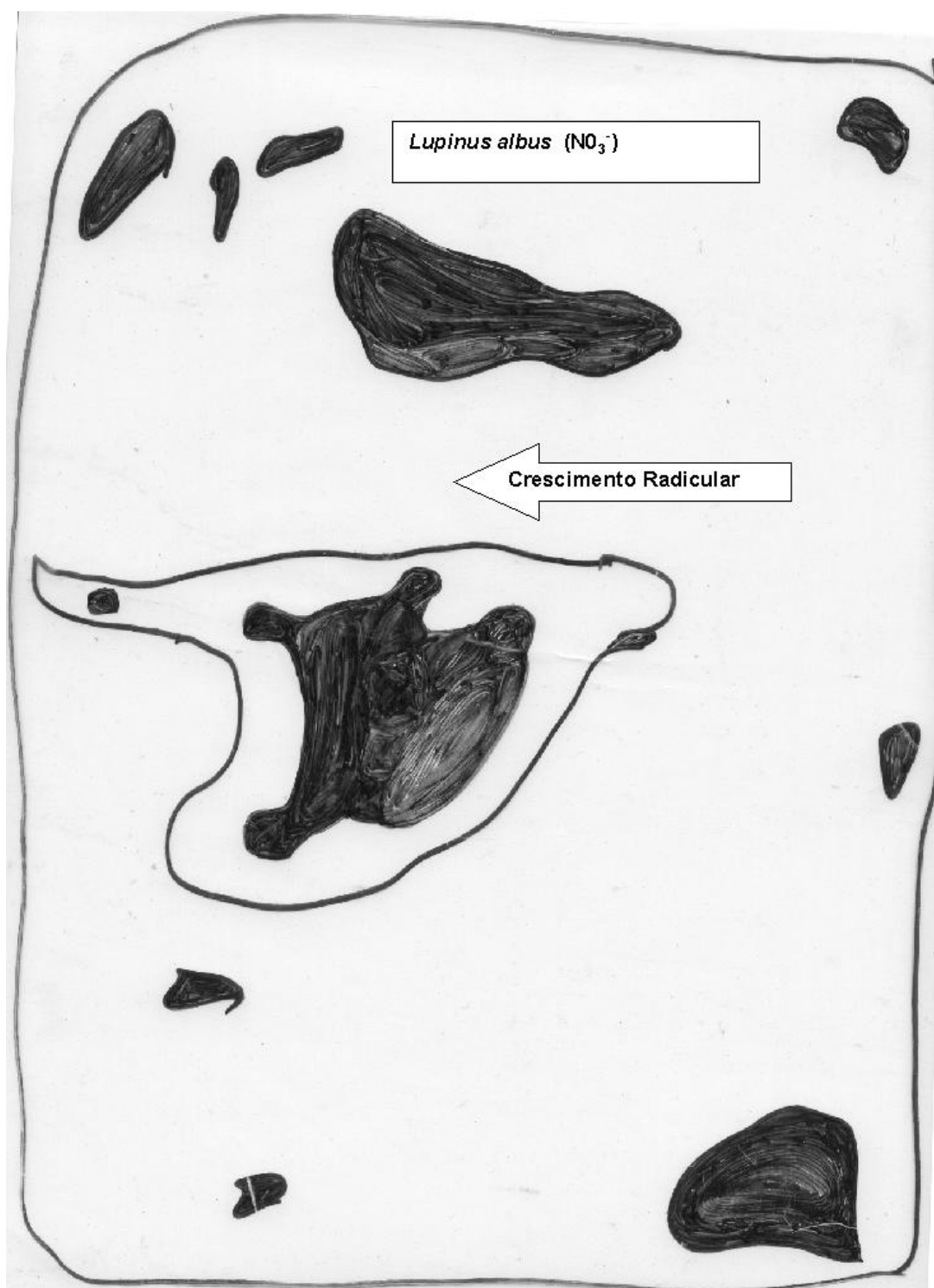


Figura 7.

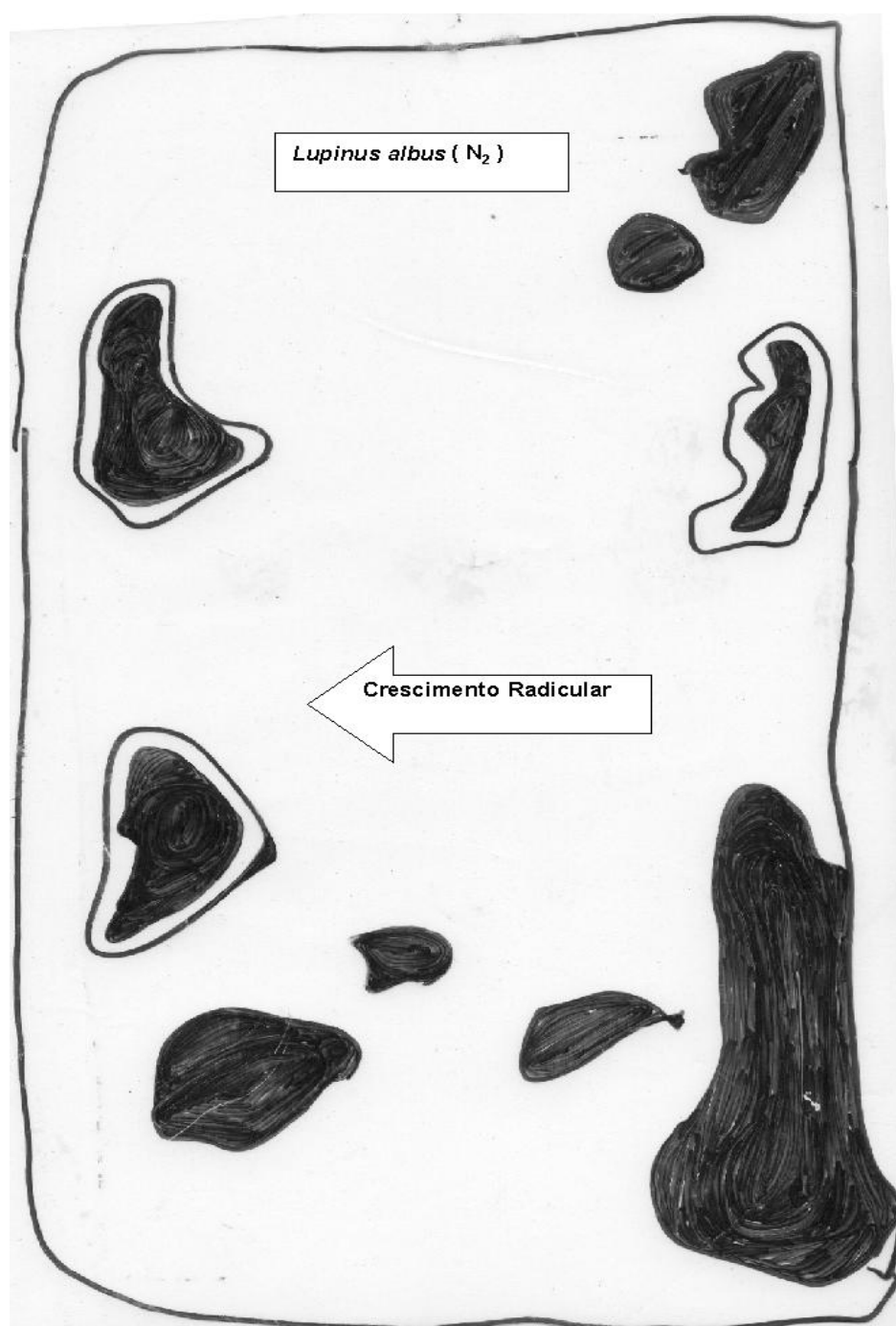


Figura 8.

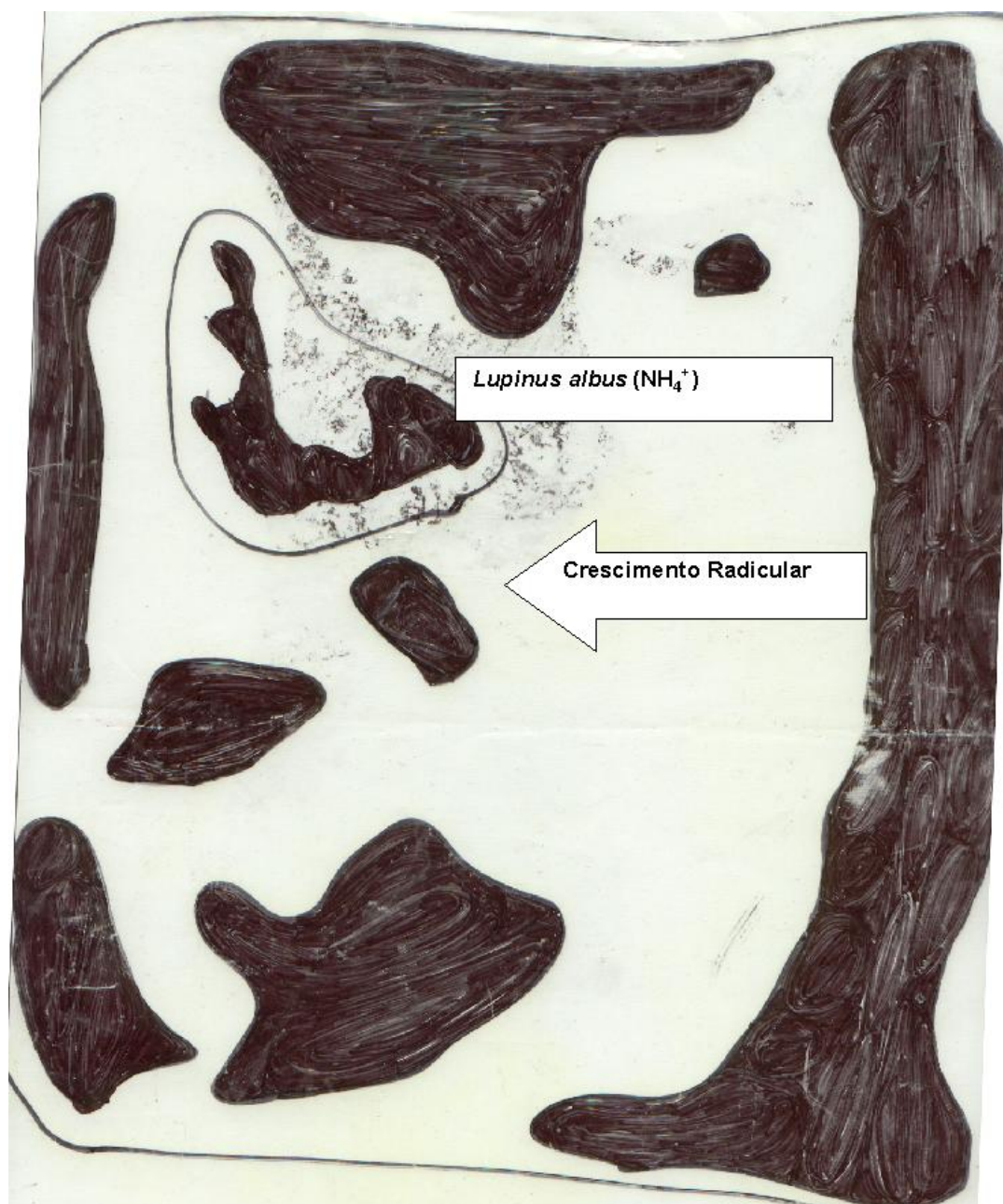


Figura 9.

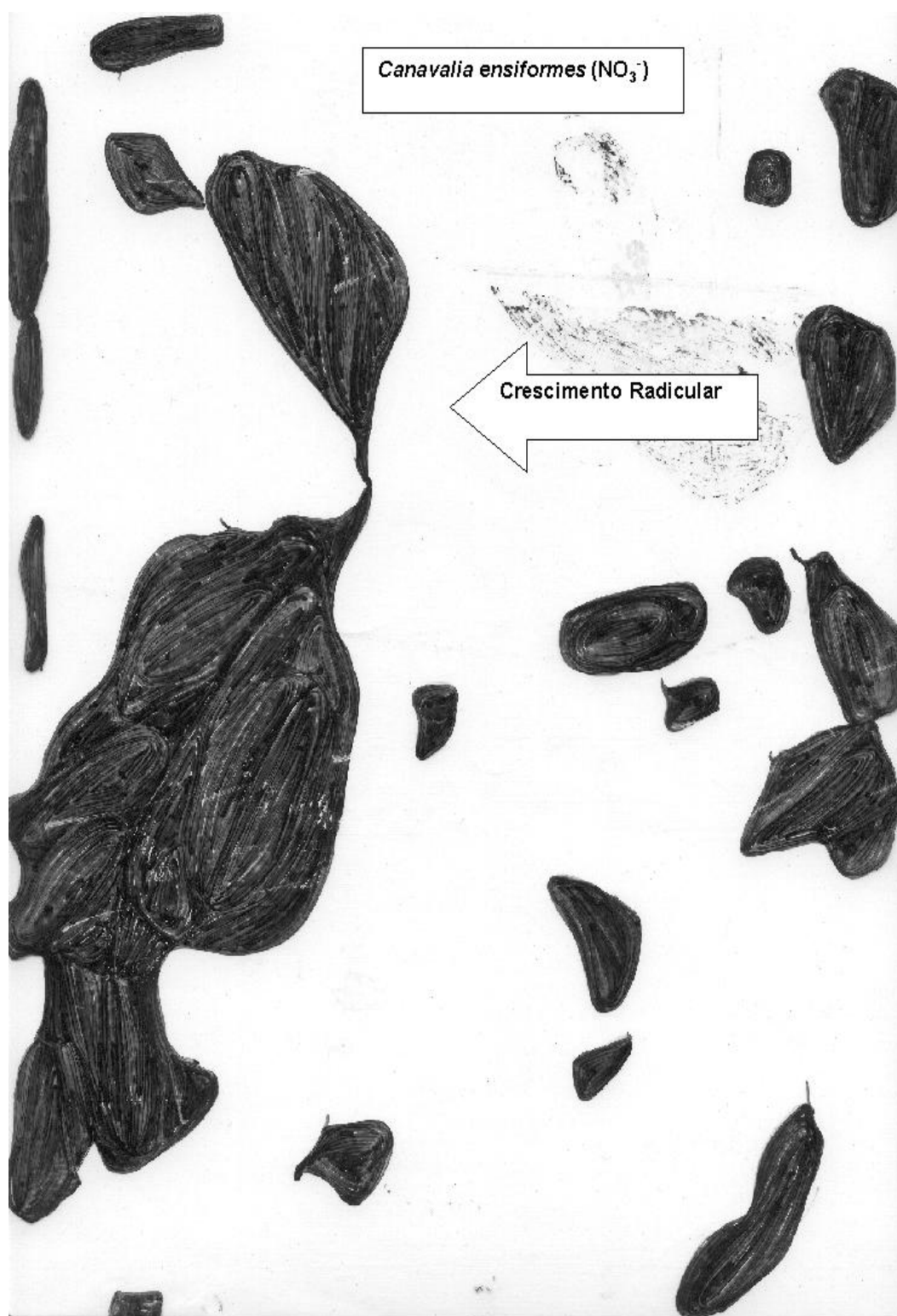


Figura 10.

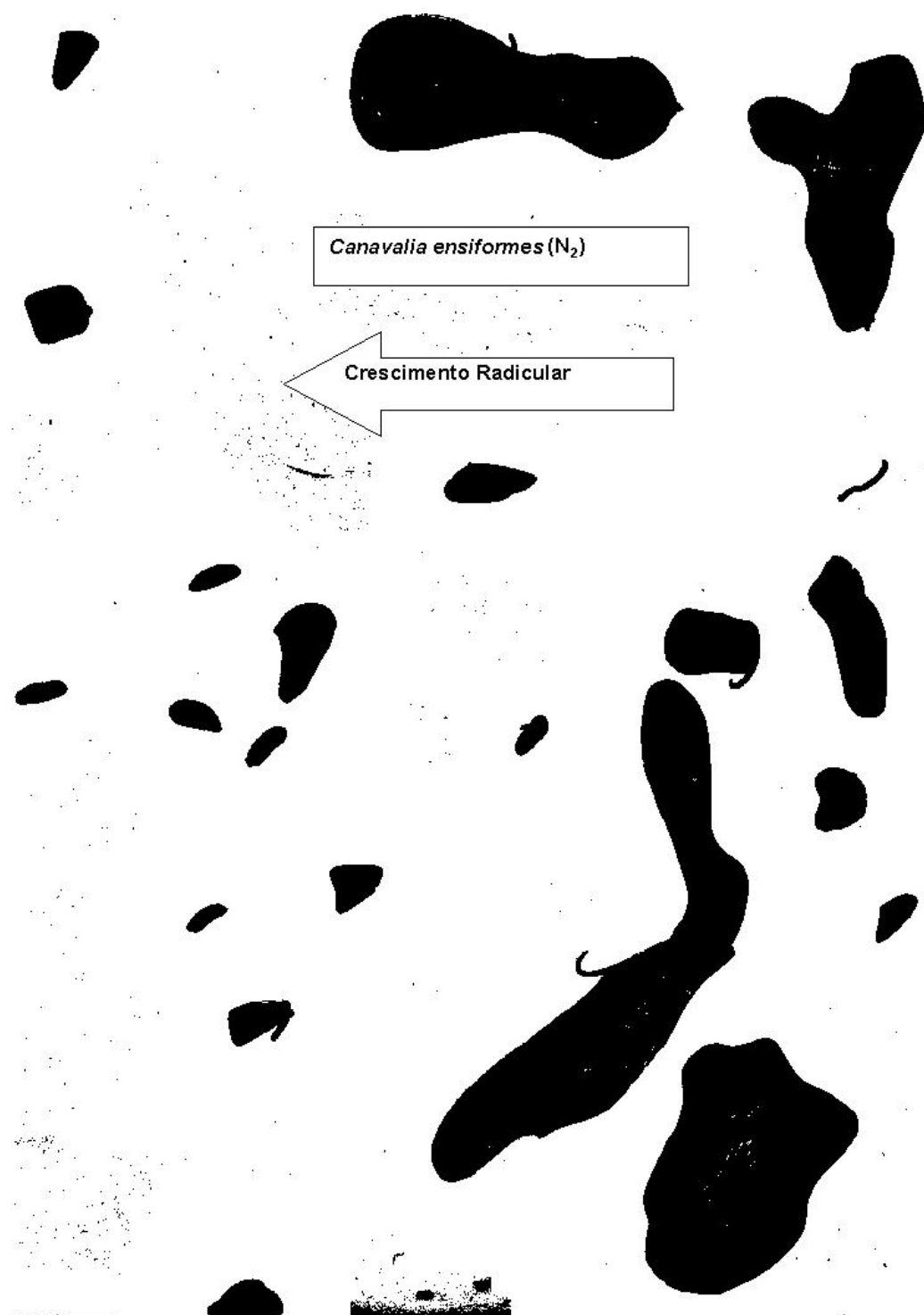


Figura 11.

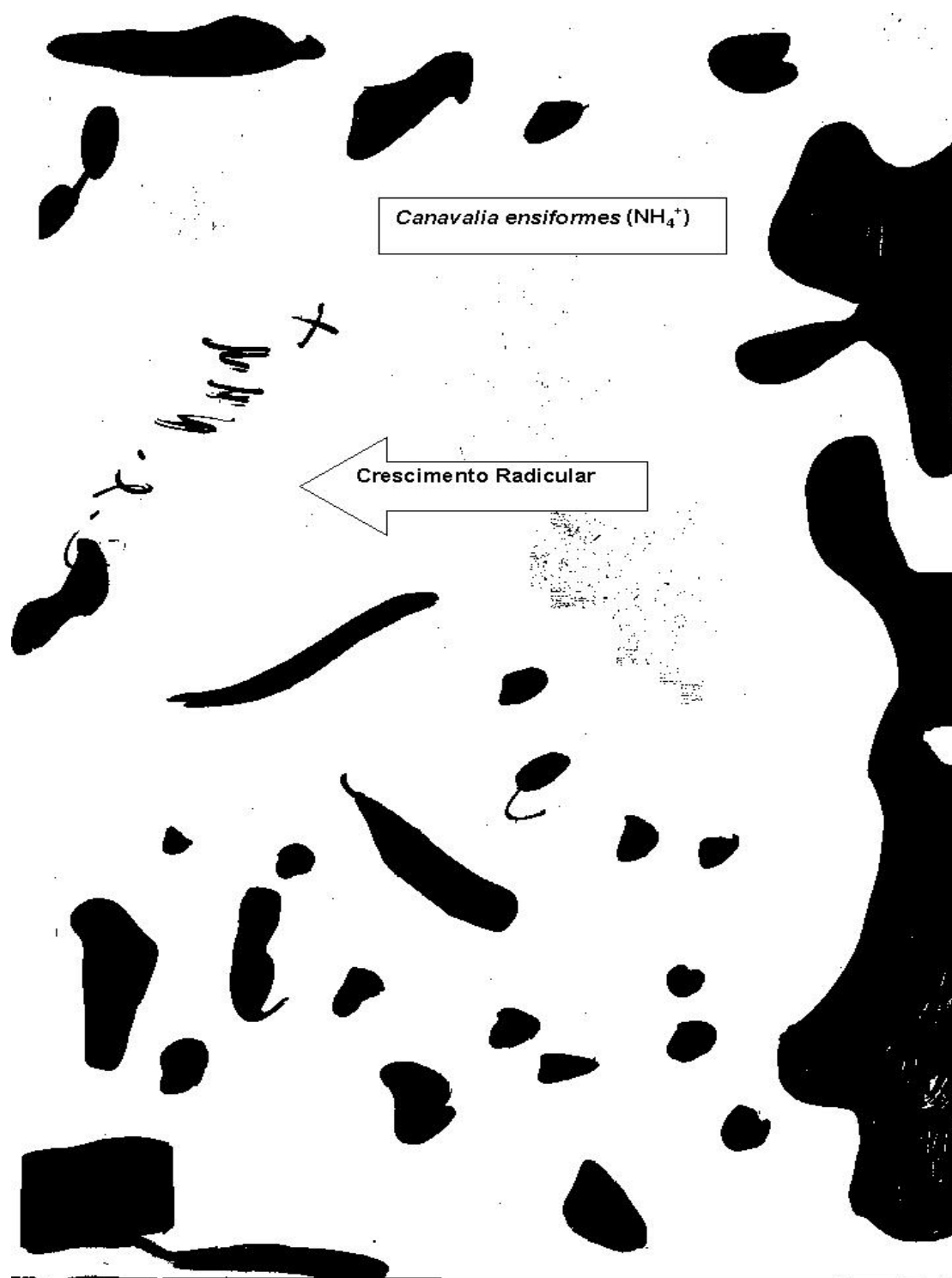


Figura 12.

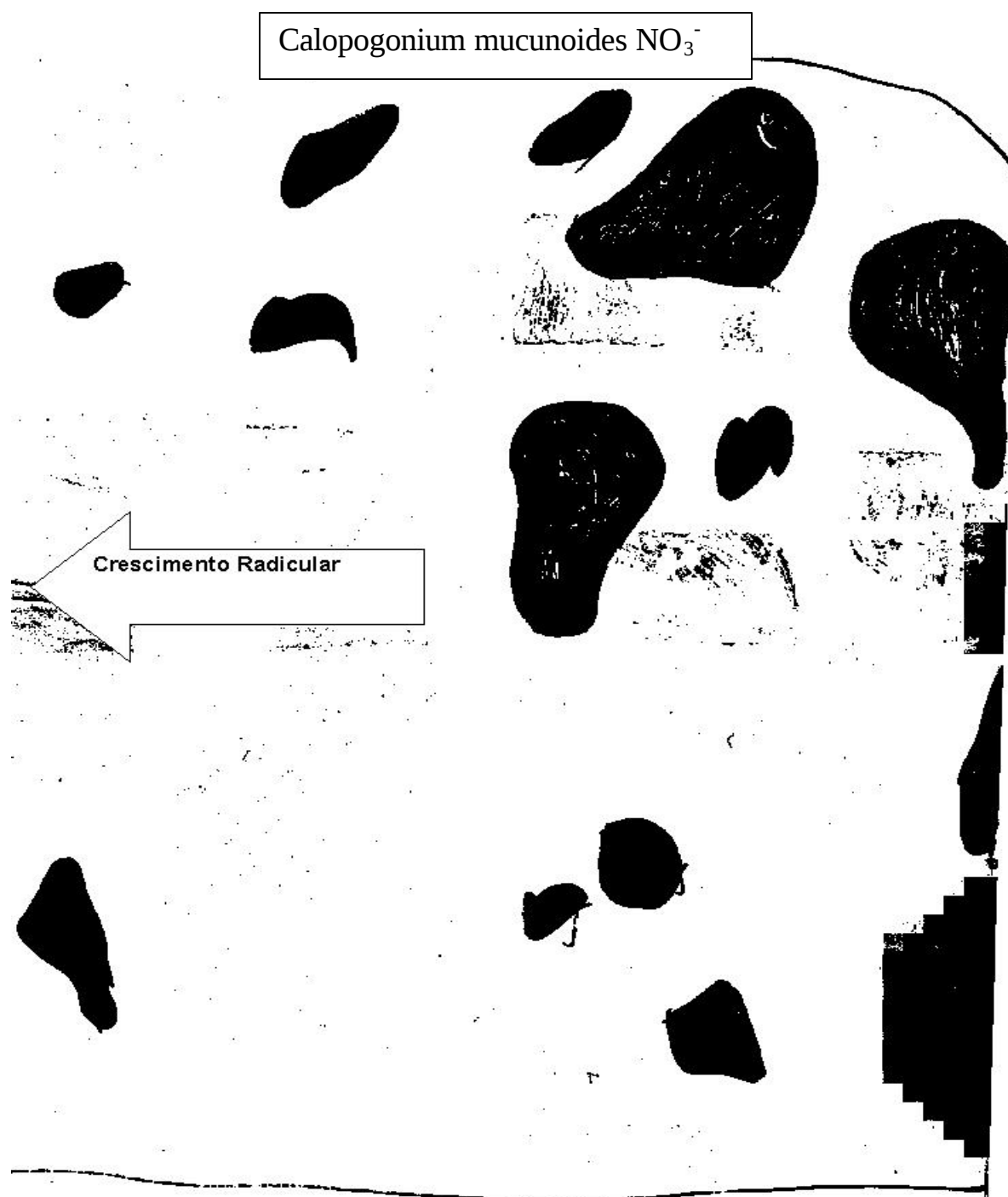


Figura 13.



Figura14.

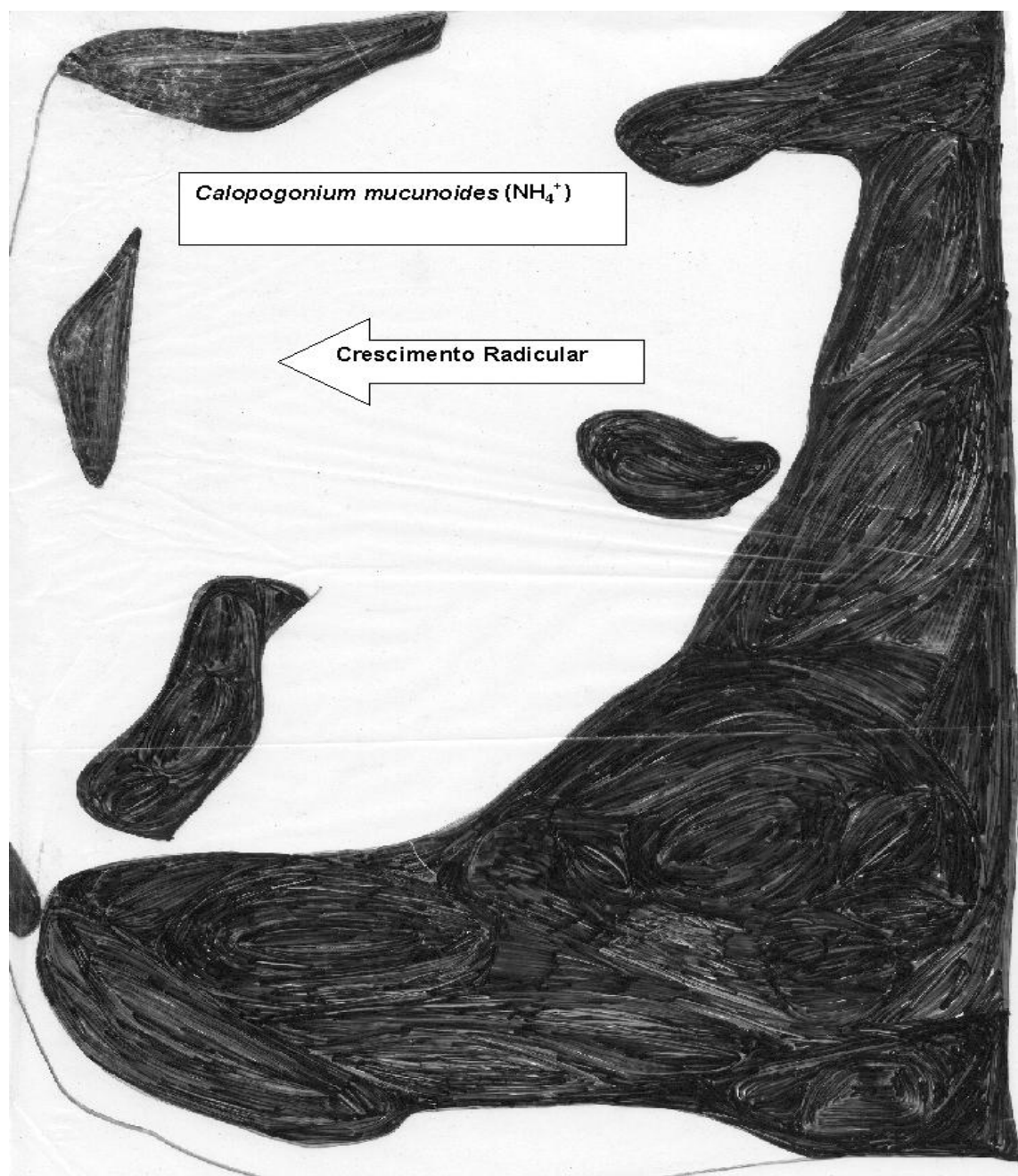


Figura 15.



Figura 16.

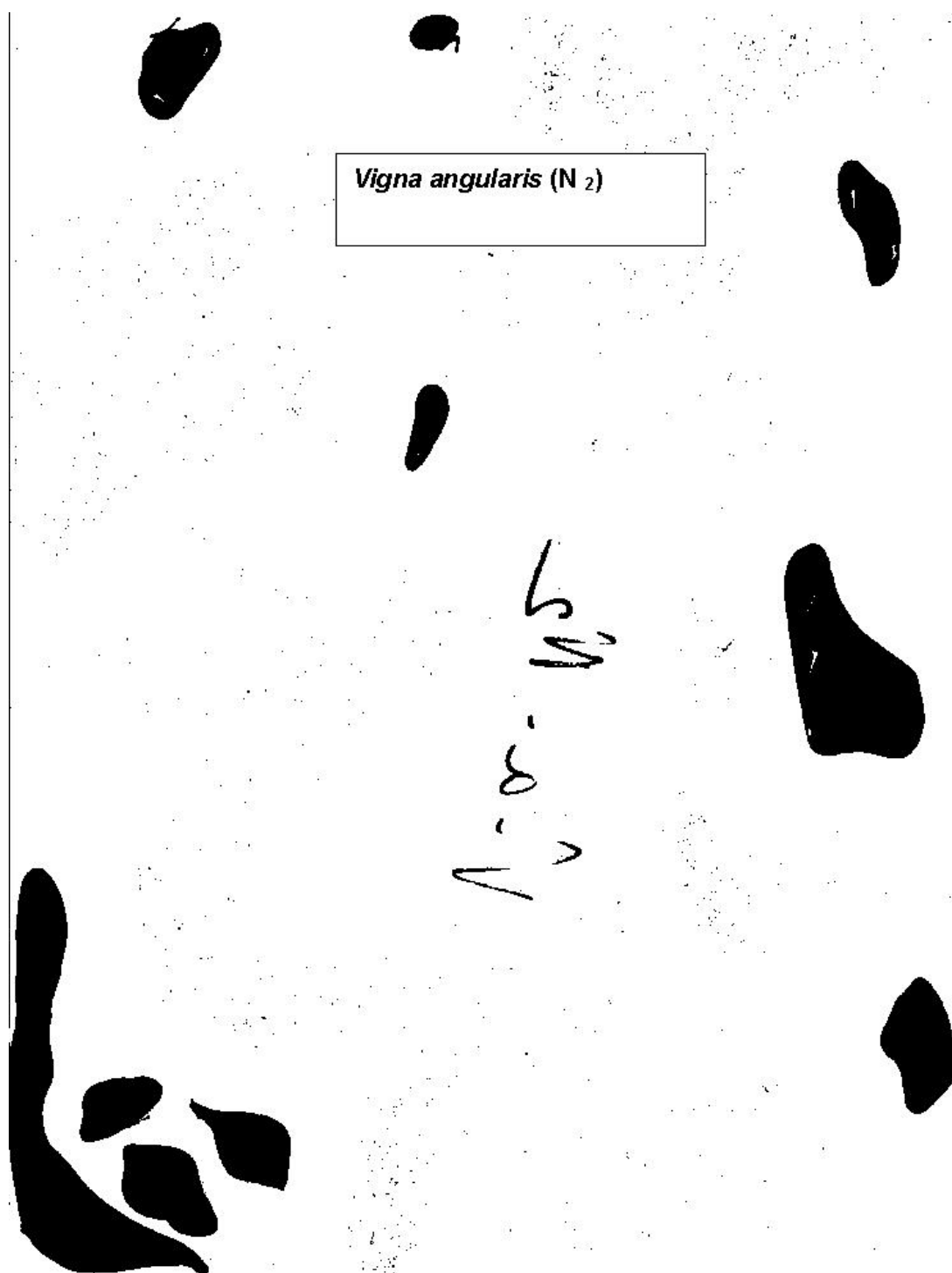


Figura 17.



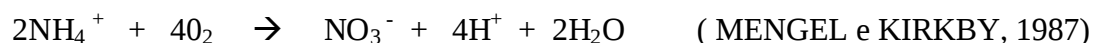
Tabela 1. ÁREA DA RIZOSFERA (cm²) ACIDIFICADA POR DIVERSAS ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS CULTIVADAS EM MINIRRIZOTRONS E SUBMETIDAS A TRÊS FONTES DE NITROGÊNIO

ESPÉCIE	ÁREA ACIDIFICADA DA RIZOSFERA (CM ²)		
	TRATAMENTOS		
	N-NO ₃ ⁻	N-N ₂	N-NH ₄ ⁺
<i>Centrosema pubescens</i>	44	60	170
<i>Vigna unguiculata</i>	162*	183	228
<i>Pisum sativum</i>	84	--	167
<i>Vigna mungo</i>	138*	137	168
<i>Phaseolus vulgaris</i>	253	--	235
<i>Cajanus cajan</i>	25	59	300
<i>Dolichos lablab</i>	88*	169	176
<i>Lupinus albus</i>	121	114	303
<i>Trifolium subterraneum</i>	132	114	303
<i>Pueraria javanica</i>	89	128	370
<i>Mucuna deeringeana</i>	9	19	--
<i>Arachis hypogae</i>	36	108	--
<i>Mucuna aterrima</i>	13	98	102
<i>Glycine max</i>	42	65	118
<i>Vigna angularis</i>	31	39	78
<i>Crotalaria juncea</i>	0	80	187
<i>Canavalia ensiformes</i>	176*	92	104
<i>Calopogonium mucunoides</i>	74	101	313
Média:	84	98	208

* Plantas que apesar de terem recebido N-NO₃⁻, apresentaram elevada nodulação.

Nesses casos, outros mecanismos podem estar operando, o que permitiria à essas plantas promoverem essa acidificação, mesmo tendo NO₃⁻ como fonte nitrogenada. Os resultados mostraram que plantas como *Pueraria javanica*, *Calopogonium mucunoides*, *Lupinus albus*, e *Trifolium subterraneum*, foram capazes de promover uma intensa acidificação no tratamento com NO₃⁻ e na ausência de nódulos. Isto indica que estas plantas devem possuir mecanismos especiais, para exibirem essa acidificação mesmo na presença de NO₃⁻.

Com relação aos sítios de acidificação na rizosfera, observou-se uma tendência de maior acidificação próximo ao colo radicular, ou seja, nas regiões de tecidos mais maduros, conforme proposto por RAVEN *et al.* (1990). No tratamento com NH_4^+ , essa acidez concentrou-se quase que totalmente nas proximidades do colo radicular, tendo sido regra geral para todas as espécies testadas, havendo apenas variação com relação a extensão dessa acidez, abaixo ou lateralmente. Essa acidificação poderia estar relacionada com o local de aplicação do adubo nitrogenado. Aparentemente, boa parte da extrusão de prótons ocorreu próxima ao sítio de aplicação do NH_4^+ , sendo que parte dessa acidez pode também ser explicada pela nitrificação da amônia no solo, como pode-se observar pela reação abaixo, a qual libera prótons:



Entretanto, a adubação nitrogenada (NH_4^+ no caso), foi parcelada em 4 vezes (aos 7, 14, 21 e 28 DAP). Acredita-se que a maior parte da extrusão de H^+ foi devida a reação fisiológica das plantas ao excesso de cátions absorvidos, conforme apresentado por RAVEN *et al.* (1990).

Com relação ao NO_3^- , quando ocorria acidez, esta se distribuíu mais uniformemente, ao longo do sistema radicular, aparecendo tanto no colo radicular, quanto ao longo de todo o sistema, até mesmo nas extremidades, em tecidos mais jovens. Nos caso em que houve nodulação, a acidez concentrou-se nas proximidades do colo radicular. No caso do NO_3^- , parece não ter ocorrido nenhuma relação da acidez/alcalinidade gerada, com o local de aplicação do fertilizante. Já no caso do N_2 , repete-se a melhor distribuição da acidez por

toda a rizosfera, mas ocorre, como no tratamento do NH_4^+ , uma certa concentração, embora menor, na região próxima ao colo radicular. O que confirma que há uma predominância da extrusão de prótons nos tecidos mais maduros das raízes. Em diversas ocasiões, observou-se a presença de acidez em torno dos nódulos, sendo muito intensa em alguns casos, o que pode ser um indicativo de extrusão de prótons nesta região, embora a acidez possa também ser originada nas raízes próximas aos nódulos. Na maioria dos casos, entretanto, os nódulos não se apresentavam como sítios de extrusão de prótons.

2.4 CONCLUSÕES

- 1) As plantas apresentaram alta capacidade de acidificar suas rizosferas, especialmente nos tratamentos com N-NH_4^+ e N_2 .
- 2) No tratamento N-NO_3^- , houve intensa acidificação, quando ocorreu nodulação.
- 3) *Lupinus albus*, *Trifolium subterraneum* e *Pisum sativum*, apresentaram elevada acidificação, sem a presença de nódulos, em tratamentos com N-NO_3^- .
- 4) *Vigna unguiculata*, *Vigna mungo*, *Dolichos lablab*, *Lupinus albus*, *Trifolium subterraneum*, *Pueraria javanica*, *Arachis hypogae*, *Mucuna aterrima*, *Canavalia ensiformes* e *Calopogonium mucunoides*, apresentaram elevada acidez no tratamento N_2 .

- 5) Não foi possível indicar os nódulos como pontos principais de extrusão de protons, devido a difusão da acidez.
- 6) Em geral, a acidificação concentrou-se nas proximidades do colo radicular (tecidos suberizados).
- 7) Espécies de clima tropical e solos ácidos, apresentaram acidez igual ou superior as espécies de origem climática temperada.

2.5 REFERÊNCIAS

1. AGUILAR, S. A. & DIEST, A. van. Rock phosphate mobilization induced by the the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, v. 61, n. 1 ; 27-42, The Hague, 1981.
2. ANDREW, C. S. & JOHNSON, A. D. Effect of calcium, pH, and nitrogen on the growth of some tropical and temperate pasture legumes. II Chemical composition (Ca, N, K, Mg and P). *Aust. J. Agric. Res.*, v. 27 ; 625-636, 1976.
3. ASHER, C.J. & EDWARDS, D.G. Modern solution culture techniques. *IN Inorganic Plant Nutrition*; Läuchli, A. & Bielecki, R. L. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin, 1983.
4. BEKELE, T. ; CINO, B.J. ; EHLERT, P.A. I. ; MAAN, A.A. van der & DIEST, A. van. An evaluation of plant borne factors promoting the solubilization of alkaline rock phosphates. *Plant and Soil*, V. 75, 361-378, 1983.

5. BLAIR, G. G. ; MAMARIL, C. P. & MILLER, M. H. Influence of nitrogen source on phosphorus uptake by corn from soils differing in pH. *Agronomy Journal*, 63: 235-238, 1971.
6. CHADA, S. S. & DePOLLI, H. Nodulação de leguminosas tropicais promissoras para a adubação verde em solo deficiente em fósforo. *Pesq. Agropec. Bras.* , v. 23; n. 11: 1197-1202, 1988.
7. FRANCO, A. A. & SOUTO, S. M. Contribuição da fixação biológica de N_2 na adubação verde. *IN Adubação Verde no Brasil*, Campinas, SP, Fundação Cargill, 1984. pp 199-215.
8. GARDNER, W. K. ; PARBERY, D. G. & BARBER, D. A. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. II. The effect of varying phosphorus supply and soil type on some characteristics of the soil-root interface. *Plant and Soil* 68: 33-41, 1982.
9. HÄUSSLING, M. ; LEISEN, E. ; MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. An improved method for non-destructive Measurements of the pH at The root-soil Interface (Rizosphere). *J. Plant Physiol.* v.117:371-375, 1985.
10. HAYNES, R. J. Soil acidification induced by leguminous crops. *Grass and Forage Sci.* ; v. 38, 1-11, 1983.
11. HELYAR, K. R. Cycling and soil acidification. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, v. 42: 217-221, 1976.
12. ISRAEL , D. W. & JACKSON, W. A. Influence of nitrogen nutrition on ion uptake and translocation by leguminous plants. *IN Mineral nutrition of legumes in tropical and sub-tropical soils*. Andrew, C. S. & Kamprath, E. J. (Eds.), CSIRO, Melbourne, Australia, 1978.

13. MARSCHNER, H. ; RÖMHELD, V. & OSSEMBERG-NEUHAUS, H. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Z. Pflanzenphysiol.* v. 105, 407-416, 1982.
14. MARSCHNER, H. Nährstoffdynamik in der Rhizosphäre: Einer Übersicht. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* Bd. 98: 291-309, 1985.
15. MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press , London , UK , 1986. 674 pp.
16. MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. *In vivo* measurements of root-induced pH changes at the soil-root interface: Effect of plant species and N source. *Z. Pflanzenphysiol.* v. 11: 241-251, 1983.
17. MENGEL, K. & KIRKBY, E. A. PRINCIPLES OF PLANT NUTRITION. International Potash Institute, Bern, Switzerland, 1987. 687 p.
18. NYATSANGA , T. & PIERRE, W. H. Effect of nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agron. J.*, 65: 936-940, 1973.
19. RAVEN, J. ; FRANCO, A. A. ; JESUS, E. L. de & JACOB-NETO, J. H⁺ extrusion and organic-acid syntesis in N₂-fixing symbiosis involving vascular plants. *New Phytol.* v. 114, n. 3 ; 369-390, 1990.
20. RAVEN, J. A. and SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* v. 76, 415-431, 1976.
21. RILEY, D. & BARBER, S. A. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes at the root-soil interface. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* v. 35:301-306, 1971.

22. RÖMHELD, V. pH-Veränderungen in der Rizosphäre verschiedener Kulturpflanzenarten in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot. Kali-Briefe (Bütenhof) 18, n.1: 13-30, 1986.
23. SCHALLER, G. und FISCHER, W. R. Die Verwendung von Antimon-Elektroden zur pH-Messung in Böden. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 144: 197-204, 1981.
24. SCHALLER, G. & FISCHER, W. R. pH- Änderungen in der Rizosphäre von Mais und Erdnusswurzeln. Z . Pflanz . Bodenk . 148: 306-320, 1985.
25. SILVA, E. M. R. da; ALMEIDA, D. L de FRANCO, A. A. & DÖBEREINER, J. Adubação Verde no aproveitamento de fosfato em solo ácido. R. Bras. Ci. Solo, v. 9 n. 1; 85-88, 1985.
26. SMILEY, R. W. Rhizosphere pH as influenced by plants, soils and nitrogen fertilizers. Soil Sci. Soc. Amer. Proceed. ; v. 38; 795-799, 1974.
27. SOON, Y. K. & MILLER, M. D. Changes in the rizosphere due to NH_4^+ and NO_3^- fertilization and phosphorus uptake by corn seedlings (*Zea mays* L.). Soil Sci. Soc. Am., v. 41, n. 1, 77-80, 1977.
28. SWART, P. H. & DIEST, A. van . The rock-phosphate solubilization of *Pueraria javanica* as affected by soil pH, superphosphate priming effect and symbiotic N_2 fixation. Plant and Soil, v. 100, 135-147, 1987.

3. CAPÍTULO II

**BALANÇO CÁTION-ÂNION: SUA RELAÇÃO COM A
CINZA ALCALINA COM A EXTRUSÃO DE PRÓTONS EM
DEZ LEGUMINOSAS TROPICAIS NODULADAS
UTILIZANDO DE N₂ SIMBIÓTICO**

3.1 INTRODUÇÃO

ULRICH (1941), trabalhando com raízes de cevada, pela primeira vez demonstrou claramente, que o excesso de absorção de cátions causava o aumento da alcalinidade interna da planta, a qual era equilibrada pela produção de ácidos orgânicos. Por outro lado, quando ânions eram absorvidos em excesso, havia uma diminuição nos teores de ácidos orgânicos.

Durante a década de cinqüenta, pouco interesse parece ter havido com relação ao balanço somatório de cátions menos o somatório de ânions ($\Sigma C^+ - \Sigma A^-$) e somente nos anos sessenta, o assunto voltou a ser estudado. Inicialmente com os trabalhos de CUNNINGHAM (1964), demonstrando diferenças consideráveis na razão da soma de cátions :soma de ânions, em quarenta e três espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas. Em suas conclusões, encontrou um valor médio para as 43 espécies de 2,5 meq de cátions, contra 3,6 meq de ânions absorvidos por grama de peso seco da parte aérea.

Os trabalhos de HIATT (1967), demonstraram de forma conclusiva, a diferenciação na taxa de absorção entre cátions e ânions pelas plantas, assim como os mecanismos pelos quais os vegetais compensam esse desequilíbrio, através da acumulalação ou degradação de ânions-ácidos orgânicos. Usando raízes de cevada tratadas com K_2SO_4 , KCl e $CaCl_2$, HIATT (1967) mostrou que no caso do K_2SO_4 , o K^+ era

absorvido muito mais rapidamente que o SO_4^{2-} , levando a um acúmulo de cargas positivas internamente e a uma produção de ânions orgânicos para manter o equilíbrio de cargas internas da planta. Essa acumulação também refletiu-se numa alta taxa de assimilação de CO_2 , o que indica o aumento da síntese de ácidos orgânicos. No caso do CaCl_2 , houve uma absorção mais rápida de Cl^- em relação ao Ca^{2+} , tendo como resultado a extrusão de HCO_3^- pelas raízes, para compensar o excesso de absorção de ânions sobre cátions. Esse excesso foi equilibrado por uma redução na taxa de assimilação de CO_2 , assim como por uma elevada degradação de ânions orgânicos. No caso do KCl , as taxas de absorção de cátions e ânions, foram semelhantes, tendo havido pouca modificação no pH do meio externo e na taxa de assimilação de CO_2 , assim como pequenas modificações no nível de ânions orgânicos nas raízes.

O excesso de absorção de cátions ou ânions precisa ser de alguma forma equilibrado, para que o pH citoplasmático não sofra bruscas flutuações (RAVEN e SMITH, 1976). DAVIES (1973), citado em MENGEL e KIRKBY (1987), indicou que a síntese e a degradação do malato, que ocorre no citoplasma, parece ser controlada pelas modificações no pH celular. O aumento do pH ativa a enzima PEP carboxilase (fosfoenolpiruvato carboxilase), a qual sintetiza oxaloacetato, a partir do fosfoenolpiruvato (PEP), consumindo HCO_3^- ($\text{CO}_2 + \text{OH}^-$). O oxaloacetato pode ser então reduzido a malato, o qual acumula-se. Por outro lado, baixo pH promove o processo inverso, ou seja, a descarboxilação oxidativa do malato, pela ativação da enzima málica. Esse sistema foi chamado de “pH stat” por DAVIES (1973) e é um mecanismo de ajuste que permite a célula controlar pequenas flutuações de pH em seu citoplasma.

A forma e a concentração de nitrogênio disponíveis às plantas, afetam consideravelmente o balanço cátion-ânion, pois conforme JUNGK (1970), cerca de 70% dos cátions e ânions absorvidos pelas plantas são representados pelo nitrogênio, seja na forma nítrica ou na forma amoniacal. KIRKBY e MENGEL (1967) e JUNGK (1967), apresentaram importantes contribuições com relação a influência da forma nitrogenada no balanço cátions - ânion. Observaram que o fornecimento de N-NO_3^- geralmente levava a um aumento do pH no meio em que a planta estava se desenvolvendo. A assimilação do NO_3^- na planta, promove uma alcalinização interna, resultando no acúmulo de ânions inorgânicos e na extrusão de HCO_3^- pelas raízes, o que provoca a alcalinização do meio externo.

PIERRE *et al.* (1970) e PIERRE e BANWART (1973), mostraram diferenças entre espécies, quanto a intensidade da alcalinização ou acidificação do solo, em resposta as fontes de N e que esse efeito podia ser quantificado, relacionando-se o excesso de bases ao conteúdo de nitrogênio. Esses autores usaram a sigla EB (para indicar excesso de bases), definida como $\text{EB} = (\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Na}^+) - (\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^{2-})$, em nutrientes totais e expressos em meq (miliequivalentes) por cem gramas de matéria seca ($\text{meq} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS). A diferença de EB para $\Sigma \text{C}^+ - \Sigma \text{A}^-$ (cátions menos ânions), é que $\Sigma \text{C}^+ - \Sigma \text{A}^- = (\text{Ca}^{2+} + \text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{NO}_3^-)$, segundo WIT *et al.* (1963). Como podemos notar $\Sigma \text{C}^+ - \Sigma \text{A}^-$ inclui o NO_3^- . Caso os teores de NO_3^- não sejam muito elevados, não haverá diferenças entre EB e $\Sigma \text{C} - \Sigma \text{A}$. Considera-se $\Sigma \text{C}^+ - \Sigma \text{A}^-$, como uma estimativa do conteúdo de ânions orgânicos das plantas e tem sido usado como um indicador do desenvolvimento e da nutrição vegetal (TUILL *et al.* 1964). Este valor ($\text{C}^+ - \text{A}^-$), pode ser

obtido, tanto através da determinação individual de cada elemento, como a partir da determinação da cinza alcalina, conforme descrito em TUIL *et al* . (1964) e JUNGK (1968).

Segundo BANWART e PIERRE (1975), pode-se obter uma relação entre o excesso de bases e os teores de N, ou seja, EB/N , o que permitiria uma comparação de diferentes espécies, em relação ao seu efeito na acidificação do solo. Quando o N é absorvido na forma de NO_3^- , plantas com $EB/N = 0$, não modificariam o pH da rizosfera, àquelas com $EB/N < 1$, promoveriam acidificação e àquelas com $EB/N > 1$ promoveriam alcalinização da rizosfera (BANWART e PIERRE, 1975 a ; BANWART e PIERRE, 1975 b).

DIEST e colaboradores (RAIJ e DIEST, 1979; AGUILAR e DIEST, 1981 e BEKELE *et al* . , 1983), definiram as plantas que apresentam um excesso de absorção de ânions sobre cátions, portanto alcalinizadoras da rizosfera , de plantas com padrão ácido de absorção. Àquelas plantas que absorvem um excesso de cátions, portanto acidificadoras da rizosfera, foram chamadas de plantas com um padrão alcalino de absorção. No primeiro caso, o excesso de ânions leva a planta a realizar extrusão de OH^- , (ou de HCO_3^-), para manter a sua eletroneutralidade interna, enquanto que no segundo caso, o excesso de cátions leva à extrusão de H^+ para a manutenção do equilíbrio ao nível citoplasmático (RAIJ e DIEST, 1979).

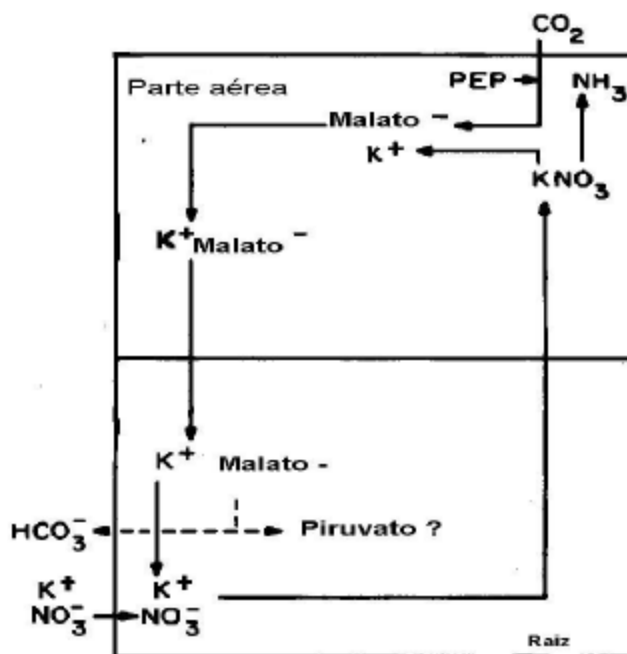
3.1.1 EFEITO DO NITRATO NO EQUILÍBRIO IÔNICO DA RIZOSFERA

KIRKBY e MENGEL (1967), demonstraram que plantas nutridas com NO_3^- , geralmente absorvem um excesso de ânions, deixando um saldo alcalino no meio. Além

Segundo EGMOND (1978), o modelo apresentado por BEN-ZIONI *et al.* (1971), não se aplica de forma uniforme à todas as espécies. Em beterraba açucareira, foi descrita uma absorção de cátions e ânions em quantidades quase que estequiometricamente iguais, mesmo sendo o NO_3^- a fonte nitrogenada, o que resulta numa reação de pH de rizosfera praticamente neutra. Para explicar este modelo de absorção, KIRKBY (1974), citado por EGMOND(1978), apresentou o esquema mostrado na FIGURA 2. Segundo esse modelo, após a translocação para a parte aérea, o nitrato é transformado em N - orgânico e os carboxilatos de sódio, cálcio, magnésio e o oxalato, malato e citrato, acumulam-se na parte aérea. Nesse caso, a redistribuição de carboxilatos para as raízes, tem um papel menos importante, assim como a descarboxilação no sistema radicular. A troca de NO_3^- por bicarbonato, resultante na redução do NO_3^- nas raízes, não é tão importante nessa espécie, pois a relação cátion/ânion, está próxima da unidade EGMOND (1978).

FIGURA 2. Modificação do Modelo de BEN-ZIONI-I.I.PS. segundo EGMOND

(1978)



Grandes diferenças são notadas no pH da rizosfera de diferentes espécies, absorvendo NO_3^- , crescendo em condições idênticas (MARSCHNER, 1986). O trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (RAIJ e DIEST, 1979), o grão de bico (*Cicer arietinum*) (MARSCHNER e RÖMHELD, 1983), o amendoim (*Arachis hypogae*) (SCHALLER e FISCHER, 1985), apresentam acidificação muito mais acentuada daquela apresentada por outras espécies, como milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (MARSCHNER, 1986). Essas diferenças genotípicas, refletem diferenças na relação de absorção de cátions/ânions (RAIJ e DIEST, 1979; BEKELE et al. 1983) e ou sítios dominantes de redução do NO_3^- (raízes ou parte aérea), (MARSCHNER, 1986).

3.1.2 EFEITO DO AMÔNIO NO EQUILÍBRIO IÔNICO DA RIZOSFERA

As plantas, quando recebem NH_4^+ como única fonte nitrogenada, rapidamente baixam o pH de suas rizosferas. O efluxo de prótons (H^+), devido a absorção de NH_4^+ , foi inicialmente relatado por PRIANISCHNIKOW (1929) e por SIDERIS (1937), citados por ALLEN *et al.* (1985). Segundo DIJKSHOORN (1962) e RAVEN e SMITH (1976), 1 mol de H^+ seria produzido durante assimilação de 1 mol de NH_4^+ . Segundo EGMOND (1978), a extrusão de prótons pelas raízes de plantas nutridas com NH_4^+ , pode ser calculada da seguinte maneira:

CÁTIONS ABSORVIDOS - H⁺ EXTRUDIDOS = ÂNIONS ABSORVIDOS

$$(NH_4^+ + K^+ + Na^+ + \quad - H^+ \text{ EXTRUDIDOS} = (NO_3^- + Cl^- + SO_4^{2-} + H_2PO_4^-) \\ Mg^{2+} + Ca^{2+})$$

Na ausência de NO₃⁻ e considerando que o NH₄⁺ é muito rapidamente assimilado pelas raízes, teríamos então: N orgânico + cátions - H⁺ extrudidos = ânions + S orgânico

De acordo com DIJKSHOORN (1960), o S orgânico equivale, em base iônica, a 0,054 de N orgânico, então:

$$N \text{ orgânico} + (C^+ - A^-) = H^+ \text{ extrudidos} + 0,054 N \text{ orgânico}$$

ou

$$H^+ \text{ extrudidos} = C^+ - A^- + 0,0946 N \text{ orgânico}$$

Se desconsiderarmos o S, ficaria:

$$H^+ \text{ extrudidos} = (C^+ - A^-) + N \text{ orgânico}$$

3.1.3 EFEITO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂ NO EQUILÍBRIO IÔNICO DA RIZOSFERA

Segundo RAVEN e SMITH (1976), a fixação biológica de N₂ geraria entre 0,1 e 0,2 mol de H⁺, por nitrogênio (N) assimilado. Dessa forma, está numa posição

intermediária entre a nutrição nítrica e a amoniacal, no que se refere a extrusão de prótons e a geração de acidez na rizosfera.

Segundo MARSCHNER (1986), as plantas que recebem o nitrogênio via fixação de N_2 , absorvem uma maior quantidade de cátions do que de ânions, pois o N_2 não apresenta carga. A relação entre cátions e ânions absorvidos é comparável com plantas nutridas com NH_4^+ . A consequência desse maior acúmulo de cátions do que de ânions é a principal causa da extrusão de prótons e por conseguinte da acidificação da rizosfera de leguminosas fixando N_2 . Esta acidificação pode aumentar a solubilização de fosfato de rocha e resultar em maior aproveitamento de fósforo desta fonte, pelas plantas (AGUILAR e DIEST, 1981). Outros nutrientes também podem ter sua absorção aumentada através da acidificação da rizosfera em leguminosas, como no caso da soja, que sob fixação de N_2 , não apresentou sintomas de deficiência de ferro e manganês, tendo apresentado deficiência destes nutrientes, quando a fonte de nitrogênio foi o nitrato segundo WALLACE (1982), citado por MARSCHNER, (1986).

NYATSANGA e PIERRE (1973), observaram que alfafa (*Medicago sativa*) , fixando N_2 , produzindo 1 t . ha⁻¹ de matéria seca, produzia uma acidez no solo, a qual necessitaria de 600 kg de $CaCO_3$ por hectare para a sua neutralização.

Em experimentos de longa duração, em vasos, MENGEL e STEFFENS (1982), mostraram que trevo vermelho (*Trifolium pratense*) baixou o pH do solo de pH = 7,0 para pH = 4,4 , após um período de um ano, enquanto que azevém (*Lolium multiflorum*) tratado com nitrato de amônio, não alterou o pH do solo. Ao final deste experimento, o trevo (*Trifolium pratense*) com fixação de N_2 , apresentava 1,402 meq de cátions e 425 meq de ânions por 100g de matéria seca.

Também trabalhando com trevo vermelho (*Trifolium incarnatum*), HAUTER e STEFFENS (1985), mostraram que quando recebiam o nitrogênio via N_2 simbiótico como fonte nitrogenada, as plantas podiam extrair mais fósforo de fontes parcialmente aciduladas, do que quando nutridas com NH_4NO_3 ou $Ca(NO_3)_2$. A extrusão de prótons, acidificando a rizosfera e o melhor desenvolvimento do sistema radicular, permitiram às plantas fixando nitrogênio, obterem um melhor aproveitamento do fósforo desta fonte pouco solúvel.

3.1.4 EFEITO DAS LEGUMINOSAS NA ACIDIFICAÇÃO DO SOLO

Todos os resultados discutidos anteriormente, foram de experimentos em casa de vegetação, com duração variável, mas com inquestionável efeito das leguminosas em reduzir o pH da rizosfera e em alguns casos, até mesmo do solo dos vasos onde as mesmas foram cultivadas.

Em experimentos de campo, com pastagens, as leguminosas dependentes do N_2 simbiótico, parecem ter capacidade de acidificar o solo, a ponto de provocar declínio na produção, (HELYAR, 1976). Esta acidificação só ocorre porque parte das forragens pelos animais.

Quando toda a planta é incorporada ao solo, não há acidificação líquida do mesmo (HELYAR, 1976). Com a incorporação da planta ao solo, retornam as bases, o processo de nitrificação consome prótons e parte da acidez é perdida pela saída do CO_2 proveniente da respiração dos microorganismos. Entre os aspectos mais importantes com relação a acidificação do solo pelas leguminosas, HAYNES (1983), destacou a absorção de um

excesso de cátions sobre ânions, levando à extrusão de H_3O^+ ; a nitrificação do NH_4^+ dos resíduos orgânicos das leguminosas, também liberando H_3O^+ , ou seja, $\text{NH}_4^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_3\text{O}^+ + \text{NO}_3^-$ e a lixiviação do nitrato, arrastando bases como contraíons.

O efeito mais intenso de acidificação do solo, promovido por leguminosas, foi notado em experimentos de longa duração, em pastagens, onde aparentemente não haviam gramíneas, pois elas poderiam minimizar o efeito acidificante.

Segundo NYE (1981), diversos são os fatores que governam a geração de acidez na rizosfera, podendo haver uma intensa acidificação na interface solo-raíz, sem que haja necessariamente uma acidificação do solo como um todo. NYE (1981), destacou como fatores importantes no controle do pH da rizosfera: espécie vegetal; fonte de N (NO_3^- , NH_4^+ ou N_2); pO_2 ; pCO_2 ; poder tampão do solo e a exudação de ácidos orgânicos pelas raízes. O efeito da liberação de HCO_3^- ou H^+ (H_3O^+) no solo, seria dependente do pH inicial do solo, da capacidade tampão do solo e da umidade do solo.

3.1.5 ACIDIFICAÇÃO DA RIZOSFERA E SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE ROCHA

O objetivo do presente trabalho, foi o de investigar, em 10 leguminosas tropicais, as diferenças promovidas em termos da capacidade de acidificação da rizosfera, do balanço cátion-ânion e da cinza alcalina, relacionando esses parâmetros para identificar para identificar, dentre essas plantas, àquelas com maior capacidade de promover a extrusão de prótons.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com dez espécies de leguminosas, usando vasos de plástico, contendo 4,0 kg de terra. Utilizou-se amostras de terra, retiradas dos 20 cm superficiais de um PLANOSSOLO (Série Ecologia, coletado em Seropédica, distrito de Itaguaí, RJ), com as seguintes características químicas:

pH = 5,4 ; Al^{3+} = 0,1 meq.100g⁻¹; Ca^{2+} = 1,2 meq.100g⁻¹; Mg^{2+} = 0,8 meq.100g⁻¹; K = 22 ppm e P = 7,3 ppm. Os vasos receberam uma dose equivalente a 500 kg de CaCO_3 por hectare, para eliminar a presença do Mn^{2+} tóxico (FRANCO e DÖBEREINER, 1971). Cada vaso recebeu uma solução de micronutrientes mais magnésio, segundo FRANCO e DÖBEREINER (1967) e uma dose equivalente a 80 kg de P_2O_5 .ha⁻¹, na forma de superfosfato triplo e 40 kg de K_2O .ha⁻¹, na forma de KCl, aplicados uniformemente a todos os vasos. Os tratamentos consistiam das 10 espécies testadas, apresentadas no quadro 2.1. Cinquenta e um dias após a semeadura foi iniciada a coleta do experimento. Nesta época algumas espécies apresentavam indícios de florescimento. As plantas foram cortadas, separando-se raiz e parte aérea. As raízes foram utilizadas para medidas de pH da rizosfera, sendo depois cuidadosamente lavadas e secas em estufa, onde permaneceram por 48 horas a 65° C. A parte aérea foi seca em estufa, imediatamente após a coleta. Após a secagem, o material foi pesado, moído, determinando-se: Conteúdo de nitrogênio, pelo método de KJELDAHL, modificado segundo BREMNER (1965); N-NO^- e N-NH_4^+ , pelo método de arraste a vapor, usando-se óxido de magnésio e Liga de Devarda, segundo BREMNER e KEENEY (1965); conteúdo de P, empregando-se digestão nitro-perclórica (BATAGLIA *et*

al . 1983) e determinação colorimétrica, com desenvolvimento da cor azul em meio sulfúrico, tendo como redutor o ácido ascórbico, segundo EMBRAPA (1979); conteúdo de enxofre, pelo método turbidimétrico, usando-se BaCl_2 (MALAVOLTA *et al* . 1989); determinação do sulfato segundo ALLEN *et al* . (1985); determinação do cloreto, usando-se titulometria com nitrato de prata, segundo MALAVOLTA *et al*. (1989); K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ , usando-se espectrofotometria de absorção atômica, após digestão nitro-perclórica, segundo BATAGLIA *et al* . (1983) e determinação da cinza alcalina, conforme TUILL *et al* . (1964); JUNGK (1968) e ALLEN (não publicado). A estimativa da liberação de prótons pela rizosfera, foi calculada a partir da curva tampão do solo , correlacionada com os dados do pH em pasta, após o crescimento das plantas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos no quadro 2.1, nota-se diferenças marcantes no acúmulo de matéria seca da parte aérea. O feijão de porco, foi a espécie que produziu maiores quantidades de matéria seca, seguido do caupi e da mucuna preta. As espécies com menor produção foram centrosema, crotalária, amendoim e guandu. Em diversos experimentos o feijão de porco tem sido citado como uma espécie que apresenta altos níveis de produção de matéria seca (ABBOUD, 1986; CHADA e DE POLLI, 1988). Da mesma forma que guandu e crotalária tem sido relatados como espécies com baixa acumulação de matéria seca (ABBOUD, 1986).

No caso do guandu, trata-se de uma espécie semi - perene, apresentando taxas de crescimento inicial inferiores às daquelas das espécies anuais.

Com relação ao conteúdo de cátions (meq.100g^{-1} de matéria seca), pode-se observar nos resultados do quadro 2.3, que a centrosema foi a espécie com o maior conteúdo de cátions, seguida do amendoim, do feijão bravo e do guandu. Por outro lado, o caupi seguido pelo feijão de porco, apresentam o menor conteúdo. Pode-se notar, no entanto, que a acumulação de cátions totais por planta, mostrou uma considerável modificação, quando compara-se com o conteúdo de cátions (Quadro 2.3). Quando considera-se a acumulação total, o feijão de porco apresentou o maior valor, seguido da mucuna preta e do caupi, pois aquelas espécies que obtiveram maior conteúdo, produziram pouca matéria seca, o que promoveu menor acumulação total destes elementos.

Tabela 2. Espécies de leguminosas cultivadas para o estudo da cinza alcalina, do balanço cátion/ânion e da extrusão de prótons *

NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR	SIGLA
<i>Canavalia ensiformes</i> (L.) DC	Feijão de porco	FP
<i>Canavalia brasiliensis</i> M.	Feijão bravo	FB
<i>Mucuna aterrima</i> (Piper e Tracy) MERR. **	Mucuna preta	MP
<i>Mucuna deeringeana</i> (Bort) SMALL***	Mucuna rajada	MR
<i>Centrosema pubescens</i> BENTH	Centrosema	CP
<i>Dolichos lablab</i> L. ⁺	Lab-lab	DL
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) WALP ^x	Caupi	VU
<i>Crotalaria juncea</i> L.	Crotalaria	CJ
<i>Arachis hypogae</i> L.	Amendoim	AH
<i>Cajanus cajan</i> (L.) MILLAP ^y	Guandu	CC

* Segundo ALLEN e ALLEN, (1981).

** *Stizolobium aterrimum*

*** *Stizolobium deeringianum*

⁺ *Lablab purpureus* (L.) SWEET

^x *Vigna sinensis* L.

^y *Cajanus indicus* SPRENG

Os elementos cálcio e potássio foram responsáveis pela maior parte da acumulação de cátions, chegando em todas as espécies, a representar mais de 80% dos cátions acumulados na parte aérea. Em seis espécies, o cálcio foi o cátion acumulado em maiores quantidades, enquanto noutras quatro espécies o cátion acumulado em maior proporção foi o potássio.

Tabela 3. Peso da matéria seca (g) da parte aérea e da raiz de dez leguminosas tropicais cultivadas em vasos * por 50 dias em casa de vegetação.

ESPÉCIE	PARTE AÉREA (g)		RAIZ (g)
Feijão de porco	27,70	a	2,14 bc
Feijão bravo	12,80	cd	0,86 e
Mucuna preta	20,00	b	2,90 a
Mucuna rajada	14,00	cd	1,56 cde
Centrosema	7,20	e	0,84 e
Lablab	16,40	bc	1,45 cde
Caupi	27,30	a	2,44 ab
Crotalaria	11,80	d	1,48 cde
Amendoim	11,80	d	1,00 de
Guandu	11,80	d	1,67 cd

* Cada vaso recebeu 4,0 kg de solo.

** Valores seguidos de mesma letra minúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan $P < 0,05$.

Centrosema, crotalária, amendoim e guandu, foram as espécies que acumularam mais potássio do que cálcio, sendo que nestas espécies, o potássio respondeu por, 53%, 52%, 54% e 53% respectivamente, dos cátions absorvidos respectivamente, dos cátions absorvidos.

Com relação aos ânions, os resultados do quadro 2.4, mostram um conteúdo bem inferior ao de cátions. Dos ânions, o elemento que apresentou maiores conteúdos foi o fosfato, seguido do cloreto e do sulfato, ficando por último o nitrato, que apresentou conteúdos muito baixos, confirmando a baixa disponibilidade de N no solo.

A espécie que apresentou o maior somatório de ânions foi a mucuna rajada. O feijão bravo apresentou o menor somatório de ânions.

Com relação ao balanço cátion-ânion, a espécie que apresentou maior valor foi o feijão bravo, seguido da centrosema, amendoim e crotalária. O menor valor ficou para caupi, seguido do feijão de porco.

A cinza alcalina não se relacionou com C-A, o que em princípio parece estar de acordo com JUNGK (1968), pois segundo este autor, os dados de C-A e cinza alcalina, apenas correlacionam-se, quando os valores da cinza alcalina estão acima de 100 meq.100 g⁻¹ de matéria seca da parte aérea, o que não ocorreu em nenhuma das espécies estudadas. Com relação ao nitrogênio total, todas as espécies apresentaram conteúdo superior a 2%, com exceção da mucuna rajada (1,90 %). Guandu apresentou o maior conteúdo (2,80%).

Quanto ao pH do solo (Quadro), o feijão de porco foi a espécie que proporcionou a maior acidificação, especialmente no pH do solo (medido em pasta) e no pH do rizoplano. Em todos estes três casos, as diferenças foram significativas e indicam ser, a mais apta em termos de acidificação da rizosfera. O feijão de porco baixou o pH inicial do solo, que era de pH = 6,1, para pH (pasta) = 4,55; pH (em água 1:2,5) = 5,02; pH (rizoplano) = 4,70 e pH (rizocilindro) = 5,50. Com relação ao pH do rizocilindro, embora as diferenças tenham sido pequenas, outras espécies apresentaram valores de pH (rizocilindro) menores do que o feijão de porco. Esta determinação é feita cortando-se as raízes, o que libera substâncias intracelulares, desta forma, não apresenta a mesma relação direta que as outras medidas de pH, com a extrusão de prótons.

Tabela 4. Conteúdo de cátions (meq.100 g MS⁻¹) da parte aérea de dez espécies de leguminosas tropicais cultivadas em casa de vegetação.

ESPÉCIES	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺
Feijão de Porco	18,30 cd *	6,15 b	13,00 c	0,20	1,24
Feijão Bravo	27,08 a	5,10 bc	16,80 bc	0,33	0,63
Mucuna preta	23,80 ab	4,60 bc	19,30 abc	0,30	0,84
Mucuna rajada	22,90 b	4,70 bc	19,30 abc	0,25	0,57
Mucuna rajada	22,90 b	4,70 bc	19,30 abc	0,25	0,57
Centrosema	21,90 bc	4,30 c	30,80 a	0,36	0,49
Dolichos lablab	16,60 d	5,10 bc	20,00 abc	0,27	0,46
Caupi	14,10 d	4,30 c	12,80 c	0,30	0,56
Crotalária	16,30 d	8,10 a	27,80 ab	0,37	0,79
Amendoim	17,20 d	8,40 a	30,80 a	0,20	0,55
Guandu	18,00 cd	4,90 bc	28,00 ab	0,28	1,79

Valores seguidos de mesmas letras minúsculas, na mesma coluna, não diferem-se pelo

teste de Duncan P< 0,05.

Tabela 5. Acumulação total de cátions por planta em relação a produção de matéria seca.

ESPÉCIE	meq. cátions. planta ⁻¹
Feijão de porco	10,77
Feijão bravo	7,12
Mucuna preta	9,28
Mucuna rajada	6,68
Centrosema	4,16
Lablab	7,29
Caupi	8,75
Crotalária	6,30
Amendoim	6,74
Guandu	6,24

Tabela 6. Conteúdo de ânions (meq. 100 g⁻¹ MS da parte aérea) em dez leguminosas cultivadas em casa de vegetação.

ESPÉCIE	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻
Feijão de Porco	4,90	1,00	10,58	0,080
Feijão bravo	4,95	1,70	6,48	0,082
Mucuna preta	3,90	1,15	10,95	0,084
Mucuna rajada	4,73	2,18	13,14	0,046
Centrosema	4,13	2,00	9,86	0,083
Caupi	4,05	1,50	10,44	0,052
Crotalária	5,48	3,00	8,64	0,104
Amendoim	5,48	0,68	10,76	0,176
Guandu	4,73	1,24	11,02	0,097

Tabela 7. Somatório de cátions, somatório de ânions, C⁺ - A⁻ e cinza alcalina da parte aérea de dez leguminosas tropicais cultivadas em casa de vegetação dados em meq. 100 g⁻¹ de matéria seca.

ESPÉCIES	S CÁTIONS	S ÂNIONS	(S C ⁺ - S A ⁻)	CINZA ALCALINA
Feijão de porco	38,89	16,56	22,33	60,80 abc *
Feijão bravo	55,64	13,21	42,43	75,30 ab
Mucuna preta	46,42	16,08	30,34	75,30 ab
Mucuna rajada	47,72	20,10	27,62	73,30 ab
Centrosema	57,85	16,07	41,78	75,80 ab
Lablab	44,43	16,94	27,49	47,50 d
Lablab	44,43	16,94	27,49	47,50 d
Caupi	32,06	16,04	16,02	56,00 cd
Crotalária	53,36	17,22	36,14	64,80 abc
Amendoim	57,15	17,40	39,75	60,30 bcd
Guandu	52,97	17,10	35,87	80,83 a

* Valores na mesma coluna seguidos de mesma letra minúscula, não diferem-se pelo teste

de DUNCAN ao nível de 5% P < 0,05.

Tabela 8. Nitrogênio total da parte aérea de dez leguminosas tropicais cultivadas em vasos por 50 dias em casa de vegetação.

ESPÉCIE	N total	
	%	meq.100 g MS ⁻¹
Feijão de porco	2,60	186
Feijão bravo	2,60	186
Mucuna preta	2,70	193
Mucuna rajada	1,90	136
Centrosema	2,50	179
Lablab	2,40	171
Caupi	2,20	157
Crotalária	2,60	186
Crotalária	2,60	186
Amendoim	2,10	150
Guandu	2,80	200

O quadro 9 apresenta uma estimativa da extrusão de prótons nas espécies testadas. Praticamente não houve diferença entre as espécies, sendo que somente o feijão de porco se destacou das demais. Há entretanto que se considerar, a diferença entre as espécies quanto ao total de nitrogênio fixado e os cátions absorvidos do solo.

O quadro 2.2, que apresenta o peso da matéria seca da parte aérea e das raízes, permite observar que mucuna preta, caupi e feijão de porco, foram as espécies que produziram maiores quantidades de massa radicular. Neste caso existe um maior contato das raízes com o solo, podendo haver nessa interface solo/raíz, uma maior acidificação dessa região. Com efeito, essas foram as espécies que apresentaram os menores valores de pH rizosférico (quadro 2.8) e as maiores acumulações de cátions (quadro 2.4).

As plantas acumularam quantidades maiores de cátions do que de ânions, no entanto, os valores de C - A (cátions menos ânions), não foram tão elevados quanto os

dados fornecidos pela literatura, como *e. g.* em MENGEL e STEFFENS (1982) e em HAUTER e STEFFENS (1985). Segundo estes autores, a diferença C - A, chega a alcançar 180 miliequivalentes por 100 gramas de matéria seca (em trevo vermelho), ficando a média, em torno de 132 miliequivalentes por 100 gramas de matéria seca.

Uma possível explicação para essa grande diferença na acumulação de cátions e no balanço cátion menos ânions, ($C^+ - A^-$), entre os autores citados e os resultados aqui apresentados, é que no presente trabalho utilizou-se espécies tropicais rústicas, pouco melhoradas e adaptadas a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes. Somente para efeito comparativo, cita-se os trabalhos de HAUTER e MENGEL (1988) e HAUTER e STEFFENS (1985), nos quais foram aplicadas quantidades de fertilizantes equivalentes a toneladas por hectare, como no caso do potássio, para o qual utilizou-se uma dose equivalente a 2.240 kg de $K_2O \cdot ha^{-1}$ (tendo como fonte o KCl e o $K_2 SO_4$) e ainda 2.700 kg de $CaCO_3 \cdot ha^{-1}$ (tendo como fonte $Ca CO_3$) não com o objetivo de corrigir a acidez, já que o $pH_{(KCl)}$ do solo era $pH_{(KCl)} = 6,9$. Além disto, a espécie testada, em ambos os trabalhos citados, era o trevo vermelho (*Trifolium pratense*), uma pastagem melhorada e normalmente cultivada em solos de boa fertilidade e com altos níveis de adubação. Desta forma, qualquer base de comparação fica extremamente dificultada devido as enormes diferenças nas condições de cultivo das espécies estudadas.

Os resultados aqui apresentados, devem ser vistos, inicialmente, como indicativos. É necessário estabelecer parâmetros nutricionais e de eficiência na aquisição de nutrientes em ambientes de baixa disponibilidade natural.

Todas as leguminosas testadas apresentaram um padrão alcalino de absorção, i. e. , absorveram mais cátions do que ânions. Os dados do balanço cátions-ânions, não se relacionaram com os dados da cinza alcalina, devido a dois fatores. Em primeiro lugar, nenhuma planta apresentou um valor de cinza alcalina acima de 100 meq. 100 g⁻¹ de matéria seca da parte aérea e segundo JUNGK (1968), somente acima destes valores é que o balanço $C^+ - A^-$ e a cinza alcalina apresentam uma alta correlação positiva. Em segundo lugar, devido as condições de baixa disponibilidade de bases, que de certa forma retrata os solos tropicais, não foi possível obter um valor de $C^+ - A^-$ suficientemente elevado. Para as condições do experimento, estes valores parecem fornecer informações úteis com relação ao comportamento de leguminosas rústicas, eficientes em mobilizar bases em condições de baixa disponibilidade.

O padrão alcalino de absorção de nutrientes, foi suficiente para promover a alteração no valor do pH da rizosfera, como pode ser observado nos valores do quadro 2.8. Quando os dados de absorção de nutrientes, são apresentados em termos de acumulação total (meq de cátions . planta⁻¹), quadro 2.4, observou-se uma relação entre plantas com maior acumulação de cátions e plantas com maior acidificação no solo e na rizosfera. Feijão de porco, caupi e mucuna preta, espécies que produziram maior acidificação no solo, foram exatamente as espécies que apresentaram os maiores valores de acumulação de cátions. O excesso de cátions, está intimamente ligado a capacidade da planta em realizar a extrusão de prótons (RAIJ e DIEST, 1979; AGUILAR e DIEST, 1981).

Tabela 9. pH do solo pH do rizoplano e do rizocilindro de 10 leguminosas tropicais cultivadas em vasos por 50 dias em casa de vegetação.

ESPÉCIE	pH do Solo	pH do Rizoplano	pH do Rizocilindro	Pasta 1: 2,5
Feijão de porco	4,55 d *	5,02 d	4,70 e	5,50 a
Feijão bravo	5,06 abc	5,30 bc	5,14 bc	5,51 a
Mucuna preta	5,00 bc	5,22 bcd	5,00 cd	5,08 b
Mucuna rajada	4,99 bc	4,99 bc	5,15 bc	5,38 a
Centrosema	5,18 ab	5,42 ab	5,38 ab	5,59 a
Lablab	5,12 abc	5,35 abc	5,19 bc	5,46 a
Caupi	4,83 c	5,16 cd	4,89 de	5,30 ab
Crotalária	5,06 abc	5,35 abc	5,29 ab	5,56 a
Amendoim	5,30 a	5,58 a	5,47 a	5,32 ab
Guandu	5,05 abc	5,40 abc	5,18 bc	5,42 a

* Valores seguidos de mesmas letras minúsculas, na mesma coluna, não diferem-se pelo

teste de Duncan $P < 0,05$.

Tabela 10. Liberação de H^+ pela rizosfera de dez leguminosas tropicais cultivadas em vasos em casa de vegetação. *

ESPÉCIE	meq. kg^{-1} de solo
Feijão de Porco	12,20
Feijão bravo	11,90
Mucuna preta	11,90
Mucuna rajada	11,90
Centrosema	11,80
Lablab	11,90
Caupi	11,80
Crotalária	11,90
Amendoim	11,80
Guandu	11,90

* Calculado a partir da curva tampão do solo, correlacionada com os dados de pH em pasta.

É possível, dessa forma, que em condições tropicais, sob limitações nutricionais, as plantas não necessitem de quantidades tão grandes de cátions e $C^+ - A^-$, para realizar a acidificação da rizosfera, tendo desenvolvido mecanismos que permitem essa extrusão efetiva, sob as condições ambientais predominantes.

Também é razoável supor que em condições de restrições nutricionais, a apresentação dos resultados na forma de acumulação total, possa fornecer uma melhor interação entre o balanço cátion - ânions e a acidificação.

3.4 CONCLUSÕES

1. Todas as espécies crescendo com N_2 simbiótico apresentaram um padrão alcalino de absorção de nutrientes.
2. Não houve relação entre a determinação da cinza alcalina e o excesso de cátions ($C^+ - A^-$).
3. Todas as espécies promoveram acidificação do solo e da rizosfera, tendo o feijão de porco {*Canavalia ensiformes* (L.) DC} apresentado a maior acidificação.
4. A apresentação dos dados em forma de acumulação total de íons parece ter uma melhor relação com a acidificação da rizosfera.

3.5 REFERÊNCIAS

ABBOUD, A.C. de S. Eficiência da adubação verde associada a fosfato natural de Patos de Minas. Tese de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, 1986.

AGUILAR, S.A. & DIEST, A van. Rock phosphate mobilization induced by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil* v. 61, n. 1, 27-42, The Hague, 1981.

ALLEN, O N. & ALLEN, E. K. The Leguminosae a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison, WI, USA, 1981.

ALLEN, S. ; RAVEN, J. A. & THOMAS, G. E. Ontogenetic changes in chemical composition of *Ricinus comunis* grown with NO_3^- , NH_4^+ as N source. *Journal of Experimental Botany*, v. 36 n. 164:413-425, Ashford, UK, 1985.

BEN-ZIONI, A. ; VAADIA, Y. & LIPS, H. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol. Plant.* , v. 24: 288-290, 1971.

BANWART, W. L. & PIERRE, W. H. Cation-anion balance of field-grown crops. I. Effect of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* v. 67 n. 1:14-19; jan. - fev. , 1975a.

BANWART, W. L. & PIERRE, W. H. Cation-anion balance of field-grown crops: II. Effect of P and K fertilization and soil pH. *Agronomy Journal* v. 67 n. 1: 20-25, 1975b.

BATAGLIA, O C. ; FURLANI, A. M. C. : TEIXEIRA, J. P. F. ; FURLANI, P. R. & GALLO, J. R. Métodos de Análise Química de Plantas. BOLETIM TÉCNICO n. 78, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 1983.

BEKELE, T. ; CINO, B. J. ; EHLERT, P. A. I. ; MAAN, A. A. van der & DIEST, A. van. An evaluation of plant borne factors promoting the solubilization of alkaline rock phosphates. *PLANT and SOIL*, v. 75, 361-378, 1983.

BREMNER, J. M. Inorganic forms of nitrogen. IN: C. A. BLACK (ed.) *Methods of Soil Analysis*, Part 2, Agronomy 9 : 1179-1237, Madison, WI, USA, 1965.

BREMNER, J. M. & KEENEY, D. R. Steam Distillation Methods for Determination of Amonium, Nitrate and Nitrite. *Anal. Chim. Acta*, v. 32 , 485-549, 1965.

CHADA, S. S. & DEPOLLI, H. Nodulação de leguminosas tropicais promissoras para a adubação verde em solo deficiente em fósforo. *PAB*, v. 23 n. 11, 1197-1202, 1988.

CUNNINGHAN, R. K. Cation-Anion relationships in crop nutrition: III. Relationships between the ratios of sum of cations, sum of anions and nitrogen concentration in several plant species. *J. Agric. Sci.* , v. 63. , 109-111, 1964.

DAVIES, D. D. Control of and by pH. *Symp. Soc. Exp. Biol.* , v. 27, 513-529, Cambridge, UK, 1973.

DIJKSHOORN, W. Metabolic regulation of the alkaline effect of nitrate utilization in plants. *Nature*, v. 194 n. 4828, 165-167, 1962.

DIJKSHOORN, W. ; LAMOE, J. E. & BURG, P. F. J. van. A method of diagnosing the sulfur nutrition status of herbage. *PLANT and SOIL*, V. 13 277-341 , The Hague, 1960.

EGMOND, F. van. Nitrogen nutritional aspects of the ionic balance of plants. *IN Nitrogen In The Environment : Soil - Plant - Nitrogen Relationships* ; NIELSEN, D. R. & MACDONALD, J. G. (Eds.); pp. 171-189, Academic Press, 1978.

EMBRAPA-SERVIÇO NACIONAL DE LEVANTAMENTO E CONSERVAÇÃO DE SOLOS. *Manual de Métodos de análise do solo*. Rio de Janeiro, RJ, SNLCS, 1979.

- FRANCO, A. A. & DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com rizobium-feijão e a influência de diferentes nutrientes. *Pesq. Agropec. Brasileira* v. 2 , 4670-4674, 1967.
- FRANCO, A. A. & DÖBEREINER, J. Toxidez de manganês de um solo ácido na simbiose soja - *Rizobium*, *Pesq. Agropec. Brasileira, Série Agronomia*, v. 6, 57-66, 1971.
- HAUTER, R. und STEFFENS, P. Einfluss einer Mineralischen und Symbiotischen Stickstoffernährung auf Protonen abgabe der Wurzel, Phosphat Aufnahme und Wurzelentwicklung von Rotklee. *Zeitschrift Pflanzenernährung und Bodenkunde*, v. 148 n. 6 , 633-646, Weinheim, BRD, 1985.
- HAUTER, R. & MENGEL, K. Measurement of pH at the root surface of red clover (*Trifloium atense*) grown in soils differing in proton buffer capacity. *Biol. Fertil. Soils* 5: 295-298, 1988.
- HAYNES, R. J. Soil acidification induced by leguminous crops. *Grass and Forage Science*, v. 38 n. 1 , 1983.
- HELYAR, K. R. Nitrogen Cycling and soil acidification. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* v 42 , 217-221 , 1976.
- HIATT, A. J. Relationship of cell sap pH to organic acid change during ion uptake. *Plant Physiology*, v. 42 , 294-298 , 1967.
- JUNGK, A. Die Alkalität der Pflazenashe als mass für den Kationenüberschuss in der Pflanze. *Z. Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, v. 120 , 99-105, 1968.
- JUNGK, A. Wechselwirkungen zwischen Stickstoffkonzentration (NH_4^+ , NH_4NO_3 und NO_3^-) und pH der Nährlösung auf Wuchs und Ionenhaushalt von Tomatenpflanzen. *Gartenbauwissenschaft* 35 : 13 - 28, 1970.

JUNGK, A. Effect of ammonium and nitrate nitrogen on the cation-anion balance in plants and its relationship to the yield. *Landw. Forsch. Sonderh.* , v.21, 50-63,1967.

KIRKBY, E. A. Recycling of K in plants considered in relation to ion uptake and organic acid accumulation. *IN Proc. 7th Int. Coll. on Plant Analysis and Fertilizers Problems*; pp. 577-568; Hannover, FRG, 1974.

KIRKBY, E. A. & MENGEL, K. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. *Plant Physiol.*, v. 42, 6 -14, 1967.

MALAVOLTA, E. ; VITTI, G. C. e OLIVEIRA, S. A. de . Avaliação do estado nutricional das plantas. Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba SP, 1989.

MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 1986. 673 p.

MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. *In vivo* measurements of root - induced pH changes at soil - root interface: Effect of plant species and N source. *Z. Pflanzphysiol.*111, 241-251, 1983.

MENGEL, K. & KIRKBY, E. A. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Berne, Switzerland (Swiss), 1987. 687 p.

MENGEL, K. und STEFFENS, D. Beziehung zwischen Kationen/Anionen - Aufnahme von Rotklee und Protonenabscheidung der Wurzeln. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, Bd. 145 n. 3: 227-314, 1982.

NYATSANGA, T. & PIERRE, W. H. Effect of nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agron. J.* v. 65 , 936-940, 1973.

NYE, P. H. Changes of pH across the rizosphere induced by roots. *Plant and Soil*, v. 61 : 7-26 , 1981.

PIERRE, W. H. ; MEISINGER, J. & BIECHETT, J. R. Cation-anion balance in crops as a factor in determining the effect of nitrogen fertilizers on soil acidity. *Agron. J.* , v. 62 : 106-112 , 1970.

PIERRE, W. H. & BANWART, W. L. The excess-base and excess-base/nitrogen ratio of various crop species and parts of plants. *Agronomy Journal*, v. 65:91-96, 1973.

RAIJ, B. van & DIEST, A. van Utilization of phosphate from different sources by six plant species. *Plant and Soil* v. 51: 577-589, 1979.

SCHALLER, G. und FISCHER, W.R. pH-Änderungen in der Rizosphäre von Mais und Erdnusswurzeln. *Zeitschrift für Pflazenerhnärung. Bodenk.* 148: 306-320, 1985.

SILVA, E. M. R. ; ALMEIDA, D. L. de : FRANCO, A. A. & DÖBEREINER, J. Adubação verde no aproveitamento de fosfato em solo ácido. *R. Bras. Cie. Solo*, Campinas,SP, v. 9 n. 1 , 85-88, jan. - abr. , 1985.

RAVEN, J. A. & SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* v. 76, 415-431 , 1976.

TUIL, H. D. W. van ; LAMPE, J. E. M. & DIJKSHOORN, W. The possibility of relating the ash alkalinity to the organic - salt content. *Mededeling 250 Van Het, I. B. S.*: 157-160, 1964.

ULRICH, A. Metabolism of non - volatile organic acids in excised barley roots as related to cation - anion balance during salt accumulation. *American Journal Of Botany*, v.28: 526-536, 1941.

4. CAPÍTULO I I I

**EFICIÊNCIA DE QUATRO LEGUMINOSAS TROPICAIS DEPENDENTES
DE N₂ SIMBIÓTICO NO APROVEITAMENTO DO FOSFATO DE ROCHA
DE PATOS**

4.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas agrícolas mais adaptados às condições climáticas e edáficas dos trópicos, é uma necessidade reconhecida por diversos autores (CLARKSON, 1985; MARSCHNER, 1986). O elevado intemperismo, que ocorre nas regiões tropicais, leva a uma baixa fertilidade natural dos solos, sendo que 68 % da superfície do Brasil é ocupada por Latossolos (Oxissolos) e Podzólicos (Ultissolos).

Os principais problemas apresentados por esses solos, relacionados com sua utilização agrícola, podem ser assim resumidos: elevada acidez, teores tóxicos de alumínio trocável, baixos teores de fósforo disponível e muitas vezes também de fósforo total, elevada capacidade de fixação de fósforo, baixos teores de bases trocáveis, baixos teores de matéria orgânica e nitrogênio. As medidas recomendadas para a correção de alguns desses problemas, como a calagem, a adubação com fertilizantes solúveis fosfatos e nitrogenados, entre outras, tem um custo elevado e nem sempre são acessíveis aos produtores rurais, especialmente os de menor poder aquisitivo. Desta maneira, o estudo de sistemas biológicos eficientes, no sentido do aproveitamento dos recursos naturais é uma necessidade, tanto para a agricultura atual, quanto para as gerações futuras (UNCED,1992 e Forum Global, 1992), visto que as fontes de alguns nutrientes, como no caso do fósforo, são finitas.

Entre algumas das práticas agrícolas usadas no sentido de melhorar a eficiência biológica dos agroecossistemas, reciclando nutrientes, destaca-se a adubação verde, a qual consiste na incorporação de plantas ao solo, com o objetivo de obter benefícios para as culturas seguintes (MYIASAKA, 1983). Plantas de diversas famílias são utilizadas, no

entanto, as leguminosas são adotadas em maior escala, devido a capacidade de fixarem nitrogênio do ar, através de simbiose com algumas bactérias dos generos *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. O processo de fixação biológica de nitrogênio, ocorre na dependência de atividade enzimática (enzima nitrogenase), no qual a energia é fornecida via ATP. É possível que por formarem nódulos as leguminosas tenham uma maior demanda por fósforo, do que as plantas que dependem do nitrogênio mineral (FRANCO, 1977).

Como nos solos tropicais, o fósforo é um elemento limitante, é de se supor que as leguminosas desenvolveram mecanismos eficientes de mobilização e de utilização desse elemento, já que, segundo FOX (1978), o fósforo é o mais importante fator limitante, em termos nutricionais, à produção de leguminosas em solos tropicais.

4.1.1 Adaptações das plantas ao estresse de fósforo

As plantas comportam-se diferencialmente em relação a escassez de fósforo nos solos. Diversas são as adaptações apresentadas pelas plantas para superar a deficiência de P (fósforo), entre elas cita-se: alterações morfológicas no sistema radicular e ou alterações no meio iônico (GARDNER et al. 1983 ; MARSCHNER, 1986); associações simbióticas e assimbióticas com microrganismos na rizosfera (SAUNDERS e TINKER, 1971; HAYMAN e MOSSE, 1972; LOPES e LOMBARDI, 1981).

CLARKSON (1985), relata que os modelos matemáticos utilizados para explicar a absorção de nutrientes do solo, estão associados a fatores do solo, fatores de absorção do sistema radicular e fatores morfológicos. Os fatores do solo determinam a taxa na qual um determinado nutriente atinge a superfície da raiz, os fatores morfológicos definem a taxa de

crescimento da superfície de absorção e os fatores de absorção, definem a capacidade de absorção de nutrientes pela raiz.

Segundo CLARKSON (1985), em relação ao fosfato, a taxa de absorção não depende tanto das propriedades de absorção da raiz, mas sim da taxa de difusão desse elemento na zona de depleção. SILBERBUSCH e BARBER (1983), utilizando modelos matemáticos, observaram que os fatores do solo e parâmetros morfológicos da raiz, foram mais importantes do que os fatores cinéticos de absorção de P, em plantas de soja, a partir de experimentos em câmaras de crescimento.

4.1.2 Morfologia do Sistema Radicular

STEFFENS (1984), estudando alguns parâmetros de raízes e absorção de P em trevo vermelho (*Tifolium pratense*) e azevém (*Lolium multiflorum*), observou que o azevém apresentava diâmetro de raízes mais fino, pelos radiculares mais longos e comprimento de raízes, em torno de cinco vezes maior, que os de trevo vermelho. Todos os parâmetros se correlacionaram com a absorção de fósforo. SILBERBUSH e BARBER (1983) notaram que a taxa de crescimento da raiz e o raio da raiz foram os parâmetros mais sensíveis na absorção de P em soja (*Glycine max*).

A deficiência de P pode afetar a morfologia do sistema radicular (RUSSEL, 1977; BARBER, 1979 ; DREW, 1979). SCHENK e BARBER (1979), relataram que plântulas de milho, crescendo em câmaras, com amostras de seis diferentes tipos de solos, apresentavam menor raio médio de raiz e maior superfície de raiz por grama de parte aérea produzida, nas plântulas de solos com baixa concentração inicial de P.

ANGHINONI e BARBER (1980), estudando o efeito do estresse de P em plantas de milho em solução nutritiva, observaram que aos 12 dias o peso da raiz e o comprimento aumentaram, enquanto o raio médio diminuiu, com o aumento do período de estresse de fósforo. HALLMARK e BARBER (1984), trabalhando com soja (*Glycine max*) sob estresse de P, observaram que a aplicação de 100 ppm de P ao solo, provocou uma diminuição no comprimento de raízes, no raio médio e na superfície de área de raiz por grama de parte aérea.

4.1.3 Modificações físico-químicas no ambiente radicular

A atividade das plantas pode modificar o ambiente químico na interface solo-raiz (LONERAGAN, 1979). O equilíbrio de fosfato e outros íons, pode ser modificado pela atividade dos vegetais (BLACK, 1968).

Existem na literatura diversas referências a mecanismos, os quais podem provocar modificações físico-químicas no ambiente radicular. MULETE *et al.* (1974), relataram o uso de fósforo insolúvel por plantas do gênero Eucalipto, enquanto que JAYMAN e SIVASUBRAMANIAN (1975) registraram a eficiência do chá da Índia (*Camellia sinensis*) em exudar ácidos orgânicos, obtendo assim P de componentes pouco solúveis dos solos. GRINSTED *et al.* (1982), resumem alguns dos mecanismos que provocam alterações na concentração do P na solução do solo: exudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular pelas raízes da planta, diminuindo o pH da rizosfera, o que modifica a solubilidade do fósforo do solo; extrusão de H^+ e ou OH^- , a fim de manter um balanço de cargas elétricas associado com a absorção de cátions e ânions.

Segundo AGUILAR e DIEST (1981) e BEKELE *et al.* (1983), as plantas podem apresentar excesso de cátions ou de ânions absorvidos. No primeiro caso, diz-se que apresentam um padrão alcalino de absorção, enquanto no segundo caso trata-se de um padrão ácido de absorção. A forma pela qual o nitrogênio é absorvido, tem papel fundamental no excesso de cátions ou ânions, visto ser este o elemento nutriente absorvido pelas plantas, em maiores quantidades. (JUNGK, 1970; MARSCHNER, 1986). O excesso de carga positiva ou negativa, vai determinar uma extrusão de H^+ ou de HCO_3^-/OH^- , o que poderá determinar reações físico-químicas na rizosfera, as quais podem interferir no aproveitamento de nutrientes, como o fósforo, a partir de fontes pouco solúveis, como os fosfatos de rocha (AGUILAR e DIEST, 1981; BEKELE *et al.* 1983).

Diversos trabalhos tem apresentado variações no pH da rizosfera, associadas a fonte de N presente. As plantas adubadas com NH_4^+ , apresentam uma acidificação da rizosfera, ocorrendo o contrário quando a fonte nitrogenada é o NO_3^- , (RILEY e BARBER, 1971; SMILEY, 1974; SOON e MILLER, 1977; AGUILAR e DIEST, 1981; MARSCHNER *et al.* 1982; CLAASSEN e JUNGK, 1982; BEKELE *et al.* 1983; GAHOONIA *et al.* 1992). As plantas que absorvem o nitrogênio a partir da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, também acabam promovendo a acidificação da rizosfera (NYATSANGA e PIERRE, 1973; AGUILAR e DIEST, 1981; BEKELE *et al.* 1983 e MARSCHNER e RÖMHELD, 1983). É importante notar que algumas espécies, como o grão de bico (*Cicer arietinum*) (MARSCHNER e RÖMHELD, 1983), o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (BEKELE *et al.* 1983) e o feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) (ASHER e EDWARDS, 1983), entre outras, são capazes de promover a acidificação da rizosfera, independentemente da forma de N absorvida.

A deficiência de fósforo no solo, pode induzir mecanismos de eficiência ao nível radicular, como relatado para o caso do tremço branco (*Lupinus albus* L.) por GARDNER e PARBERY, 1981; GARDNER *et al.* (1982) e GARDNER *et al.* (1983) . Estes autores relataram a ocorrência de raízes proteóides nesta planta e tentaram elucidar os mecanismos de indução da formação das mesmas, como uma função da deficiência de fósforo. MARSCHNER *et al.* (1982) ; MARSCHNER e RÖMHELD, (1983) ; MARSCHNER (1985) e MARSCHNER (1986) também observaram a formação deste tipo de raiz em tremço e que a presença da raiz proteóide diminuía, à medida que a concentração de fósforo era aumentada no ambiente radicular.

GAHOONIA e NIELSEN (1992), relataram o efeito de mudanças de pH na rizosfera das plantas e seu efeito na depleção de fósforo, tanto orgânico quanto inorgânico.

4.1.4 Fosfatos de Rocha

A utilização direta de fosfatos de rocha, apresenta diversas vantagens, mas também desvantagens.

Segundo LOPES *et al.* (1982), as vantagens seriam:

- a) Tecnologia de produção relativamente simples;
- b) Baixos investimentos;
- c) Baixa necessidade energética, em torno de 1/3 da energia requerida para a produção de fosfatos solúveis normalmente utilizados;
- d) Representa o modo mais rápido e talvez mais barato para o início de uma indústria básica de fosfatos em países em desenvolvimento.

e) Solubilização lenta, resultando em menor fixação de P em solos ácidos tropicais.

As desvantagens seriam:

- a) O teor de fósforo no fosfato de rocha é geralmente menor do que aquele encontrado em fosfatos solúveis de alta concentração, o que limita a sua competição no mercado, à medida que as distâncias entre os centros produtores e consumidores aumentam.
- b) Os fosfatos de rocha apresentam limitada amplitude de uso, uma vez que eles variam pela sua reatividade e sua eficiência agrônômica, sendo fortemente influenciada pelo tipo de solo, cultura agrícola utilizada e condições climáticas.
- c) Grande variação entre fosfatos naturais de diferentes origens.

Segundo KHASAWNEH e DOLL (1978), as rochas fosfatadas apresentam um comportamento bastante distinto, relacionado com a reatividade, quando aplicadas diretamente aos solos. As características físico-químicas e a origem das rochas é que determinam, em grande parte, essas diferenças. As rochas de origem magmática são pouco reativas, porque apresentam estruturas com cristais grosseiros, não apresentando superfícies internas. Enquanto que as rochas sedimentares são micro - cristalinas, apresentando uma área de superfície relativamente grande e assim, uma maior reatividade. Numa comparação entre fosfatos de rocha de origem ígnea e sedimentar, HOWELER e WOODRUFF (1968), concluíram que os de origem sedimentar apresentavam uma dissolução mais rápida no solo. LEON *et al.* (1986), trabalhando com 11 fosfatos de rocha da América do Sul, concluíram que os fosfatos de origem sedimentar foram mais reativos, do que aqueles de origem ígnea ou metamórfica.

O Brasil possui reservas geológicas de rochas fosfatadas, estimadas em 2,5 bilhões de toneladas (CARVALHO, 1977, citado por BARBOSA FILHO, 1984). A maior parte das jazidas brasileiras estão localizadas nos estados de Minas Gerais, Goiás e São Paulo, sendo que Minas Gerais concentra cerca da metade das reservas.

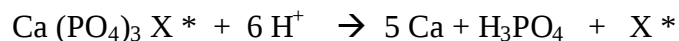
De acordo com CARVALHO (1977), citado por ALCARDE e PONCHIO (1980), as reservas brasileiras de fosfatos pertencem a quatro tipos principais de formações:

- a) Jazidas sedimentares, sob a forma de fosforitas (Olinda e de outros locais do nordeste);
- b) Jazidas sedimentar-metamórficas (*e. g.* Patos de Minas);
- c) Jazidas relacionadas com a atividade magmática, sob a forma de apatitas (*e. g.* Jacupiranga, SP ; Araxá, MG e Catalão, GO);
- d) Jazidas de concentração residual secundária, formando as bauxitas fosforosas (*e. g.* Trauíra e Pirocauí, MA).

Segundo RAIJ *et al.* (1981), as principais jazidas de fosfatos no Brasil, apresentam o mineral apatita $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6)_x$, como o composto de fósforo mais importante. Este mineral apresenta-se na natureza com grande variação na composição química, o que faz variar a sua eficiência.

Segundo KHASAWNEH e DOLL (1978), os primeiros fatores responsáveis pela eficiência das plantas em utilizar fósforo de fosfatos de rocha, seriam as diferenças entre as rochas, as propriedades dos solos e a eficiência das plantas.

As apatitas são termodinamicamente instáveis em condições de acidez do solo. A reação de dissolução da apatita, segundo CABALA-RONSAND e WILD (1982), seria:



* (onde X pode ser F, OH ou CO_3)

Essa reação indica que é necessária uma fonte de H^+ para que a reação se processe e que uma força de dreno por Ca^{2+} e H_3PO_4 favoreceriam a reação. Se X é flúor (F), este competirá por sítios de adsorção com o fósforo liberado (CABALA-ROSAND e WILD, 1982). No entanto, os íons fosfatos tenderão a formar compostos que serão, ainda menos solúveis que a apatita, que lhes deu origem. Esse é um dos principais problemas da utilização de rochas fosfatadas como fertilizantes (CABALA-ROSAND e WILD, 1982). A solubilização de fosfatos junto a rizosfera das plantas, poderia favorecer a absorção do P, reduzindo os efeitos da formação desses compostos de baixa solubilidade, às vezes chamados de insolúveis.

4.1.5 Aproveitamento de fósforo a partir de Fosfato de Rocha

JOHANSEN (1993), trabalhando com grão de bico (*Cicer arietinum*) e guandu (*Cajanus cajan*), relatou a solubilização e o aproveitamento de fósforo em solos pobres neste nutriente, além do aumento do “pool” de fósforo para as plantas subsequentes. O autor demonstra que o grão de bico libera muitos ácidos, em especial o ácido málico, de suas raízes. Enquanto que o guandu exsuda ácido psídico em sua rizosfera. Esses ácidos reagem com o fósforo ligado ao ferro, liberando P para as plantas.

BEUSICHEM (1981) e BEUSICHEM (1982), afirmam que os efeitos positivos do padrão alcalino de absorção de nutrientes das leguminosas, somente teria importância agrônômica na nutrição fosfatada em solos ácidos, com baixo poder tampão e com baixa capacidade de fixação de fósforo. AGUILAR e DIEST (1981), apresentaram resultados que comprovam o aproveitamento de fósforo por soja (*Glycine max*) e alfafa (*Medicago*

sativa), no entanto, trabalhando em areia ou com solo de baixo poder tampão. NYE (1981), argumenta que a mudança de pH ao longo da rizosfera é maior, quanto mais próximo o pH do solo estiver do pH mínimo (pH no qual o coeficiente de difusão está em seu menor valor). Isto chama atenção para o fato e que o mecanismos de extrusão de prótons, pode não ter grande importância na solubilização de fósforo em solos ácidos, ficando este efeito restrito a solos com pH mais elevado. SWART e DIEST (1987), demonstraram o aproveitamento de fósforo a partir de fosfatos de rocha, trabalhando em solo ácido e em solo neutro, com alta capacidade de fixação de fósforo trabalhando com cudzu (*Pueraria javanica*). SILVA *et al* . (1985) demonstraram, em condições de acidez o aproveitamento de fosfato de rocha por mucuna preta (*Mucuna aterrima*). ABOUD (1986), relatou que entre cinco espécies de leguminosas o guandu (*Cajanus cajan*) e o feijão bravo do Ceará (*Canavalia brasiliensis*), apresentaram melhor eficiência, em solo ácido, no aproveitamento de fósforo, a partir de fosfato de Patos de Minas.

O objetivo deste experimento, foi o de avaliar a capacidade de quatro leguminosas utilizadas como adubo verde, em aproveitar o fósforo a partir de fosfatos de rocha, em condições de acidez.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em vasos, contendo 4,0 kg de Solo Ecologia (Planossolo), coletado de 0 a 20 cm de profundidade. A análise realizada após a peneiração em tamiz de 0,5 cm, apresentou os seguintes resultados: pH = 5,4; $Al^{3+} = 1,2 \text{ meq.}100 \text{ g}^{-1}$; $Ca^{2+} = 1,2 \text{ meq.}100 \text{ g}^{-1}$; $Mg^{2+} = 0,8 \text{ meq.}100 \text{ g}^{-1}$; P = 7,3 ppm e K = 25 ppm. A análise foi realizada nos laboratórios da EMBRAPA-CNPAB.

Todos os vasos receberam uma dose de calcário dolomítico, equivalente a 500 kg. ha⁻¹ e 10 kg de K₂O ha⁻¹, na forma de KCl. Tomou-se por base, para os cálculos de adubação, 2,0 x 10⁶ kg como a massa de solo contida em 1,0 ha.

Os tratamentos consistiram de cinco doses de fósforo, assim divididas: 0, 40, 80, e 160 kg de P₂O₅ por hectare, na forma de Fosfato de Rocha de Patos de Minas e uma dose de 80 kg por ha de P₂O₅, na forma de Super Fosfato Triplo. Considerou-se o teor total de P₂O₅ do fosfato de rocha, como de 24%.

Foram testadas quatro espécies de leguminosas: feijão de *porco* (*Canavalia ensiformes*); feijão bravo do Ceará (*Canavalia brasiliensis*); mucuna preta (*Mucuna aterrima*) e mucuna rajada (*Mucuna deeringiana*). Todas as sementes foram inoculadas com estirpe adequada de rizóbio, fornecidas pelo laboratório de Microbiologia da EMBRAPA-CNPAB.

Após a germinação e desenvolvimento inicial, foi feito o desbaste para quatro plantas por vaso. A umidade do solo, durante o experimento, foi mantida próxima à capacidade de campo.

As plantas foram coletadas após 53 dias de plantio, devido ao comportamento volúvel, apresentado por todas as espécies, tendo neste momento, atingido o teto da casa de vegetação. Na época da coleta, as folhas mais velhas já apresentavam-se secas.

Após a coleta, a parte aérea foi cortada e seca em estufa por 48 horas, a uma temperatura de 65° C. As raízes foram cuidadosamente retiradas do solo, lavadas, retirados os nódulos e secos em estufa por 48 horas, a 65 ° C.

Após a determinação do peso da matéria seca, procedeu-se a análise química do tecido vegetal. Foi utilizada a metodologia de absorção atômica, como descrita em

BATAGLIA *et al.* (1983), para Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; K^+ e Na^+ . Para o nitrogênio total, utilizou-se a metodologia de BREMNER (1965); para NH_4^+ , usou-se o método de araste a vapor, com óxido de magnésio e Liga de Devarda (BREMNER e KEENEY, 1965); para o conteúdo de P, empregou-se a digestão nitro - perclórica (BATAGLIA *et al.* 1983) e determinação colorimétrica com o desenvolvimento de cor azul, em meio sulfúrico, tendo como redutor o ácido ascórbico (EMBRAPA, 1979).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no quadro 1, indicam que não houve efeito das doses, nem das fontes de fósforo na produção de matéria seca em todas as espécies testadas. A produção de matéria seca, nas condições do experimento, parece não ter sido limitada pelo fósforo. Isso é muito claro para as duas espécies do gênero *Canavalia* e para a *Mucuna deeringiana*, e menos evidente para a *Mucuna aterrima*.

Dentre as espécies, a que mais produziu matéria seca foi a *C. ensiformes*, diferindo significativamente das demais. A segunda espécie em termos de produção de matéria seca, foi *M. aterrima*, diferenciando-se significativamente de *C. brasiliensis* e de *M. deeringiana*. Estas duas últimas, não apresentaram diferença significativa entre si.

Com relação a acumulação de cátions (quadro 3.2), *C. ensiformis* apresentou os maiores valores de meq.total por vaso, seguida de *C. brasiliensis*, *M. aterrima* e por último a *M. deeringiana*. Os dados indicam que, com relação a acumulação de cátions, não houve resposta das plantas à aplicação de fosfato de rocha, pois mesmo aquelas que não

receberam os tratamentos, também apresentaram valores elevados de acumulação de cátions.

Tabela 11. Peso da matéria seca de quatro leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a diferentes doses e fontes de fósforo.

ESPÉCIE	DOSE DE P ₂ O ₅ (kg.ha ⁻¹)					
	0 ¹	40 ¹	80 ¹	160 ¹	80 ²	X
	Matéria Seca (g . vaso ⁻¹)					
<i>Canavalia ensiformes</i>	21,20	18,20	21,10	17,50	19,70	19,50 ^a
<i>Canavalia brasiliensis</i>	12,20	12,70	12,50	11,90	13,60	12,60 ^b
<i>Mucuna aterrima</i>	15,00	14,20	16,10	16,50	17,30	15,80 ^{ab}
<i>Mucuna deeringiana</i>	12,60	10,20	9,90	14,80	12,70	12,10 ^b
X	15,25	13,83	14,90	15,18	15,83	

¹ Fofato e Rocha de Patos

² Super Fofato Triplo

Valores na mesma coluna seguidos de letras minúsculas diferentes diferem entre si ao nível de P < 0,05 pelo teste de Duncan.

Tabela 12. Acumulação de cátions (Ca²⁺ + Mg²⁺ + K⁺ + NH₄⁺ + Na⁺) em meq total. vaso⁻¹ em quatro leguminosas usadas como adubo verde e sub-metidas a diferentes doses e fontes de fósforo.

ESPÉCIE	DOSE DE P ₂ O ₅ (em kg.ha ⁻¹)					
	0 ¹	40 ¹	80 ¹	160 ¹	80 ²	X
	meq.100 g-1 de Cátions					
<i>Canavalia ensiformes</i>	5,80	4,90	5,10	4,50	4,50	5,00
<i>Canavalia brasiliensis</i>	3,90	4,80	5,20	3,70	3,90	4,30
<i>Mucuna aterrima</i>	3,90	3,80	4,00	3,60	4,00	3,90
<i>Mucuna deeringiana</i>	3,30	2,70	2,70	3,30	3,80	3,20
X	4,20	4,00	4,30	4,30	4,00	

¹ Fofato de Rocha de Patos

² Super Fofato Simples

O total de bases extraídas do solo, mostrou diferenças marcantes entre gêneros e entre espécies (quadro 3.2), mas nenhum efeito significativo da adição tanto de fosfato de rocha quanto de superfosfato triplo. O feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) acumulou mais bases do que as demais espécies e a adição de ambas as fontes de fósforo, diminuiu o total de bases extraídas do solo. Quanto ao acúmulo de cálcio na parte aérea (quadro 3.3), as diferenças foram maiores, mas ainda não significativas. As espécies do gênero *Canavalia* acumularam mais cálcio do que as do gênero *Mucuna*, sendo que *M. aterrima* acumulou mais cálcio do que *M. deeringiana*.

Tabela 13. Acumulação de P (meq.vaso⁻¹) de quatro leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a diferentes doses e fontes de fósforo.

ESPÉCIE	DOSE DE P ₂ O ₅ (em kg.ha ⁻¹)					X
	0 ¹	40 ¹	80 ¹	160 ¹	80 ²	
	meq.vaso ⁻¹ de Fósforo (P)					
<i>Canavalia ensiformes</i>	1,10	0,90	1,20	1,20	1,60	1,20
<i>Canavalia brasiliensis</i>	0,60	0,80	0,80	0,80	1,10	1,00
<i>Mucuna aterrima</i>	0,60	0,70	0,80	1,00	1,00	0,80
<i>Mucuna deeringiana</i>	0,60	0,50	0,60	1,10	1,00	0,76
X	0,70	0,70	0,85	1,00	1,20	

¹ Fosfato de Rocha de Patos

² Super Fosfato Simples

Como esperado, o tratamento com superfosfato triplo diferenciou-se significativamente dos demais, apresentando uma maior acumulação de fósforo, por todas as espécies em estudo. Com relação aos tratamentos com fosfato de rocha, não houve diferença significativa. Com relação aos tratamentos com fosfato de rocha, embora perceba-se um maior acúmulo de P a medida que as doses são elevadas, não houveram diferenças significativas. Isto tanto pode indicar o baixo aproveitamento do P a partir do

fosfato de rocha, quanto que a duração do experimento pode não ter permitido o esgotamento de P das sementes das espécies cultivadas. Os resultados de produção de matéria seca, aparentemente confirmam esta hipótese, pois não houve diferença significativa entre os diversos tratamentos, tendo havido apenas diferenças entre as espécies.

Tabela 14. Porcentagem de P de quatro leguminosas usadas como adubo verde e submetidas a diferentes doses e fontes de fósforo.

ESPÉCIE	DOSE DE P_2O_5 (em $kg.ha^{-1}$)					X
	0 ¹	40 ¹	80 ¹	160 ¹	80 ²	
	% de Fósforo					
<i>Canavalia ensiformes</i>	0,11	0,11	0,13	0,13	0,13	0,13
<i>Canavalia brasiliensis</i>	0,10	0,12	0,15	0,15	0,17	0,14
<i>Mucuna aterrima</i>	0,08	0,10	0,11	0,12	0,14	0,11
<i>Mucuna deeringiana</i>	0,10	0,10	0,14	0,15	0,15	0,13
X	0,10	0,11	0,13	0,14	0,15	

¹ Fosfato de Rocha de Patos

² Superfosfato Triplo

Os dados de porcentagem de P, mostram uma leve tendência das plantas em responderem a aplicação de fósforo, especialmente nos tratamentos 160 $kg.ha^{-1}$ de Fosfato de Rocha de Patos e no tratamento de superfosfato triplo, não havendo diferença significativa entre os outros tratamentos. Com relação as espécies, não houve diferença significativa, tendo *C. brasiliensis* uma porcentagem de P e *M.deeringiana* a menor, sendo esta diferença muito pequena.

Tabela 15. Porcentagem de nitrogênio em quatro leguminosas usadas como adubo verde e tratadas com diferentes doses e fontes de fósforo.

ESPÉCIE	DOSE		DE P ₂ O ₅ (em kg.ha ⁻¹)			
	0 ¹	40 ¹	80 ¹	160 ¹	80 ²	X
	% de Nitrogênio					
<i>Canavalia ensiformes</i>	2,80	3,00	3,10	2,90	3,60	3,10 _a
<i>Canavalia brasiliensis</i>	2,20	2,60	2,30	2,70	3,30	2,50 _{ab}
<i>Mucuna aterrima</i>	1,80	2,10	2,00	2,70	2,30	2,50 _b
<i>Mucuna deeringiana</i>	2,10	1,70	2,20	2,60	2,50	2,20 _b
X	2,20 a	2,40 a	2,40 b	2,70 ab	2,90 a	

1 Fosfato de Rocha de Patos

2 Superfosfato Triplo

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna ou linha não diferem estatisticamente entre si ao nível de $P < 0,05$ do teste de Duncan.

O aumento da disponibilidade de fósforo, claramente aumentou a porcentagem de nitrogênio, em todas as espécies estudadas. A *Canavalia ensiformes* apresentou a maior porcentagem de nitrogênio, diferindo significativamente das espécies do gênero *Mucuna*. As *Mucunas* não diferiram entre si, sendo que *Canavalia brasiliensis* apresentou valor intermediário.

Tabela 16. Nitrogênio total acumulado por quatro leguminosas usadas como adubo verde, tratadas com diferentes doses e fontes de fósforo.

ESPÉCIE	DOSE		DE P ₂ O ₅ (em kg.ha ⁻¹)			
	0 ¹	40 ¹	80 ¹	160 ¹	80 ²	X
	Nitrogênio Total					
<i>Canavalia ensiformes</i>	0,59	0,54	0,66	0,50	0,72	0,60
<i>Canavalia brasiliensis</i>	0,30	0,33	0,29	0,32	0,44	0,34
<i>Mucuna aterrima</i>	0,27	0,28	0,32	0,40	0,44	0,34
<i>Mucuna deeringiana</i>	0,26	0,18	0,22	0,32	0,39	0,27
X	0,36	0,33	0,37	0,39	0,50	

¹ Fosfato de Rocha de Patos

² Superfosfato Triplo

Com relação ao nitrogênio total acumulado, observa-se o mesmo comportamento, ou seja, houve diferença significativa, sendo que a maior acumulação foi com aplicação de superfosfato triplo, seguido das doses 160, 80 e 40 kg. ha⁻¹ de fosfato de rocha. A testemunha diferiu significativamente, tanto da rocha fosfatada, quanto do superfosfato triplo. A maior acumulação de nitrogênio total, com fosfato de rocha foi observada em *Canavalia ensiformes*, seguida de *Canavalia brasiliensis* e *Mucuna aterrima*, a menor acumulação ficou com *Mucuna deeringiana*.

Os resultados não foram muito evidentes, quanto ao aproveitamento de P do fosfato de rocha pelas plantas. Suspeita-se que a pouca duração do experimento e as limitações espaciais, não tenham permitido o esgotamento total das reservas de P das sementes, o que impediu que se expressasse uma maior diferença entre os tratamentos.

Segundo ANDREW (1977), as respostas das leguminosas a doses de fósforo, são controladas pelo tamanho da semente, taxa de absorção e necessidade interna de fósforo. Como as espécies apresentam sementes de tamanho relativamente grande (todas as espécies mas em especial *Canavalia ensiformes*), pode-se supor que as reservas de fósforo das mesmas, não tenham sido totalmente esgotadas. Espécies com baixa reserva de fósforo na semente e capazes de absorver grandes quantidades de fósforo do solo, ou de fontes poucos solúveis, seriam importantes tanto como extratoras, como protetoras de fósforo em agroecossistemas. Segundo ABOUD (1986), este seria o caso do guandu (*Cajanus cajan*), o que é confirmado pelos trabalhos de JOHANSEN (1993) e MACHADO (1993).

A retirada de cálcio do solo e ou da rocha fosfatada, pode fornecer a saída de íons fosfatados dos minerais de rocha (KAHSAWNEH e DOLL, 1978). Desta forma, as espécies que absorvem mais cálcio do solo, podem contribuir para o deslocamento do equilíbrio da solução do solo, no sentido da solubilização da rocha. Como o feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) e o feijão bravo do Ceará (*Canavalia brasiliensis*), acumularam mais bases e mais cálcio do que as espécies do genero *Mucuna*, é possível supor, que estas plantas apresentam uma melhor eficiência no aproveitamento do fósforo a partir do fosfato de rocha. De fato, a acumulação de P pelo feijão de porco, foi significativamente maior do que as outras espécies. No entanto, uma avaliação mais precisa da eficiência da solubilização de fosfatos de rocha, somente poderia ser realizada em experimentos de campo, de longa duração, nos quais pudessem ser realizados o completo balanço do fósforo no sistema.

Quanto ao efeito da absorção de nitrogênio no pH rizosférico, apesar de não terem sido realizadas estas medidas, os resultados dos capítulos I e II da presente tese, mostraram que as plantas foram capazes de promover acidificação da rizosfera, tendo o feijão de porco apresentado o menor valor de pH para rizoplane, diferindo-se estatisticamente das outras espécies. Espera-se que tenha havido acidificação da rizosfera, no entanto, somente seria possível afirmar que houve realmente aproveitamento do fosfato de rocha, a partir de experimentos de longa duração e a campo.

Muitos experimentos relatados nas referências bibliográficas apresentam resultados positivos nas respostas das leguminosas a aplicação de fosfatos de rocha (AGUILAR e DIEST, 1981; BEKELE *et al.* 1983 e SWART e DIEST, 1987). Entretanto, é preciso

lembrar que estes experimentos foram conduzidos com fosfatos de rocha africanos, de origem sedimentar e por isso, com uma eficiência agronômica bem superior àquela do fosfato de rocha de Patos. Novamente, seriam necessários experimentos de longa duração, para avaliar a real eficiência das leguminosas em aproveitar o fosfato de rocha de Patos, em condições tropicais de solos ácidos, testando a hipótese de NYE (1981) e de BEUSICHEM (1981 e 1982), de que o aproveitamento de P a partir de fosfatos de rocha somente seria possível em solos com pH elevado e de baixo poder tampão.

Como o efeito da acidificação da rizosfera das leguminosas, devido ao padrão alcalino de absorção de nutrientes, é um efeito localizado, a recomendação da aplicação de fosfato de rocha na linha de plantio, seria uma prática recomendável.

Experimentos de curta duração, em casa de vegetação, não são adequados à avaliação da eficiência destas espécies, em aproveitar o fósforo a partir do fosfato de rocha.

4.4 CONCLUSÕES

1. Não houve efeito das doses e fontes de fósforo na produção de matéria seca.
2. *Canavalia ensiformes* produziu mais matéria seca, acumulou maiores quantidades de bases e de Ca^{2+} , acumulou mais fósforo de ambas as fontes utilizadas e acumulou mais nitrogênio que as outras espécies testadas.
3. Os resultados não permitem concluir se houve ou não aproveitamento de P do Fosfato de Rocha de Patos, pelas espécies testadas.
4. Experimentos a campo de longa duração devem ser conduzidos com espécies de alta

reserva de P nas sementes e rápido crescimento para avaliar a solubilização e o aproveitamento do P a partir de fosfatos de rocha.

4.5 REFERÊNCIAS

ABBOUD, A. C. de S. Eficiência da adubação verde associada a fosfato natural de atos de Minas. Tese de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, 1986.

AGUILAR, S. A. & DIEST, A. van Rock-phosphate mobilization by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil* v. 61: 27-42, The Hague, 1981.

ALCARDE, J. C. e PONCHIO, C. O Caracterização das solubilidades das rochas fosfatadas brasileiras e termofosfatos em diversos extratores químicos. *Revista Bras. de Cie. do Solo*, v. 4:196-200, 1980.

ANGHINONI, I. A. & BARBER, S. A. Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. *Agron. J.* V. 72, 685-688, 1980.

ASHER, C. J. & EDWARDS, D.G. Modern solution culture techniques. *IN: Inorganic Plant Nutrition*, LAUCHLI, A. & BIELESKI, R. L. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1983.

BARBER, S. A. Growth requirements for nutrients in relation to demand at root surface. *IN: HARLEY, J. L. & RUSSEL, R.S. , (Eds.), The Soil-Root Interface*, Academic Press, London, 1979.

BLACK, C. A. *Soil-Plant Relationships*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 1968.

BEKELE, T. ; CINO, B. J. ; EHLERT, P. A. I. ; MAAN, A. A. van der & DIEST, A. van. An evaluation of plant borne factors promoting the solubilization of alkaline rock

phosphates. *Plant and Soil*, v. 75:361-378, 1983.

BATAGLIA, O. C. ; FURLANI, A. M. C. ; TEIXEIRA, J. P. F. ; FURLANI, P. R. & GALLO, J.R. Métodos de Análise Química de Plantas. Boletim Técnico n. 78, IAC, Campinas, SP, 1983.

BEUSICHEM, M. L. van. Nutrient absorption by pea plants during dinitrogen fixation.

1. Comparison with nitrate nutrition. *Neth. J. Agric. Science*, v. 29:259-172; 1981.

BEUSICHEM, M. L. van. Nutrient absorption by pea plants during dinitrogen fixation.

2. Effects of ambient acidity and temperature. *Neth. J. Agric. Science*, v. 30: 85-97, 1982.

BREMNER, J. M. Inorganic forms of nitrogen. *IV*: BLACK, C. A. (Ed.) *Methods of Soil Analysis*; Part 2, Agronomy 9 : 1179-1237, Madison, WI, USA, 1965.

BREMNER, J. L. & KEENEY, D. R. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chim. Acta*, v. 32:485-549, 1965.

CABALA - RONSAND, P. & WILD, A. Phosphate adsorption and immobilization characteristics of three soils from southern Bahia, Brazil. *Pesq. Agrop. Bras.* v. 17: 1013-1022, 1982.

CLAASEN, N. & JUNGK, A. Kaliumdynamik im Wurzelnahen Boden in Beziehung zur Kaliumaufnahme von Mais Pflazen. *Z. Pflazen. Bodenk.* v. 145:513-525, 1982.

CLARKSON, D. T. Adaptações morfológicas e fisiológicas das plantas a ambientes de baixa fertilidade. XVI Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo, CEPLAC - SBSC Ilhéus, BA, pp. 45-68, 1985.

DREW, M. C. Properties of roots which influence ratios of absorption. *IN*: HARLEY, J. L. & RUSSEL, R. S. (Eds.); The Soil-Root Interface. London, Academic Press, 1979. pp. 21-38.

EMBRAPA - SNLCS. Manual de métodos de análise de solo. EMBRAPA - SNLCS, Rio De Janeiro, RJ, 1979.

FRANCO, A. A. Nutritional restraints for tropical grain legume symbiosis. *IN*: VINCENT, J. M. ; WHITNEY, A. S. & BOSE, J. (Eds.); Exploiting the legume - rhizobium symbiosis in tropical agriculture.. University of Hawaii. Coll. Trop. Misc. Publ. 145, 1977. pp. 237-252.

FOX, R. M. Selection for phosphorus efficiency in corn. Soil Sci. And Plant Analysis, v. 9 n. 1; 13-37, 1978.

GARDNER, W. K. & PARBERY, D. G. Proteoid root morphology and function in *Lupinus albus* L. Plant and Soil v. 60 : 143-147, 1981.

GARDNER, W. K. ; PARBERY, D. G. & BARBER, D. G. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L . II. The effect of varying phosphorus supply and soil type on some characteristics of the soil-root interface. Plant and Soil, v. 68: 33-41, 1982.

GARDNER, W. K. ; BARBER, D. A. & PARBERY, D. G. The acquisition of P by *Lupinus albus* L . III. The probable mechanism by which phosphate movement in the soil - root interface is enhanced. Plant and Soil v. 70, n. 1, 107-124, 1983.

GAHOONIA, T. S. & NIELSEN, N. E. The effect of root-induced pH changes on the depletion of inorganic and organic phosphorus in the rhizosphere. Plant and Soil, v. 143 n. 2:185-191, Kluwer Acad. Publisher, Dordrecht, 1992.

GAHOONIA, T. S. ; CLAASEN, N. and JUNGK, A. Mobilization of phosphate in different ryegrass supplied with ammonium or nitrate. Plant and Soil v. 140 n. 2 , 241-248, 1992.

GRINSTED, M. J. ; HEDLEY, M. J. WHITE, R. E. & NYE, P. H. Plant induced in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. EMERALD) seedlings. I. pH change and the increase in P concentration in the soil solution. New Phytologist, v. 91 , 19 - 29, 1982.

HALLMARK, W. B. & BARBER, S. A. Root growth and morphology, nutrient uptake and nutrient status of early growth of soybeans as affected by soil P and K. Agron. J. , v. 76: 209-212, 1984.

HAYMAN, D. S. & MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. III. Increased uptake of labile P from soil. New Phytol . , v. 71:41-47, 1972.

HOWELER, R. H. & WOODRUFF, C. M. Dissolution and availability to plants of rock phosphates of igneous and sedimentary origins. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 32: 79 -82, 1968.

JAYMAN, T. C. Z. & SUBRAMANIAN, S. Release of bound iron and aluminum from soils by the root exudates of tea (*Camellia sinensis*) plants. J. Sci. Food Agric. v. 26: 1895-1898, 1975.

JUNGK, A. Mineralstoff - und Wassergehalt in Abhängigkeit von der Entwicklung von Pflanzen. Zeitschrift Für Pflanzenernährung und Bodenk. , v. 125: 119-129, 1970.

KHASAWNEH, F. E. & DOLL, E. C. The use of phosphate rock for direct application to soils. Advances in Agronomy, v. 30:159-205, 1978.

LEÓN, L. A. ; FENSTER, W. E. & HAMMOND, L. C. Agronomic potential of eleven phosphate rocks from Brazil, Colombia, Peru and Venezuela. Soil Sci. Soc. Am. J. , v. 50:798-802, 1986.

LOPES, E. S. & LOMBARDI, M. C. L. O. Os microorganismos do solo e o aproveitamento de fósforo pelas plantas. *IN: XVIII Congresso Bras. de Cie. do Solo*, Salvador BA, 1981. SBCS, Campinas, SP, 1981.

MACHADO, R. P. da MATTA. A comparison of productivity and nutrient dynamics between an alley-cropping system and an annual legume-based cropping system in the piedmont region of Georgia, USA. PhD Thesis, University of Georgia, Athens, Georgia, USA, 1993. 121 p.

MARSCHNER, H. Nährstoffdynamik in der Rhizosphäre: Eine Übersicht. *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 98*: 291-309, 1985.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, 1986.

MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. In vivo measurements of root-induced pH changes at soil-root interface: Effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzen Physiol. Bd. , v. 111*: 241-251, 1993.

MARSCHNER, H. ; RÖMHELD, V. & OSSENBER-NEUHAUS, H. Rapid method for measuring changes in pH and reducing process along roots of intact plants. *Z. Pflanzenphysiol. Bd., v. 105 S.* 407-416, 1982.

MULETTE, K. L.; HANNON, N. J. & ELLIOTT, G. L. Insoluble phosphorus usage by Eucalyptus. *Plant and Soil* 41: 199-205, 1974.

MYIASAKA, S. Histórico de estudos de adubação verde, leguminosas viáveis e suas características. *IN: Adubação Verde no Brasil*, Costa, M. B. B. da (Ed.), Fundação Cargill, Campinas, SP, 1984. pp. 64-123.

NYATSANGA, T. & PIERRE, W. E. Effect of nitrogen fixation legumes on soil acidity. *Agron. J. , v. 65*:936-940, 1973.

NYE, P. H. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil*, v. 61:7-26, THE HAGUE, 1981.

LONERAGAN, J. F. The interface in relation to root function and growth. *IN*: ARLEY, J. L. & RUSSEL, R. S. (Eds.), *The Soil-Root Interface*, London, Academic Press, 1979. pp. 351-367.

RAIJ, B. van; FEITOSA, C. T. & GROHMANN, F. Eficiência agronômica de fosfatos naturais brasileiros. *IN*: Mesa redonda sobre adubação fosfatada no Brasil, XVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Salvador, BA, SBCS, 1981. pp 46-67.

RILEY, D. & BARBER, S. A. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes at the root surface. *Soil Sci. Am. Proc.*, v.: 301-306, 1971.

RUSSEL, R. S. *Plant root systems, their function and interaction with the soil*. London, McGraw-Hill, 1977. 297 p.

SAUNDERS, F. E. & TINKER, P. B. Mechanics of absorption of phosphate from soil by endogene mycorrhizae. *Nature*, London, v. 233: 278-279, 1971.

SILBERBUSCH, M. & BARBER, S. A. Sensitivity of stimulated phosphorus uptake to a mechanistic mathematical model. *Plant and Soil*, v. 74:93-100, 1983.

SMILEY, R. W. Rhizosphere pH as influenced by plants, soils and nitrogen. *Soil Sci. Am. Proc.* V. 38, 795-799, 1974.

SMYTH, T. J. & SANCHEZ, P. A. Phosphate rock dissolution and availability in Cerrado soils as affected by phosphate sorption capacity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v. 46: 39-345, 1982.

SOON, Y. K. & MILLER, M. D. Changes in the rhizosphere due to NH_4^+ and NO_3^-

fertilization and phosphorus uptake by corn (*Zea mays* L.) . Soil Sci. Soc. Proc. v. 41, n. 1, 77-80, 1977.

SHENK, M. K. & BARBER, S. A. Phosphate uptake by corn as affected by soil characteristics and root morphology. Soil Sci. Soc. Am. J., 43: 880-883, 1979.

STEFFENS, D. Wurzelstudien und Phosphat-Aufnahme von Weidelgrass und Rotklee unter Feldbedingungen. Z. Pflazenernährung Bd. v. 147:85-97, 1984.

SWART, P. M. & DIEST, A. van . The rock-phosphate solubilizing of *Pueraria javanica* as affected by soil pH, superphosphate priming effect and symbiotic N_2 fixation. Plant and Soil v. 100, 135-147, 1987.

5 . CAPITULO IV

Anexo 2

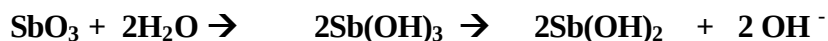
Eletrodo de Antimônio: construção e utilização no monitoramento do pH da rizosfera de plantas *in vivo*.

5.1 INTRODUÇÃO

Para a medida do pH da rizosfera *in vivo*, os eletrodos de vidro não são adequados, pois além de muito frágeis, necessitam de uma mistura água solo, seja em pasta ou em solução. Desta forma, no caso de medidas de pH de rizosfera *in vivo*, é mais adequada a utilização do eletrodo de antimônio (SCHALLER e FISCHER, 1981; SCHALLER e FISCHER, 1985).

O princípio de utilização do eletrodo de antimônio (também chamado de eletrodo de antimônio - óxido de antimônio) para determinações potenciométricas do pH, baseia-se na reação dos íons antimônio com a água, formando hidróxidos pouco solúveis, segundo STOCK *et al.* (1958) e KORTÜM (1966), citado por SCHALLER e FISCHER (1981).

A reação de medida da diferença de potencial, de acordo com KORTÜM (1966) citado por SCHALLER e FISCHER (1981), é a seguinte:



Tomando-se o potencial do eletrodo de antimônio a partir do grau de dissociação do Sb(OH)_3 , podemos obter uma relação linear, entre o potencial (E_{Sb}) e o pH, a partir da equação de Nerst:

$$E_{Sb} = E_{0, Sb} - \frac{RT}{0,4343 \cdot F} \cdot pH$$

Onde:

E_{Sb} = Potencial do Sb (Antimônio)

$E_{0, Sb}$ = Potencial padrão do eletrodo de Sb

R = Constante universal dos gases perfeitos

T = Temperatura (° K)

F = Constante de Faraday

pH = potencial hidrogeniônico

Junto ao $Sb_2 O_3$ surge então, um outro potencial de contato, ou seja Sb-óxido, que resulta da pressão parcial de O_2 . Desta forma, $E_{0, Sb}$ não é constante e E_{Sb} , é dependente do potencial redox.

Os eletrodos óxidos metálicos, podem ser assim utilizados na medida de pH, quando superfícies pequenas precisam ser medidas, são especialmente recomendados para micromedidas (SCHALLER e FISCHER, 1981) e adequados à medida do pH em microsítios da rizosfera de plantas *in vivo*, por dispensarem a presença de uma mistura solução aquosa ou mesmo pasta.

O objetivo do presente trabalho, foi o de construir, calibrar e utilizar um eletrodo de antimônio para a medida do pH em microsítios da rizosfera de espécies de leguminosas tropicais, usadas como adubos verdes.

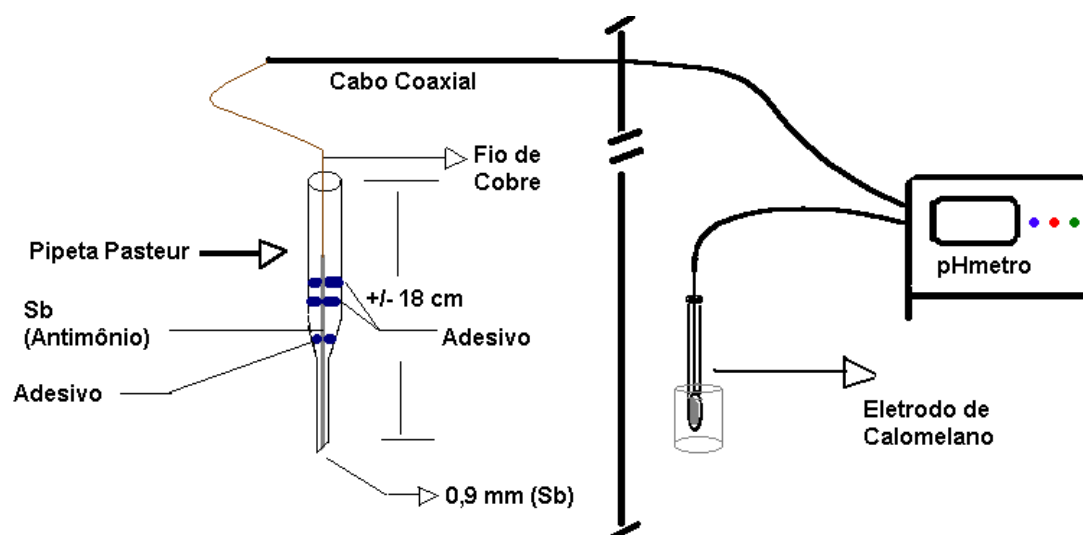
Além de aplicações à agricultura, estudo de solos e nutrição mineral de plantas, o eletrodo de antimônio também pode ter aplicações médicas, odontológicas, veterinárias,

botânicas e ainda industriais (tecnologia de açúcar, águas naturais, indicadores, corantes, látex, óleo, sabão, celulose e de cortume), como relatado por STOCK *et al.* 1958 ; KURELLA e POPOV (1961) e VOROVIEV *et al.* (1961).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a construção do microeletrodo, utilizou-se a metodologia proposta por SCHALLER e FISCHER (1981) e por HÄUSSLING *et al* (1985), com modificações (veja figura abaixo). Os procedimentos são descritos a seguir:

Fundiu-se o metal antimônio (Sb) numa mufla a uma temperatura de 680 a 700 ° C, (a temperatura de fusão do Sb está em torno de 630 ° C), quando a mufla atingia cerca de 700 ° C, era rapidamente aberta e com o auxílio de uma seringa colada a um tubo capilar



ELETRODO DE Sb (ANTIMÔNIO): ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO E MODO DE OPERAÇÃO.
OBSERVAR QUE O DESENHO DO ELETRODO DE Sb APRESENTA UMA ESCALA E O
DESENHO DO pHMETRO OUTRA ESCALA

termoresistente, aspirou-se o metal fundido, de forma a que ele preenche-se todo o espaço do tubo capilar. Em pouco tempo obtinha-se um bastão de Sb, o qual era introduzido numa pipeta Pasteur e aí fixado com cola neutra. Posteriormente, foi soldado um fio de cobre (Cu) ao bastão de antimônio, sendo o Cu conectado a um cabo coaxial, compatível com o potenciômetro. A ponta do bastão de antimônio foi lixada em bisel, permitindo micromedidas, ou seja, diâmetros menores do que 1,0 mm.

O eletrodo de antimônio funciona como indicador, necessitando de um eletrodo de referência, no caso o eletrodo de calomelano (SCHALLER e FISCHER, 1981).

Para a medida do pH na rizosfera das plantas, foi usado o sistema de cultivo em minirrizotrons e a técnica qualitativa, usando filmes de agar-agar, com indicador de pH (púrpura de bromocresol), conforme descrito no capítulo I. As medidas foram realizadas à temperatura ambiental, em torno de 25 ° C.

A técnica qualitativa permite fazer um acompanhamento dos dados medidos com o eletrodo de antimônio, embora atuando em faixas de pH de 0,5 unidades aproximadamente.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para calibrar o eletrodo de antimônio, foram utilizados dez padrões de pH, elaborados conforme o HANDBOOK OF CHEMISTRY (1984), cujos resultados são apresentados na tabela 4.1.

TABELA 17. Medidas de pH de soluções especiais com o uso de eletrodo padrão (vidro e calomelano) comparadas com o eletrodo de antimônio (Sb) e calomelano.

ELETRODO DE VIDRO	ELETRODO DE ANTIMÔNIO (Sb)	
pH	mV	pH *
3,73	- 218	3,70
4,00	- 235	4,01
4,50	- 261	4,49
5,00	- 290	5,02
5,50	- 317	5,51
6,00	- 343	5,99
6,45	- 371	6,50
7,00	- 400	7,03
7,51	- 426	7,51
7,83	- 441	7,78

* Calculado com o uso da equação obtida a partir da curva pH versus mV :

$$E_{sb} = - 54,65 \text{ pH} - 15,83$$

onde: b = - 15,83

$$a = - 54,65$$

$$r = 0,9997979$$

Como pode-se notar, os desvios obtidos com as medidas do eletrodo de antimônio foram praticamente desprezíveis.

Segundo LINNET (1970) ; SCHALLER e FISCHER (1981) e SCHALLER (1987)

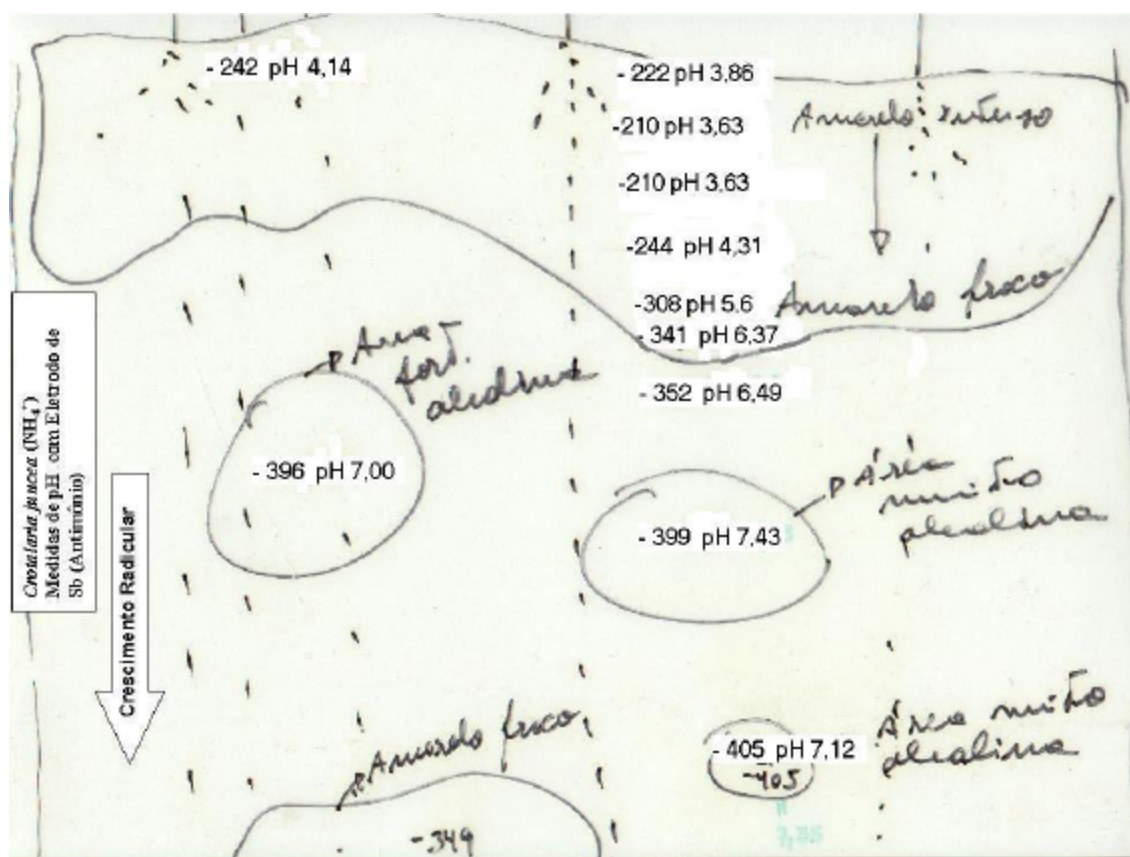
algumas precauções são necessárias, quanto ao funcionamento do eletrodo de antimônio

- a) O potencial varia conforme a saturação de O₂, havendo interferência quando a mesma atinge 50 %;
- b) Respostas lineares somente são obtidas abaixo de pH = 10 e 11 e acima de pH 2 a 4 ;
- c) Substâncias que formam complexos com o antimônio, como tartaratos, oxalatos e íons cúpricos, não devem estar presentes nos tampões, nem nas soluções problema, pois causam interferências nas medidas.
- d) A curva de pH versus mV, deve ser freqüentemente revisada, para garantir uma maior precisão.

Com a utilização do eletrodo de antimônio, realizou-se uma série de medidas de pH na rizosfera de algumas espécies de leguminosas *in vivo*, usando a técnica descrita por MARSCHNER *et al.* (1982); MARSCHNER e RÖMHELD, (1983) ; HÄUSSLING *et al.* (1985) e também no capítulo I, com algumas adaptações. Desta forma, as medidas de pH com o eletrodo de Sb puderam ser acompanhadas através da técnica qualitativa, usando filmes de agar - agar e indicador de pH. A figura abaixo, apresenta os resultados de medidas em rizosfera de *Crotalaria juncea*, tendo como fonte de nitrogênio o NH₄⁺ e uma dose de 66 mg de N. kg⁻¹ de solo.

FIGURA 4.1 Utilização do eletrodo de antimônio para medida *in vivo* do pH da rizosfera de *Crotalaria juncea* tratada com 66 mg de N. kg⁻¹ de solo na forma de (NH₄⁺) SO₄ comparando-se com as medidas obtidas através de métodos qualitativos utilizando-se agar - agar e o indicador de pH púrpura de bromocresol.

MEDIDA DE pH	INDICADOR (COR)
-222 mV (pH = 3,86)	Amarelo forte
-210 mV (pH = 3,63)	Amarelo
-308 mV (pH = 5,60)	Amarelo fraco
-352 mV (pH = 6,49)	Violeta pálido
-399 mV (pH = 7,43)	Violeta forte



Os resultados indicam ter havido uma boa relação entre as medidas obtidas com o eletrodo de antimônio e àquelas fornecidas pelo indicador de pH, púrpura de bromocresol.

Embora tenham havido críticas quanto a utilização do eletrodo de antimônio na medida do pH em solos e na rizosfera (CONKLING e BLANCHAR, 1988), os resultados aqui apresentados, assim como outros da literatura, demonstram que o eletrodo de antimônio é de fácil construção e operação, apresentando resultados satisfatórios, o que permite a sua recomendação e a sua utilização para medidas de pH, especialmente nas condições em que não seja possível o uso dos eletrodos tradicionais, de vidro e calomelano, com é o caso da rizosfera de plantas in vivo, crescendo em solos, rizotrons ou minirrizotrons.

Os recentes trabalhos de BAGHDADY e SOMMER (1987 ; 1990), também comprovaram a eficácia dos eletrodos de antimônio na medida do pH em rizosfera de plantas.

AGRADECIMENTOS: Ao técnico em eletrônica da EMBRAPA-CNPAB, Sr. Edgar Ferreira de Lima, pelo apoio na montagem e soldagem do eletrodo de antimônio e ao professor do Departamento de Solos da UFRRJ, Dr. Jair da Rocha Leal, pelas frutíferas sugestões e apoio no desenvolvimento do eletrodo de antimônio.

5.4 REFERÊNCIAS

BAGHDADY, N.H. & SOMMER, K. Improved construction of Sb electrodes for measuring pH changes at the soil-root interface (rhizosphere). *Journal of Plant Nutrition*, 10 (9-16): 1231-1238, 1987.

BAGHDADY, N. H. & SOMMER, K. Application of an improved antimony microelectrode for measuring pH-changes at the soil-root interface of maize. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 153 (5): 323-326, 1990.

CONKLING, B. L. & BLANCHARD, R. W. A comparison of pH measurements using Sb electrode and glass electrode. *Agron. J.* 80: 275-278, 1988.

HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, CRC PRESS, 65 th ed. ; WEAST, R. C. (Ed.); Boca Raton, FLA, USA, 1984.

HÄUSSLING, M. ; LEISEN, E. ; MARSCHNER, H & RÖMHELD, V. An improved method for non - destructive measurements of pH at the root-soil interface (rhizosphere). *J. of Plant Physiol* . 117: 371 - 375, 1985.

KURELLA, G. A i POPOV, G. A Opredeleñie Siemiaiv Mikroelectrodon, Tom VI Vish 5. 1961. (em Russo)

LINNET, N. pH measurements in theory and practice. Radiometer A/S, Copenhagen, Denmark, 1970.

MARSCHNER, H. ; RÖMHELD, V. & OSSENBERG-NEUHAUS, H. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Z.Pflanzenphysiol* . Bd . 105: 407-416, 1982.

MARSCHNER, H. & RÖMHELD, V. *In vivo* measurements of root-induced changes at the -root interface : Effect of plant species and N source. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 111: 241-251, 1983.

RÖMHELD, V. pH Veränderungen in der Rizosphäre verschiedener Kulturpflanzenarten in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot. Kali-Brief, Buntehof, 18 (1), 13-30, 1986.

SCHALLER, G. & FISCHER, W. R. Die Verwendung von Antimon-Elektroden zur pH-messung in Böden. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 144 (2): 197-204, 1981.

SCHALLER, G. & FISCHER, W. R. pH-Änderungen in der Rizosphäre von Mais und Erdnusswurzeln. Z. Pflanzenernährung und Bodenkunde 148:306-320, 1985.

SCHALLER, G. pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. Plant and Soil 97 : 439-444, 1987.

STOCK, J. T. ; PURDY, W. C. & GARCIA, M. L. The antimony-antimony-oxide electrode. Chemical Reviews 58: 611-626, 1958.

VOROVIEV, G. A. ; KURELLA, G. A. i POPOV, G. A. Vietiletoshiv pH *Nitella flexillis* pri pokoe i vosishdenii. Biofizika, 583-589, tom VI Vish 5. 1961. (em Russo)

6. CAPÍTULO V

Anexo 2

6. H^+ extrusion and organic-acid synthesis in N_2 -fixing symbioses involving vascular plants.

**By John A. Raven, Avilio Antonio Franco, Eli Lino de Jesus and
Jorge Jacob-Neto, New Phytol 114, 369-389, 1990.**

H⁺ extrusion and organic-acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants

By JOHN A. RAVEN¹, AVILIO ANTONIO FRANCO²,
ELI LINO DE JESUS² AND JORGE JACOB-NETO³

¹ *Department of Biological Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, UK*

² *EMBRAPA, CNPDS, Seropedica, 23851 – Rio de Janeiro, Brazil*

³ *Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Depto de Fitotecnia/1A, Seropedica, 23851 – Rio de Janeiro, Brazil*

(Received 5 June 1989; accepted 16 October 1989)

CONTENTS

Summary	369	5. pH-insensitive nutrient acquisition processes	378
I. Introduction	370	IV. Acid-base balance of the shoot to terrestrial vascular plants living diazotrophically	378
II. The background to symbiotic diazotrophy	371	1. The role of the xylem	378
III. Net H ⁺ efflux from symbiotic diazotrophs as a function of N assimilation and composition of symbionts	372	2. The significance of recycling in the phloem	379
1. The measured H ⁺ /N ratio for symbiotic diazotrophs	372	V. Acid-base balance of the nodules of terrestrial vascular plants living diazotrophically	380
2. Implications of a high H ⁺ /N ratio for plant organate content	374	VI. Conclusions	385
3. Implications of a high H ⁺ /N ratio for rhizosphere pH and the acquisition of Fe, Mo and P	375	Acknowledgements	386
4. Interactions of rhizosphere acidification resulting from a high H ⁺ /N ratio with circulating electric currents carried by H ⁺	377	References	386

SUMMARY

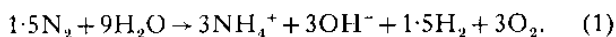
An analysis of published data suggests that the N₂-fixing symbiotic vascular plants extrude more H⁺ per unit N fixed than would be expected from data on the same genotypes growing on NH₄⁺ if the plants had the same chemical composition when grown on the two N sources. The H⁺/N ratio with urea as the N source is similar to that with N₂. The higher H⁺/N ratio and higher organic acid/N ratio with N₂ or urea as N source implies higher whole-plant energy and water costs per unit of biomass and, ultimately, inclusive fitness, produced. The rhizosphere acidification resulting from H⁺ extrusion may serve to change rhizosphere pH to some 'optimal' value, and to increase the availability of such limiting resources as P, Mo and Fe which are especially needed in diazotrophy. Data in the literature are consistent with these possibilities in the few cases examined.

Within the plant, data on xylem and phloem sap composition in conjunction with shoot composition, of diazotrophically-growing legumes suggest that shoot acid-base homeostasis can be maintained via the import of appropriate solutes in the xylem and the export of appropriate solutes in the phloem. Acid-base regulation of the nodules in the absence of any H⁺ exchange with their environment can also probably be explained in terms of the solutes supplied in the phloem and exported in the xylem. This conclusion is based on data in the literature on the composition of stem phloem sap and of xylem sap exuding from detached nodules of diazotrophic vascular plants. These considerations do not exclude the possibility of net H⁺ efflux from nodules fixing N₂ in contact with an aqueous medium. The limited data available are consistent with extrusion of some of the H⁺ generated in nodules as an alternative to their neutralization by metabolism of organic anions entering in the phloem. Such H⁺ extrusion by nodules could aid in their acquisition of Fe from the medium, albeit not always at a phase in the life of the nodule when there is a net requirement for Fe.

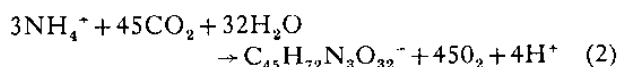
Key words: Nitrogen fixation, organic acids, phloem, protons, roots, xylem.

1. INTRODUCTION

At the pH values (near neutrality) at which nitrogenase usually functions, the conversion of di-nitrogen to ammonium generates alkali (see Kennedy, 1986, 1988). In a phototrophic plant the *ultimate* reductant for nitrogenase is H_2O , with O_2 as the oxidized residual moiety, so that an equation combining a long-term view of redundant supply (ignoring ATP!) with a short-term view of the acid-base relations of N_2 fixation is [equation (1)]:



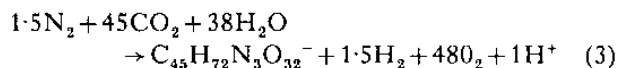
Use of this NH_4^+ to synthesize cell material with the neutral C-source CO_2 , and SO_4^{2-} and $H_2PO_4^-$ respectively as S and P sources, invariably generates a large excess of H^+ . The excess H^+ is the H^+ generated by metabolism in addition to that required to maintain the pH of plant compartments at their normal values. The production of excess H^+ results from the conversion of inorganic matter bearing a net positive charge into organic matter bearing a net negative charge at the usual pH of the plant compartments in which it occurs. The net positive charge on the inorganic substrates is a function of the greater quantity of NH_4^+ than of SO_4^{2-} plus $H_2PO_4^-$ required to produce plant organic matter. The net negative charge on the organic matter results from the excess of negative over positive charge on the sum of cationic, amphoteric, anionic and neutral organic compounds in the plant: hereinafter the components bearing the net negative charge are termed organate, with one mol of organate equalling one mol net negative charge on organic compounds. An equation which describes the synthesis of higher plant organic material (ignoring S and P for the moment) with a C:N ratio of 15 is (see Raven, 1988a) [equation (2)]:



i.e. an excess of $1.33H^+$ for each N assimilated. Consideration of S and P (assuming a N:S:P ratio of 120:7:2) reduces the excess to about $1.22H^+$ per N. The organate whose generation results in the excess H^+ at the functional pH values in the plant comprises proteins and polyuronates, but predominantly low M_r solutes such as organic- and amino-acid anions (see Raven & De Michelis, 1979, 1980). Maintenance of intracellular acid-base balance requires that the excess H^+ shall be removed from the cells and, ultimately, the plant, by H^+ efflux (Raven, 1985a, b, 1986).

Genotypic and phenotypic variations in H^+/N on the basis of NH_4^+ use [equation (2)] are mainly a function of changes in the ratio of soluble organic anions to N with changes in the ratio of polyuronates to N as a smaller and (at least in terms of the ratio of polyuronates to dry weight) less genotypically variable (Wacquant, 1974; Jarvis, Forsyth & Duncan, 1988) component.

Combining equations (1) and (2), expressing H^+ and OH^- both in terms of H^+ and eliminating $3H_2O$ from both sides results in equation (3) [equation (4) of Raven, 1988a].



This shows that, for a plant with the composition shown, and ignoring S and P, $0.33H^+$ are produced per N assimilated. Taking S and P into account, we find $0.22H^+$ per N. Thus, making a plant with the composition shown, NH_4^+ use [modified equation (2)] yields $1.22H^+$ per N, while N_2 use [modified equation (3)] yields $0.22H^+$ per N. Thus, for any given plant composition, N_2 assimilation yields one fewer H^+ per N assimilated than occurs with NH_4^+ as N source, just as NO_3^- assimilation yields two fewer H^+ per N assimilated than does NH_4^+ (and hence involves net consumption of $0.78H^+$ per N).

The published data show that the notion of a constant plant composition regardless of N-source is, even for a single genotype, in error (see Haynes, 1986; Kennedy, 1986, 1988; Raven, 1985a, b, 1986, 1987a, 1988a; Raven & Smith, 1976). The plant grown on NH_4^+ has the lowest value of organate per unit plant N, with a higher value for N_2 -grown plants and an even higher value for NO_3^- -grown plants. Equality of organate/N for all N sources would give H^+/N value for NH_4^+ which is one unit higher, and for NO_3^- one unit lower, than those for N_2 [equations (2) and (3)]. The higher organate/N with N_2 or NO_3^- than with NH_4^+ means that the H^+ efflux per N assimilated from N_2 is less than one mol H^+ /mol N below the value with NH_4^+ , while the value with NO_3^- is less than two units lower than that with NH_4^+ so that, in extreme cases, the predicted H^+ influx is converted into an H^+ efflux.

A number of possibilities as to the significance of the variations in plant composition, and H^+ exchange with the medium, have been put forward. Some of these relate to the internal composition of the plant. Two such are the concept of the 'normal' carboxylate content for a genotype (Dijkshoorn, 1969) and the role of synthesis of organic acids and accumulation of their salts in determining the efficiency of use of such potentially limiting resources as water and photons in NO_3^- -grown plants (Raven, 1985b, 1987a). Another category of possibilities concentrates on the role that external pH changes have on the availability of such potentially limiting resources as P, Fe, Mo and Mn, and to the toxicity of such elements as Al and Mn (Franco & Munns, 1981; Munns & Franco, 1982; Marschner, 1986; Jacob-Neto & Franco, 1989; Jacob-Neto, Thomas & Franco, 1988; Raven, 1987a).

This paper sets out to analyse data on the net organic negative charge per unit N, and the H^+ efflux per unit N assimilated, in relation to symbiotic N_2 fixation. We particularly address the involvement of net H^+ efflux in the acquisition of the P, Fe and Mo

which are especially required in N₂-fixing plants, and the ways in which the nodules interact with the rest of the plant, and the culture medium, in the metabolism of organic acids and in metabolic and transport fluxes of H⁺.

II. THE BACKGROUND TO SYMBIOTIC DIAZOTROPHY

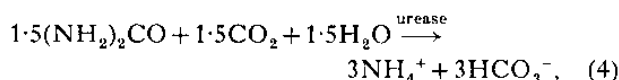
Biological nitrogen fixation is restricted to prokaryotic organisms, either free-living or in symbiotic associations. It is not within the scope of this paper to discuss the origin of diazotrophy in prokaryotes (Postgate & Eddy, 1988; Raven & Sprent, 1989; Sprent & Raven, 1985), or the details of acid-based regulation in free-living or symbiotic prokaryotic diazotrophs (Raven, 1980; Raven & Smith, 1982; Section V). We only wish to point out that diazotrophic growth of prokaryotes with a neutral C source involves excess H⁺ production (see Raven, 1980; Raven & Smith, 1982), and that acid-base regulation of diazotrophic symbioses which grow with a neutral C source involves H⁺ extrusion to the medium via host (exhabitant) cells.

The exhabitant vascular plants which are the other part of the symbioses under consideration have, like the bryophytes, a generally higher organic anion/N ratio on a given N source than do algae (see Raven, Smith & Smith, 1980, and Introduction). When these organisms evolved more than 400 million years ago in the Silurian, their ancestors had already been phototrophic eukaryotes for at least the previous 400 million years. The specific homoiohydric land plant characteristics acquired in the Silurian and Devonian were added to a uronate-rich cell wall and the potential to make a vacuole which was large in relation to the cytoplasm and which could, with appropriate porters in the tonoplast, accumulate large quantities of the salts of organic acids (see Raven, 1987*a, b*). The nitrogen sources for all vascular plants for at least the first 150 million years of their existence was combined N. The basis for this assertion is discussed by Raven & Sprent (1989) and Sprent & Raven (1985); it consists of the time of origin, as indicated by the fossil record, of the organisms which today have symbiotic relationships with prokaryotes which can supply all of the N required by the symbioses. The assertion can be supported by a consideration of associative N₂ fixation (which cannot in general supply all of the N needed by the grass: Boddey, 1987), and the earliest records of grasses in the fossil record.

The combined N available to land plants in the Palaeozoic would depend on the extent to which the reactions of the nitrogen cycle occurred to supply combined N to plants via the atmosphere or the soil (Klein *et al.* 1988; Raven, 1988*a*; Sprent, 1987). The components of the terrestrial nitrogen cycle (Sprent, 1987) were all present in the Palaeozoic at the time of evolution of the vascular plants (Raven &

Sprent, 1989). Accordingly, the terrestrial plants of the time before the occurrence of diazotrophic symbioses involving vascular plants would have had access, in amounts varying with their environment, to NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, amino acids, urea, purines, ureides and pyrimidines as their dissolved, low *M_r*, combined N supplies. Clearly, the organisms involved in the N cycle were different, and there would not seem to be any obvious Palaeozoic analogue of the localized input of mammalian herbivore urine with well over half of its N in urea (Thomas *et al.* 1988).

The role of NH₄⁺ and NO₃⁻ as N sources in terrestrial plants needs no reiteration; they respectively define the extremes of acidity and alkalinity production during growth of plants with CO₂ as C source and SO₄²⁻ as S source. NH₄⁺ use yields at least 1.2 mol H⁺ per mol N assimilated, while NO₃⁻ use yields up to 0.8 mol OH⁻ per mol N assimilated. The occurrence of an 'N₂-like' H⁺/N ratio of 0.2, assuming a composition of the plant identical to that found to yield 1.2 H⁺ per N from NH₄⁺ and 0.8 OH⁻ per N from NO₃⁻ could be achieved from a 1:1 mixture of NH₄⁺ and NO₃⁻ as N source, or urea as the N source taken up and metabolized, or a neutral amino-acid as the N source taken up and metabolized or a mixture of all three. How likely are these four possibilities, not to mention more complex possibilities of combining basic amino acids with acidic amino acids and ureides? Mixtures of NH₄⁺ and NO₃⁻ are probably commoner than either of them alone under natural conditions, although assimilation in a 1:1 ratio is less likely. The 'direct' use of urea involves uptake of the urea molecule, with intracellular hydrolysis [equation (4)].



3NH₄⁺ are then assimilated according to equation (2), yielding 4H⁺. 3H⁺ are neutralized by the 3HCO₃⁻ generated by urease according to equation (4) leaving 1H⁺ per 3N assimilated or H⁺/N = 0.33; corrected for S and P metabolism this becomes 0.22, the same as the value for diazotrophy to yield a plant with a C:N ratio of 15.

The substantial urease activity of unsterilized soil (Mobley & Hausinger, 1989) means that the likelihood of a terrestrial plant gaining most of its N as urea, even when urea is the N form supplied in fertilizer, is small. However, it is clear that some plants can take up unchanged urea at a rate which is commensurate with that needed to supply N for growth. This has been clearly shown for a number of algae (see Wilson & Walker, 1988*a, b*, Wilson, O'Donohue & Walker, 1988, and Price & Hargreaves, 1988, for recent work and references). In terrestrial vascular plants there is little consensus as to how plants treat supplied urea. In some experiments very little use of urea was detected (e.g. the work of Criddle, Ward & Huffaker, 1988, on *Triticum*

seedlings). In other work substantial use of urea was observed, although distinction between external hydrolysis followed by uptake of NH_4^+ , and uptake of urea *per se*, was not possible (e.g. the work of Vigue *et al.* 1977; cf. critique of earlier work by Van Beusichem & Neeteson, 1982). In some work the application of ionic balance and acid-base balance concepts showed that essentially all of the N supplied as urea in a culture solution was taken up as NH_4^+ (Van Beusichem & Van Loon, 1978). In these experiments *Zea* was supplied with NH_4^+ , NO_3^- or urea without renewing the culture solutions. Later work (Van Beusichem & Neeteson, 1982) on *Zea* and *Beta* involved renewal of the growth media containing NH_4^+ or urea; the ionic balance and pH-balance approach showed that urea was taken up as such rather than as NH_4^+ after hydrolysis. Such considerations can also be applied to the work of Kirkby & Mengel (1967, 1970) to suggest predominant uptake of unchanged urea. While the work of Van Beusichem & Neeteson (1982) showed negligible urea in the bleeding xylem sap of *Zea* and *Beta*, Hentschel (1970) found a concentration of urea in *Phaseolus* in excess of that in the medium consistent with the active uptake of unchanged urea.

These data show that at least some higher plants can take up urea as such. The extent to which this possibility is exercised under field conditions is not clear in view of the high urease activity in most soils.

Fewer data are available on neutral amino-acid uptake. Schobert & Komor (1987) characterized the uptake of a number of amino acids by axenic seedlings of *Ricinus communis* L. and found saturation kinetics with relatively high values for affinity and substrate-saturated capacity. Schobert, Kockenberger & Komor (1988) extended this work to *Ricinus communis* seedlings supplied with [^{14}C]proline at 'natural' concentration in natural and in sterilized soil, and showed that the plants were able to take up proline in competition with soil microflora. A similar sort of competitive capacity has been suggested for a marine macroscopic animal relative to marine microflora with respect to amino-acid uptake (Manahan *et al.*, 1982).

Demonstration of the qualitative ability to take up the intact urea or amino-acid molecules, even under field conditions, is not a good indication of the quantitative importance of these N sources under natural conditions. The significance of mycorrhizas in the uptake of organic N sources, and in the mobilization of N sources not readily available to non-mycorrhizal plants under field conditions, is not clear (Harley & Smith, 1983; Read, 1983; Abuzinadah & Read, 1986*a, b*; Abuzinadah, Finlay & Read, 1986), although it is likely that at least some kinds of mycorrhizas do enhance both of these capacities. The role of mycorrhizas in acid-base regulation in plants on various N sources is also

poorly understood (Raven, Smith & Smith, 1978; Bledsoe & Rygielwicz, 1986).

In summary, there is a strong likelihood that terrestrial vascular plants, in the period before any of them became symbiotic diazotrophs, were exposed to variety of N sources which tended, for at least some of them, to give H^+/N ratios for growth between the +1.22 expected for NH_4^+ -grown and -0.78 for NO_3^- in a plant with the composition discussed in the Introduction. The H^+/N ratio expected for symbiotic diazotrophy (+0.22) with plants of this composition would have thus been presaged by plants with several mixtures of NH_4^+ , NO_3^- and organic N.

III. NET H^+ EFFLUX FROM SYMBIOTIC DIAZOTROPHS AS A FUNCTION OF N ASSIMILATION AND NATURE OF SYMBIONTS

1. The measured H^+/N ratio for symbiotic diazotrophs

Table 1 shows the H^+ efflux per N assimilated by diazotrophic symbiotic vascular plants using N_2 as their sole N source. H^+/N ratios for the same genotypes when growing asymbiotically on NH_4^+ , urea or NO_3^- , and for some non-diazotrophs on NH_4^+ , urea or NO_3^- are also shown for comparison. The quoted values are based on two sorts of observation. One is the measured H^+ efflux to the rooting medium per N assimilated. The other involves estimates of organate as the excess of inorganic cations over inorganic anions, or as the quantity of organic anions, in the plant per N assimilated, bearing in mind that organate/N equals $(\text{H}^+/\text{N}) + 1$ for NH_4^+ , H^+/N for N_2 and $(\text{H}^+/\text{N}) - 1$ for NO_3^- . Comparison of these values with the idealized values of equation (3) for diazotrophy (and corresponding equations for other N sources) requires correction of the values in equation (3), etc. for SO_4^{2-} and H_2PO_4^- effects. Assuming a constant organic N: organic S value, addition of 0.11 H^+/N to all of the values in Table 1 (and, indeed, Table 2) would yield the H^+/N values predicted by equation (3) and analogous equations for urea, NH_4^+ [equation (2)] and NO_3^- .

The H^+/N values for growth with NH_4^+ are (when corrected for SO_4^{2-} assimilation) not far from the 'idealized' +1.33 H^+/N suggested by equation (2). The H^+/N values for NO_3^- growth are, when similarly corrected for SO_4^{2-} assimilation, more widely ranged around the 'idealized' value of -0.67 H^+/N deduced from a variant of equation (2) for NO_3^- . The more negative of the values (-0.76, -0.86), like the lower of the positive values for NH_4^+ , presumably reflect a plant composition with less than one negative charge on organic material per three N. The less negative H^+/N for NO_3^- -grown plants values reflect the operation of a mechanism of

Table 1. Mol H⁺ excreted per mol N assimilated from NH₄⁺, urea, N₂ or NO₃⁻

Plant	Mol H ⁺ per mol N assimilated from—				References
	NH ₄ ⁺	Urea	N ₂	NO ₃ ⁻	
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	n.d.	+0.88*	+0.93*	+0.30 to 0.16* (10 mol m ⁻³) (20 mol m ⁻³)	Israel & Jackson (1982)
	n.d.	+0.95*	+1.02*	+0.60 to -0.10† (10 mol m ⁻³) (20 mol m ⁻³)	
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	+1.08*	n.d.	+1.18*	-0.14*	Allen, Raven & Sprent (1988)
	+1.22†	n.d.	+1.14†	-0.23	
<i>Pisum sativum</i> L.	n.d.	n.d.	+0.24*	-0.60*	Van Beusichem (1981)
	n.d.	n.d.	+0.29†	-0.52†	
<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertner	+1.17*	n.d.	+0.56†	-0.38*	Troelstra <i>et al.</i> (1985)
	+1.11†	n.d.	+0.44†	-0.38†	
<i>Hippophae rhamnoides</i> L.	+1.08*	n.d.	+1.18*	-0.86*	Troelstra <i>et al.</i> (1987)
	+1.22†	n.d.	+1.14†	-0.76†	
<i>Beta vulgaris</i> L.	+1.23*	+0.42*	n.a.	n.d.	Van Beusichem & Neeteson (1982)
	+1.18†	+0.57†	n.a.	n.d.	
<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller	+1.29*	+0.36*	n.a.	-0.08*	Kirkby & Mengel (1967)
	+1.25†	+0.43†	n.a.	-0.06†	
<i>Zea mays</i> L.	+1.10*	+0.26*	n.a.	n.d.	Van Beusichem & Neeteson (1982)
	+1.11†	+0.36†	n.a.	n.d.	
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	+1.62†	n.d.	+1.55†	n.d.	Jesus & Franco (unpublished)

* H⁺/N measured by titration of medium, plus plant organic N.

† H⁺/N measured as plant organate⁻ or as plant inorganic cations minus inorganic anions plus plant organic C.
n.d., not determined; n.a., not applicable (i.e. organism which is not known to nodulate).

OH⁻ disposal related to organic acid synthesis for NO₃⁻-assimilating plants.

From the data in Table 1, we can conclude that the organate/N values for N₂-grown plants are significantly more than one unit higher than for corresponding NH₄⁺-grown plants, illustrating the point made in the Introduction about additional organic acid synthesis in diazotrophy compared with NH₄⁺ assimilation. Interestingly, the organate/N values for urea-grown plants are also higher than for NH₄⁺-grown plants and, where direct comparison is possible, similar to, but rather lower than, the organate/N for diazotrophy. This difference between the effective H⁺/N values for urea and NH₄⁺ was one of the chief lines of evidence for uptake of urea rather than of NH₄⁺ after external hydrolysis (see Section II). It would, then, seem that the effectively high (more negative) H⁺/N for diazotrophy is mimicked by another neutral (at entry) N source, urea. This point will be taken up later in discussing the mechanism of acid-base regulation of diazotrophic symbioses and of individual symbionts.

Table 2 shows the H⁺ efflux per N assimilated from N₂ for a wider range of diazotrophic symbioses involving vascular plants than appeared in Table 1. The quoted values are obtained from the same two sorts of data as were used in compiling Table 1.

The values in Table 2 (other than for *Azolla*; see below) range from 0.17 to 1.58. The value of 0.17 (for *Pisum sativum* L.; van Beusichem, 1981) is rather

lower than the 'idealized' value of 0.22 (corrected for S and P) derived from equation (3), but we would hesitate to see any significance in this. More significant are the generally very much larger values of the H⁺/N values, reaching values as high as 1.58 (Breeze & Hopper, 1987, for *Trifolium repens* L. grown at low inorganic phosphate concentrations).

The implication of these values is that almost invariably the H⁺/N ratio is higher than the idealized +0.22H⁺/N from equation (3) corrected for S and P. This means two things. One is that, as indicated by the methods of estimating H⁺/N from plant content of organate relative to organic N, or of inorganic cation minus inorganic anion, relative to organic N, the organate content per N is larger in most N-fixing symbiotic higher plants than in the idealized plant of equation (3) which has no organate in excess of the minimum of uronates and soluble organic acid anions permissible for higher plants. This has implications for the water and energy (photon) use efficiency of the plant and the composition of the solutes contributing to the intracellular osmolarity (Raven, 1985*b*; 1987*a*). In brief, the larger the H⁺/N value, the greater the cost in terms of water transpired and photons used per N assimilated during growth, i.e. the water and photon use efficiency is reduced. We must emphasize that these effects on water and photon use efficiency are theoretical and have not, apparently, been validated experimentally.

Table 2. Mol H^+ excreted per mol N assimilated from N_2 in diazotrophic symbioses

Exhibitant	Inhabitant	Mol H^+ per mol N deduced from		Reference
		Titration of external medium	Plant content of organate ⁻ or inorganic cation minus inorganic anion	
<i>Glycine max</i>	<i>Rhizobium</i> *	n.d.	0.36–0.52	Nyatsanga & Pierre (1973)
<i>Glycine max</i>	<i>Rhizobium</i>	n.d.	0.32	Israel & Jackson (1978)
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Rhizobium</i>	n.d.	0.48–0.51	Nyatsanga & Pierre (1973)
<i>Medicago sativa</i>	<i>Rhizobium</i>	n.d.	0.5 (zero P) 1.0 (super) 1.2–1.4 (rock P)	Aguilar & Van Diest (1981)
<i>Medicago sativa</i>	<i>Rhizobium</i>	0.24	n.d.	Jarvis & Hatch (1985)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i>	1.18	1.14	Allen, Raven & Sprent (1988)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium</i>	0.17–0.24	0.20–0.29	Van Beusichem (1981)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium</i>	n.d.	0.28 ($pH_0 = 4.0$)	Van Beusichem (1982)
		n.d.	0.21 ($pH_0 = 5.5$)	
		n.d.	0.67 ($pH_0 = 7.0$)	
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium</i>	0.24	0.29	Van Beusichem (1983)
<i>Trifolium pratense</i> L.	<i>Rhizobium</i>	0.24	n.d.	Jarvis & Hatch (1985)
<i>Trifolium repens</i> L.	<i>Rhizobium</i>	0.24	n.d.	Jarvis & Hatch (1985)
<i>Trifolium repens</i>	<i>Rhizobium</i>	1.58	1.51 ($P_i = 0.32 \text{ mmol m}^{-3}$)	Breeze & Hopper (1987)
		1.44	1.39 ($P_i = 0.64 \text{ mmol m}^{-3}$)	
		1.32	1.16 ($P_i = 1.6 \text{ mmol m}^{-3}$)	
		1.38	1.26 ($P_i = 8.0 \text{ mmol m}^{-3}$)	
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Frankia</i>	0.46	0.53	Troelstra <i>et al.</i> (1985)
<i>Hippophae rhamnoides</i>	<i>Frankia</i>	0.56	0.46	Troelstra <i>et al.</i> (1987)
<i>Azolla caroliniana</i> Willd.	<i>Anabaena</i>	0.049–0.059	0.058–0.089	Peters <i>et al.</i> (1980)
				Raven, Rothmund & Wollenweber (unpublished)
<i>Azolla microphylla</i> Kaulfur	<i>Anabaena</i>	0.115	0.128	Raven, Rothmund & Wollenweber (unpublished)
<i>Azolla pinnata</i> R. Brown	<i>Anabaena</i>	0.079	0.127	Raven, Rothmund & Wollenweber (unpublished)

* *Rhizobium* includes *Bradyrhizobium*; n.d., not determined.

2. Implications of a high H^+/N ratio for plant organate content

One inescapable result of the higher ratios is the occurrence of higher concentrations of the anions of low M_r carboxylic acids. The highest value of organate per unit plant organic N in Table 3 is 1.47. Assuming 30 mg N per g dry weight of plant, 5 g H_2O per g dry weight of plant, two $-COO^-$ per molecule of organic acid anion, and a uronate/N ratio of 0.2 (a high value), we arrive at a low M_r organic acid anion content of 280 mol (m^3 water) $^{-1}$. If all of this is soluble and is associated with singly charged cations, the organic acid salt concentration in solution is 840 mol m^{-3} or, with an activity coefficient of 0.8 for the inorganic cations and the organic anion, an osmolarity of 672 osmol m^{-3} . This is rather high for a glycophyte, especially since contributions from other inorganic cations, inorganic anions and unionized solutes have not been taken into account.

The omission of Na^+ and Cl^- from the ionic analysis on which the organic acid anion content was estimated (table 5 of Breeze & Hopper, 1987) is not a source of error since no Na^+ or Cl^- was added as a macro-nutrient in the growth medium. Furthermore, the H^+/N ratio (deduced from tables 4 and 5 of Breeze & Hopper, 1987) confirms to within 11% the organate/N ratios (Table 2 of this paper). The estimated osmolarity due to the organic acid anion salts could be reduced if three rather than two $-COO^-$ per molecule of organic anion is assumed for some of the molecules, if some of the cations are doubly charged and, especially, if some of the organic anion salts are present as insoluble calcium oxalate (see Raven, 1985b, 1987a; Raven and Smith, 1976). The alternative of deposition of insoluble $CaCO_3$ (see Raven, 1985b, 1987a; Raven & Smith, 1976) does not seem to be an option in *Pisum sativum*: $CaCO_3$ deposits have apparently not been reported for this organism (Kinzel, 1989).

Table 3. Organate:organic N ratio in bleeding xylem sap and in shoots of N₂-fixing legumes

Exhibitant	Inhabitant	Organate/organic N in		Reference
		Xylem sap	Shoot	
<i>Glycine max</i>	<i>Rhizobium</i>	0.76 (76 days old)	1.47* (76 days old) 0.737* (151 days old) 0.320† 0.46	Israel & Jackson (1982) Israel & Jackson (1978) Nyatsanga & Pierre (1973)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium</i>	0.113‡	0.377‡§	Van Beusichem (1982, 1983)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i>	0.73	0.76¶	Allen, <i>et al.</i> (1988)

* Assumes organate/N is the same as in the rest of the plant. Organate in whole plant (and plant parts) is quoted in the paper. Organic N is back-computed from organic S content quoted, using the conversion factor of 2 mol equivalent S $\equiv$ 1 mol S $\equiv$ 20 mol N used to convert the measured (but not quoted) organic N content. Organate in shoots is, in fact higher than in roots by a factor of 1.2 (Table 2 of Israel & Jackson, 1982)

† (C-A) and organic N quoted for whole plant; i.e. assumes that shoot organate/N is the same as whole plant organate/N.

‡ Mean of 0.2 and 2.8 h samples of xylem sap for plants grown for 32 days on a nutrient solution without combined N.

§ From (C-A) and N accumulation in shoots, mean of values for plants grown diazotrophically for 21 and 42 days for comparison with 32-day plants used for xylem sap data.

|| Xylem sap organate = total organate minus excess -NH_3^+ in diamino monocarboxylates and NY_4^+ .

¶ Shoot organate/organic N = ratio at end of 36-day culture period.

3. Implications of a high H⁺/N ratio for rhizosphere pH and the acquisition of Fe, Mo and P

The other aspect of the high H⁺/N ratio achieved during diazotrophy by some vascular plants (Table 2) is the larger acidification of the rhizosphere. It is important to bear in mind that this acidification supplements the acidification of part of the rhizosphere by the circulation of H⁺ ions which makes the rhizosphere around the apex more alkaline and that around more mature regions more acidic than the bulk soil. The values in Table 2 show a variable but substantial net H⁺ efflux during diazotrophy. The extent to which patterns can be perceived in the variation is as follows. There is substantial variation of H⁺/N or organate/N ratios within a species [e.g. *Glycine max* (L.) Merr., *Medicago sativa* L., *Pisum sativum*, *Trifolium repens*]. To some extent this may relate to differences in the cultivar used, but environmental influences are also important. The only systematic studies of environmental effects on H⁺/N or organate/N relate to external pH (*Pisum sativum*: van Beusichem, 1982) and the form (*Medicago sativa*: Aguilar & van Diest, 1982) and concentration in solution (*Trifolium repens*: Breeze & Hopper, 1987) of phosphate, with other growth conditions held constant. The data (Table 2) show that the H⁺ efflux per N assimilated by *Pisum sativum* is higher at an external pH of 7.0 than at external pH values of 5.5 or 4.0 (Van Beusichem, 1982). This might be construed as a tendency to regulate the external pH to some particular value. If the H⁺/N of 0.28–0.21 found at pH 4.0–5.5 in *Pisum sativum* is

close to the minimum value that this plant can achieve under the growth conditions used by Van Beusichem (1982), then we predict that the value to which N₂-fixing *Pisum sativum* adjusts its external pH is between pH 7.0 and pH 5.5; figure 2 of Van Beusichem (1982) shows slightly lower growth (rate of dry weight increase) at pH 7.0 than at the two lower pH values, which is not in accord with the plant altering the external pH to the optimal value for growth.

How can we relate the greater requirement for soil-derived elements such as P, Fe and Mo in diazotrophy (Israel, 1987), Israel & Rufty, 1988; Raven, 1988b) to the acidification of the rhizosphere during diazotrophy?

For phosphate, Breeze & Hopper (1987) found that there was a trend toward increased H⁺/N and organate/N in *Trifolium repens* as the inorganic phosphate concentration in the flowing culture solution was decreased in the range 8.0–0.32 mmol m⁻³, a range relevant to the concentration in the soil solution. While the growth rate of the plants was no dependent on external phosphate concentration in the range tested, it is tempting to interpret the increased H⁺ efflux at lower phosphate concentrations as related to solubilization of insoluble phosphate (e.g. calcium phosphate). The utility of such an extra H⁺ efflux is not, of course, demonstrable in solution culture, but may be significant in a more natural rooting milieu for *Pisum sativum*. Aguilar & Van Diest (1981) certainly interpret their data on diazotrophic *Medicago sativa* growing on rock phosphate and on the more readily

available superphosphate in soil culture in this way (see Table 1, and also Mengel & Steffens, 1982; Hauter & Steffens, 1985). There is also a substantial body of data indicating decreased H^+ uptake (OH^- efflux) and, in some cases, net H^+ efflux as a result of P deficiency in terrestrial plants using NO_3^- as their N source (see Raven, 1987a; Moorby, White & Nye, 1988).

This acidification, and that yielded with N_2 , NH_4^+ or $CO(NH_2)_2$ as N source, may have practical significance in increasing plant productivity unless soil buffer capacity is very high (Haynes, 1986).

Another nutrient element which is more readily extractable from acidic soils is Fe (Romheld, 1987; Bienfait, 1987). Indeed, the Fe acquisition 'strategy' of all vascular plants tested, with the exception of the Poaceae (Romheld, 1987), involves a 'Turbo reductase' in the plasmalemma which can reduce a wider range of Fe(III) complexes than the more widespread reductase, together with (usually) an additional efflux of H^+ (Bienfait, 1987; Romheld, 1987) induced in Fe-deficient plants. All of the legumes tested showed the additional localized H^+ efflux in response to Fe deficiency (table 19.3 of Romheld, 1987), although the N source used was not specified. No other symbiotic N_2 -fixer featured in Table 19.3 of Romheld (1987). Since there are reasons to believe that diazotrophs have an additional requirement for Fe (Raven, 1988b), it is likely that the Fe acquisition reactions would be at least as well developed during diazotrophy as during growth with other N sources.

Wallace (1982) found that *Glycine max* showed fewer symptoms of Fe chlorosis when grown diazotrophically on a calcareous soil than when grown on combined N. Wallace (1982) attributes this to the acidifying effect of diazotrophy as opposed to the alkalinizing effect of assimilating combined N. However, since the combined N was supplied as NH_4NO_3 , alkanisation requires the implicit assumption of preferential use of NO_3^- rather than NH_4^+ as N source or, more plausibly, of rapid nitrification of NH_4^+ to NO_3^- . Furthermore rhizosphere pH (or even bulk soil pH) was not measured in these experiments. White & Robson (1989) compared diazotrophically grown *Lupinus* spp., which become chlorotic on calcareous soils, with *Pisum sativum*, which shows normal growth on calcareous soils, using two levels of Fe supply. They found that rhizosphere acidification and extracellular Fe(III) reduction were quantitatively similar for the two species, and that, while acidification was independent of Fe supply, Fe(III) reduction was greater with restricted Fe supply. The poorer performance of *Lupinus* on low Fe alkaline soils thus cannot be ascribed to it having less rhizosphere acidification and Fe(III) reduction than *Pisum*; there two processes are apparently a necessary, but not always a sufficient, basis for improving Fe supply from calcareous

soils. Clearly, much more work is needed to investigate the relationship between symbiotic diazotrophy and Fe acquisition.

The relationship between rhizosphere acidification during diazotrophy and the 'optimal' external pH for growth, and the availability of P, Mo and Fe, is thus far from clear even in the legumes. For those vascular plants which carry out symbiotic diazotrophy with cyanobacteria or *Frankia* there seem to be essentially no data on the relationship between acidification of the rhizosphere in relation to P and Fe acquisition and the 'optimal' external pH, although reference to Table 2 shows that acidification of the medium is a feature of their diazotrophy. Of particular interest in testing the relationship between rhizosphere acidification and Fe and P acquisition are those diazotrophs whose roots acquire nutrients from a bulk water phase rather than from soil. Examples of these are the heterosporous water fern *Azolla* spp., with their *Anabaena azollae* Strasb. symbiont and their observed acidification of the medium during diazotrophic growth (Peters *et al.*, 1980, 1985; Peters & Meeks, 1989), and the nodulated aquatic legume *Neptunia* (McInroy, Andrews & Sprent, 1988). Net acidification of the medium by these organisms is contingent on the H^+ efflux related to synthesis of the plant from the assumed resources of CO_2 , N_2 , SO_4^{2-} and $H_2PO_4^-$ [see equation (3) and comments thereon] not being negated by alkalinisation due to removal of CO_2 from the rooting medium by plant roots for ultimate use in shoot photosynthesis faster than CO_2 can redissolve from the atmosphere. Net removal of CO_2 from the rooting medium is apparently limited to a relatively small number of plants, mainly with isoetid the life form such as *Isoetes* (including *Stylites*) spp., *Lobelia dortmanna* L., *Litorella uniflora* (L.) Asch. and *Eriocaulon* spp., and the non-isoetid *Gratiola aurea* Muhl. ex Pursh. (see Boston, Adams & Pienkowski, 1987a, b; Raven *et al.*, 1988). All of these organisms show net root CO_2 uptake (not HCO_3^- uptake/ OH^- efflux) when submersed, and astomatous *Isoetes* (including *Stylites*) spp. also show this behaviour when their leaves are in air (see Raven *et al.*, 1988). All of these organisms are rhizophytes; almost all of the evidence for hypo-pleustophytes (plants floating with their main photosynthetic organs exposed to the atmosphere and their roots in water; Luther, 1949) suggest that there is *not* a substantial contribution of dissolved inorganic C to the total plant organic C. Certainly there is net accumulation of inorganic C in the culture medium during diazotrophic growth of *Azolla caroliniana* Willd., as judged by the large decrease in medium pH during growth and increase (although not to the original value) in the pH of used medium when it is re-equilibrated with atmospheric CO_2 (Raven, unpublished, Raven, Rothmund & Wollenweber, unpublished). However, these data were obtained

of the energy cost of running the H^+ circulation, the plant can expose various ages of the root surface to pH values above and below that of the bulk soil.

The alkaline zone near the root apex may be of importance in the acquisition of nutrients, such as Mo and P from oxide-bound $H_2PO_4^-$ in acid soil, which are more readily obtained from soils at higher pH values (Clark, 1984). Of particular relevance to diazotrophs is Mo which is a component of the best-known and most wide-spread nitrogenase (Bishop *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1988; Eady *et al.*, 1988; Franco & Munns 1981; Munns & Franco, 1982; Kentemich *et al.*, 1988), so that organisms using this nitrogenase have a substantially greater demand during growth on N_2 rather than on NO_3^- or, especially, NH_4^+ as the N source. Evidence on the role of the alkaline rhizosphere around the root apex in Mo uptake is, apparently, lacking. This effect may be masked by the buffering capacity of the soil; however, it is well documented in the literature that availability of Mo in soils with a pH below 6.0 increases with liming (Munns & Franco, 1982). It must be remembered that there are at least two non-Mo-requiring nitrogenases, one of which needs V (Joerger & Bishop, 1988). Currently available data have not indicated the occurrence of non-Mo-requiring nitrogenases in rhizobia; no data seem to be available on *Frankia* (Bishop *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1988; Eady *et al.*, 1988). However, there is evidence for a V-containing nitrogenase in *Anabaena variabilis* Kutzin (Kentemich *et al.*, 1988). If such a nitrogenase were present in *Anabaena azollae*, it could obviate the Mo requirement for diazotrophic growth of the *Azolla*/*Anabaena* symbiosis. However, the extent to which *Azolla* changes its rhizosphere pH in nature, and the relative pH effects on acquisition of Mo and V from ecologically or agronomically relevant concentrations of these elements, are currently unclear (see Postgate & Eady, 1988; Howarth, Marino & Cole, 1988, and Howarth *et al.*, 1988, for discussion of the relative availability of the metals required by the various nitrogenases in a range of environments). Furthermore, there may be constraints (e.g. lack of conformational protection) on the V nitrogenase (Hills, 1988).

5. pH-insensitive nutrient acquisition process

A final point concerns the occurrence of *relatively* pH-independent nutrient acquisition processes related to the activities of the inhabitants in diazotrophic symbioses. Thus, Cameron & Julian (1988) have shown that *Anabaena* sp. and *Nostoc* sp. produce some compound(s) with M_r not greater than 6–8 kDa which allow these cyanobacteria to use hydroxyapatite (solid) at pH 6 as their sole Ca and P source. These two genera are involved in diazotrophic symbioses with higher plants (*Anabaena* with *Azolla*; *Nostoc* with *Gunnera* and Cycads:

Sprent, 1979), and the possibility that these symbioses can acquire Ca and P by a similar method to that used by the free-living cyanobacteria should be explored.

The production of siderophores by rhizobia (Modi, Shah & Modi, 1985; Nambiar & Sivaramakrishnan, 1987; Smith & Neilands, 1984) and cyanobacteria (Clarke, Stuart & Sanders-Loehr, 1987) in the free-living state is well documented; it is less certain if these compounds are produced in symbiotic associations. If they are, then they could be taken up (after Fe(III) capture) by the host plants. Microbial siderophores are much more likely to compete successfully for Fe under natural conditions than are phytosiderophores produced by grasses (Crowley, Reid & Szaniszló, 1987; Nomoto, Sugiura & Takagi, 1987; cf. Treeby, Marschner & Romheld, 1989). Thus, any siderophores produced by the diazotrophic microorganisms which form associations with grasses (Boddey, 1987; Dobereiner and Pedrosa, 1987) are likely to be better suppliers of Fe to the grass roots under natural conditions than are the grasses' own siderophores.

IV. ACID-BASE BALANCE OF THE SHOOT OF TERRESTRIAL VASCULAR PLANTS LIVING DIAZOTROPHICALLY

1. The role of the xylem

Raven & Smith (1976) and Raven (1977, 1985a, 1986) point out that plant cells cannot, in the long term, dispose of excess H^+ generated in growth on CO_2 , SO_4^{2-} and NH_4^+ , urea or N_2 as the respective C, S and N sources unless they can excrete H^+ to a larger volume of external medium. For the shoots of terrestrial plants, this means that the xylem must supply the shoot of plants growing with NH_4^+ , urea or N_2 as N source with a mixture of solutes which, with photosynthate, does not yield excess H^+ in the shoot. Any excess OH^- generated in the synthesis of shoot material can, of course, be disposed of by organic-acid synthesis, but the resulting organic-acid salt must be accounted for in the composition of the shoot or in the material transported from shoot to root in the phloem.

As a first approach to finding how far the observations fit with the hypothesis outlined above, we compare the composition of the xylem sap with that of shoots of terrestrial vascular plants. Our expectation is that, if there is no return of organic or of organate from the shoot to the root in the phloem, or if there is a return of organate and organic N in the same ratio as they occur in the shoots, then the organate to organic N ratio in the xylem sap should be the same as that in the shoot. This comparison depends *inter alia*, on the xylem sap obtained from a detopped plant having the same ratio of solutes as does the xylem sap in the intact plant, and on the shoot composition having had the

same composition with respect to organate and organic N throughout the growth period under consideration as does the xylem sap, which is usually sampled at a single time.

Table 3 shows the scant data available on the composition of xylem sap and of shoots for diazotrophically grown legumes. It will be seen from the footnotes to the Table that there are a number of provisos which pertain to the data on *Glycine max* and *Pisum sativum*. It must also be borne in mind that SO₄²⁻ reduction and assimilation producing extra OH⁻ in the shoot is the rule in many plants. This means that OH⁻ is generated in the shoot, leading to extra organate synthesis there relative to that which occurs in xylem sap. With a whole plant organic N:organic S ratio of 20, $\frac{3}{4}$ of plant N in the shoot, and 2OH⁻ generated per SO₄²⁻ reduced to organic S and -SH, we predict that there would be an extra 0.13 organate per N in the shoot than in the xylem sap.

The correction for SO₄²⁻ assimilation in the shoot means that the agreement between xylem sap and shoot organate/N is less good for *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* than appears at first sight, while the *Pisum sativum* data are in closer agreement. The uncorrected ratios of shoot organate/N: xylem sap organate/N are 1.93, 1.04 and 3.34 for *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum* respectively, while the 'corrected for SO₄²⁻' values are 1.76, 0.86 and 2.19 respectively. Our prediction here would, then, be that *Phaseolus vulgaris* transports similar amounts of organic N and organate from shoot to root, while a organate/organic N of less than 1 is the case for *Pisum sativum* and *Glycine max*.

2. The significance of recycling in the phloem

One way of quantifying recirculation in the phloem from shoot to root in the absence of analysis of phloem sap is to compare the ratio of the solute of interest to that of a solute which shows very little mobility in the phloem such as Ca²⁺, in the xylem and in the shoot (Raven, 1977). In general the ratio is higher in the xylem than in the shoot, yielding a positive value for recirculation. For *Phaseolus vulgaris*, Tables 5 and 7 of Allen, Raven & Sprent (1988) show that the organic N/Ca²⁺ ratio in xylem sap is 6.73, while that of organate/Ca²⁺ is 4.91. For the shoot, Table 4 of Allen *et al.* (1988) give values of 4.88 for organic N/Ca²⁺ and 3.71 for organate/Ca²⁺. Making the assumption, which is close to correct, of phloem immobility of Ca, this suggests that of 6.73 mol N delivered to the shoot in the xylem (6.73-4.88) or 1.85 mol N are recycled in the phloem. For 4.91 mol organate delivered via the xylem (4.91-3.71) or 1.2 mol organate must be recycled from the shoot in the phloem; correction for organate synthesised in the shoot to whole plant requirement yields an extra 0.65 mol organate to be exported, a total of 1.85 mol. We would thus predict a

organate/N ratio in the phloem sap of 1.00 mol organate per mol N.

Similar computations can be performed for the data of Israel and Jackson (1982) on 76-day-old *Glycine max* to yield a value of organate/organic N in the phloem of 0.35.

The data of Van Beusichem (1981, 1983) on *Pisum sativum* is also subject to this sort of analysis. We use the same approach to Van Beusichem's data here as was used in the preparation of Table 3, i.e. take the xylem sap data for 32 day diazotrophic plants as the mean of 0-2 h and 2-8 h of collection, and the shoot data as the mean of that for 21- and 42-day diazotrophic plants for comparison with the 32-day plants used in the collection of xylem sap. It must be emphasized that growth conditions for all the plants was the same (Van Beusichem, 1981, 1983). Table 2 and 3 of Van Beusichem (1983) yield values of 17.6 for organic N/Ca²⁺ and 1.97 for organate/Ca²⁺ in xylem sap of *Pisum sativum*. Tables 2 and 5 of Van Beusichem (1981) yield values of 4.60 from organic N/Ca²⁺ and 1.71 from organate/Ca²⁺ for shoots of *Pisum sativum*. Of 17.6 mol organic N travelling to the shoot in the xylem, the data suggest that (17.6-4.6) or 13.0 mol organic N are recycled to the root in the phloem. For organate, of each 1.97 organate delivered by the xylem to the shoot (1.97-1.71) or 0.26 mol organate are returned to the root in the phloem. Correcting for organate synthesis in the shoot related to SO₄²⁻ assimilation, we have an extra 0.61 organate to be disposed of, a total of 0.87 organate. This yields a value of organate/organic N in the phloem of 0.87/13.0 or 0.067 mol organate per mol organic N.

The estimated organate/organic N values in the phloem sap for the three legumes (range 0.067-1.0) vary by a factor of 15. Direct measurements of organate/N organic N for phloem sap of the three species under discussion for comparison with the predicted values do not seem to be available. To get some general idea of what the directly measured organate/organic N in the phloem sap of diazotrophic legumes may be, we turn to the data of Jeschke, Atkins & Pate (1985) and of Jeschke, Pate & Atkins (1986) on *Lupinus albus* L. Jeschke *et al.* (1985) grew *Lupinus albus* in an N-free culture solution with the N₂-fixing nodules above the culture solution in an essentially water-vapour saturated atmosphere, while Jeschke *et al.* (1986) grew their plants in silica sand supplied with N-free nutrient solution, i.e. with their nodules in contact with nutrient solution. The possible significance of the different nodule environment for nodule acid-base balance and water relations is discussed in the next section.

Jeschke *et al.* (1985) give data on the organic N and inorganic cation concentrations for xylem sap and phloem sap of their diazotrophic *Lupinus albus*. Since no data are given for either inorganic or

organic cations, these data can only be used to set upper limits on the organate/organic N in the transport fluids for the limiting case of zero concentration of inorganic anions in the xylem and the phloem. These upper limits are a organate/organic N in the phloem which is not in excess of 0.51 and, for xylem, a organate/organic N not in excess of 0.44. The upper limit for xylem is in the range quoted for organate/N for *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum* (Table 3). The phloem value is slightly in excess of the xylem values, but it cannot be used to interpret shoot acid-base balance because of the unknown shoot organate/organic N in these plants, as well as the problem of the phloem (and xylem) values only being upper limits on organate/organic N.

Jeschke *et al.*, (1986) provide data on the composition of xylem and phloem sap of diazotrophically grown *Lupinus albus* supplied with various NaCl concentrations during growth. We deal here only with the results obtained with 1 mol m⁻³ NaCl added to basic growth medium. This was the lowest salinity treatment, and thus was most directly comparable with the other data discussed in this section.

For the xylem, the organic N deduced from concentrations of amino acids and amides is 12.98 mol m⁻³. The organate concentration deduced from inorganic cation concentration (mol m⁻³, corrected for charge per ion) minus inorganic anion concentration (mol m⁻³, corrected for charge per ion) is 9.97 mol m⁻³. A much larger value is found by adding the net negative charges on the organic anions glutamate and aspartate (there are no organic compounds bearing a net positive charge), i.e. 21.97 mol m⁻³ of organate. Thus the two estimates of organate/organic N are 0.768 and 1.679.

For phloem sap collected from petioles, the organic N concentration is 46.4 mol m⁻³; organate computed from inorganic cations minus inorganic anions is 58.5 mol m⁻³, while for the charge on organic solutes yields 122.5 mol m⁻³. The ratios of organate to organic N are 1.26 and 2.64 respectively. For stem base phloem sap, the organic N concentration is 72.4 mol m⁻³; organate from inorganic cations minus inorganic anions is 47.92 mol m⁻³ and, from the charge on organic solutes, 103.22 mol m⁻³. The ratios of organate to organic N are 0.662 and 1.426 respectively. Even the lower of these pairs of values exceeds the upper limit computed from the data of (mol solute m⁻³) Jeschke *et al.*, (1985). In any case, even the lower organate/organic N value for petiolar phloem sap measured directly is higher than the highest prediction for *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* or *Pisum sativum* (see above), and the higher stem base phloem sap value is between the upper two predictions for *Glycine*, *Phaseolus* and *Pisum*.

The value of organate/organic N found by other workers for non-diazotrophic plants on N-sources such as NH₄⁺ or NO₃⁻ are generally within the

(admittedly wide) range found or predicted for diazotrophic legumes. We deal here solely with *Ricinus communis*. Van Beusichem *et al.* (1985) found organate/organic N values of 0.65–0.88 for phloem 1959a, b; Ahmed, Missimer & Moat, 1965) is lost on measured carboxylates and organic N. Allen & Smith (1986) report phloem sap compositions for the same species grown on NO₃⁻ and two concentrations of NH₄⁺. Using the difference between inorganic cations and inorganic anions (SO₄²⁻ was not reported) as the carboxylate content, the organate/organic N ratio on NO₃⁻ is 0.37, and 0.21–0.35 for NH₄⁺ as N source. The data of Allen & Raven (1987), using a similar method but including SO₄²⁻, give organate/organic N in phloem sap of 0.76 for plants grown on 1 mol m⁻³ NO₃⁻ and 0.32 for plants grown on 1 mol m⁻³ NH₄⁺.

We conclude that the measured organate/organic N ratio in the phloem sap of diazotrophic legumes (and, less relevantly, of plants which are not growing on N₂) are consistent with the predicted organate/organic N ratio in phloem sap from considerations of shoot acid-base regulation of diazotrophic legumes.

V. ACID-BASE BALANCE OF THE NODULES OF TERRESTRIAL VASCULAR PLANTS LIVING DIAZOTROPHICALLY

Our objective here is to examine the acid-base imbalance which may arise in N₂-fixing nodules of terrestrial vascular plants, and the ways in which the imbalance may be solved. We do not deal in detail with the important area of the acid-base balance of the N₂-fixing inhabitant (microsymbiont). The reason is not so much related to knowledge of N exchanges between inhabitant and nodule as uncertainty over the form(s) in which organic C is supplied to the inhabitant. N₂ clearly enters the inhabitant, and NH₃ (possibly NH₄⁺) is the form in which the fixed N leaves the inhabitant; data on this are available for legume nodules (Dilworth & Glenn, 1985; Quispel *et al.*, 1985) and for the *Anabaena/Azolla* association (Peters *et al.*, 1985; Meeks *et al.*, 1987; Peter & Meeks, 1989), as well as for the symbioses of cyanobacteria with *Anthoceros*, and with fungi in lichens (see Meeks *et al.*, 1985). For the cyanobacterial associations the organic C for (photo)organotrophic growth of the cyanobacterial N₂-fixed is supplied as sugars (e.g. Peters *et al.*, 1985, for *Azolla/Anabaena*), making the acid-base regulation processes in the inhabitant and the surrounding exhabitant (macrosymbiont) cells relatively simple to envisage. For leguminous nodules which have the possibility of organic C supply as organic-acid anions or even as amino acids (Dilworth & Glenn, 1985; Quispel *et al.*, 1985), the analysis of acid-base regulation is more difficult. This is es-

pecially the case if amino-acids enter the bacteroid, presumably adding to the NH_3 (or NH_4^+) efflux from the bacteroid.

Our consideration of the acid-base perturbation related to N_2 fixation in nodules is thus based on a consideration of the whole nodule. Legume nodules obtain organic C (mainly as sucrose) in the phloem, export organic N (as amino acid, amides and/or ureides) in the xylem, and (provided they are not surrounded entirely by a gas phase) have the possibility of exchanging non-volatile as well as volatile compounds with their environment (Pate & Atkins, 1983; Sprent, Giannakis & Wallace, 1987; Raven *et al.*, 1989).

Sucrose is the major organic C substrate supplied to, and hence used by, the nodules. Work on the composition of phloem sap of N_2 -fixing legumes shows that for the stem internode phloem sap of *Lupinus albus* grown at 1 mol m^{-3} NaCl salinity, the total organic C amounts to $5900 \text{ mol C m}^{-3}$, of which 93.15% is as sucrose and 6.85% organic acid anions, amino-acids and amides (Jeschke *et al.*, 1986). For the petiolar phloem sap, the total organic C is $8,208 \text{ mol C m}^{-3}$, of which 95.52% is as sucrose and only 4.68% is as organic acid anions, amino-acids and amides. Pate, Atkins & Rainbird (1981) show, for *Lupinus albus*, that of every 100 mol C entering the nodule in the phloem, 53.6 mol are respired to CO_2 (with 5.7 mol CO_2 refixed by the nodule), 18.5 mol are retained by the nodule, and 27.9 mol are exported in the xylem. None of these three categories of C use could be supplied entirely by non-sucrose organic C. While, as we shall see, the non-sucrose organic components of the phloem sap may be significant for acid-base regulation, they cannot be regarded as major organic substrates for nodule metabolism. For *Lupinus albus* (Jeschke *et al.*, 1986), the ratio of organate to organic C is 0.015 for petiolar phloem and 0.017 for stem phloem based on the measured content of sucrose, amino-acids and organic acids (i.e. not computing organic anions as inorganic cations minus inorganic anions).

Turning to a consideration of the organic N compounds exported from the nodule in the xylem, Pate, Gunning & Briarty (1969) give concentrations of amino acids and amides in xylem sap excluding from detached nodules of the non-ureide-transporting *Vicia faba* L. From their data values of 0.125 mol net negative charge per mol organic N, and 0.0556 mol net negative charge per mol organic C, can be computed.

For the ureide-transporting *Glycine max*, Streeter (1979) and Wong & Evans (1971) found that the nodule exudate contained approximately equal quantities of N in amino-acids and amides and in allantoin and allantoic acid; the data suggest 0.115 mol organate per mol N, and 0.041 mol organate per mol C, even though the ratio of amino-acids, amides and ureides may vary with cultivar,

growing conditions, age of plant and, especially, with rhizobial strains (Neves & Hungria, 1987).

It is important to bear in mind that higher ratios would be obtained if there were any organic acid anions present in the exudate. Interpretation of the published data, which include malate as well as organic N compounds, is complicated since the data presented for detached nodules or decapitated root systems give no indication as to which data set refer to which transport fluid (Pate *et al.*, 1981). However, all three of the sets of data (for *Lupinus albus*, *Vigna unguiculata* (L.) Walp and *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) show a significant mol fraction of malate in the total of malate plus amino-acids, amides and ureides (Pate *et al.*, 1981). Since at least one set of data refers to nodule exudate, organic acid anions are probably a feature of nodule exudate.

As a first attempt to define the acid-base balance of N_2 -fixing nodules, we assume (1) zero nodule growth (more realistic for a determinate than an indeterminate nodule), (2) half of the organic C entering the nodule leaves as organic N in the xylem, the rest being lost as respiratory CO_2 and (3) there is no net metabolism of phloem organate in the nodule (Table 4). Then in *Vicia faba* with a nodule xylem sap concentration of 0.0556 mol organate per mol C we calculate that the phloem concentration would be 0.0278 mol organate per mol organic C, if interaction with the medium in acid-base regulation is to be avoided. For *Glycine max*, the required mol organate per mol organic C in the phloem is 0.0205 mol organate per mol organic C. The molar organate/organic C ratio in the phloem sap of N_2 -fixing *Lupinus albus*, computed from the sucrose, organic acid anion and amino acid plus amide content of phloem (Jeschke *et al.*, 1986) is 0.015–0.017. A lower value results if the organic anion content is computed from inorganic cations minus inorganic anions. Pate *et al.* (1981) quoted values for the nodule exudate and/or decapitated root system exudate of *Lupinus albus* which yield molar organate/organic C values for amino-acids, amides plus malate of 0.0574. With respiration of half of the organic C centering the phloem, the required phloem organate/organic C is 0.0287.

We are thus left with an 'observed' phloem organate/organic C of 0.015–0.017, and a 'required' value of 0.0205–0.0287 (Table 4). While there is not a large difference, the 'required' values exceed the 'observed' values. Using more realistic (observed) values for the allocation of the organic C by nodule metabolism, e.g. the ratio of 0.536 respired: 0.185 retained: 0.279 exported in xylem in *Lupinus albus* (Pate *et al.*, 1981) helps to bridge the gap. No data appear to be available for the organate/C for *Lupinus albus* nodules. Values of 0.010–0.012 mol organate per mol C can be computed for *Glycine max* nodules, assuming C is 45% of the dry weight (Nyatsanga and Pierre, 1973). Allen *et al.* (1988) quote values of

Table 4. Measured organate/organic C molar ratios in xylem sap leaving root nodules, and in phloem sap, of diazotrophic legumes, and organate/organic C molar ratio of phloem sap predicted* from xylem sap composition

Organism	Measured mol organate per mol organic C in xylem sap	Predicted* mol organate per mol organic C in phloem sap	Measured mol organate per mol organic C in phloem sap	Reference
<i>Glycine max</i>	0.0410	0.0205	No data	Wong & Evans (1971)
<i>Lupinus albus</i> L.	0.0574	0.0287	0.015–0.017	Streeter (1979) Pate <i>et al.</i> (1981) Jeschke <i>et al.</i> (1986)
<i>Vicia faba</i> L.	0.0556	0.0278	No data	Pate <i>et al.</i> (1969)

* Prediction assumes that half of the organic C entering the nodule in the phloem is respired, and that the remaining half is transported out in the xylem as part of the mechanism of organic N removal (i.e. none of the C is incorporated into nodule material or is lost to the nodule environment). A further assumption is that there is no net production or consumption of phloem-borne organate in the nodule.

0.019 mol organate per mol C for nodules of *Phaseolus vulgaris*. In both cases the values are lower than for root and shoot tissues. Both *Glycine* and *Phaseolus* have determinate nodules, so fractional incorporation of organic C into N_2 -fixing nodules is lower than in *Lupinus*. However, assuming similar organate/C values in *Lupinus* as in *Phaseolus*, the 0.185 mol organic C incorporated into nodules for each mol C entering involves 0.019 mol organate per mol C, or 0.0035 mol organate incorporated. The 0.279 mol C exported in the xylem involves 0.0574 mol organate per mol C, or 0.0161 mol organate exported. This involves 0.0195 mol organate imported per mol C entering in the phloem, i.e. a rather lower value than that computed earlier, in part due to more respiration, but mainly resulting from the lower organate/C in nodule tissue than in xylem exudate. Using the organate/C values (0.010–0.012) for *Glycine* nodule tissue, the overall requirement for organate/C in the phloem entering the nodule is 0.0179–0.0182, slightly closer to the 'observed' values.

Thus, accepting the organate/N and organate/C values suggested for xylem exudate from nodules, the organate/C values for the phloem of N_2 -fixing nodules could well be adequate to account for acid-base balance within the nodule without requiring H^+ exchange between nodules and their environment. This is, of course, essential for *Lupinus albus* grown as described by Jeschke *et al.* (1985) with all of their nodules above the culture medium, and for the stem nodules of species of *Aeschynomene* and *Sesbania*. It is important to remember that the values of organate/C for phloem sap which we used is rather higher than many measured values and that the organate/C or organate/N for xylem sap leaving the nodule is lower than in xylem sap exuding from decapitated root

systems (Table 3). However, we must note that it is not realistic to expect the organate/C or organate/N of the root xylem sap of a diazotrophic nodule to be accounted for entirely by nodule exudate organate/C and organate/N, based on phloem inputs of organate and organic C to, and N_2 fixation by, the nodules. Growth involves net organate accumulation by the plant, so net H^+ extrusion must occur somewhere! The hypothesis of acid-base regulation in the nodule being independent of H^+ exchange between the nodule and its environment implies that the net H^+ efflux occurs from the general root surface: the xylem sap would be 'topped up' with organic acid salts, phosphates, etc. as well as water, *en route* from the nodules to the shoot.

The alternative hypothesis is that at least part of the acid-base regulation in the nodule involves H^+ efflux from the nodule to its aqueous environment. Clearly this can only occur when the nodule is in an aqueous environment such as soil or culture solution. This alternative hypothesis could explain an excess of organate leaving the nodule over that entering the nodule plus what is incorporated in the structure. It would also involve net synthesis of organate in the nodule, either by oxidising reduced (carbohydrate) C and/or by the anaplerotic fixation of CO_2 using, mainly, phosphoenolpyruvate carboxylase, thus providing the H^+ which is excreted to the nodule medium.

What evidence is there on these points? Aside from the (unproven) imbalance of organate import in phloem, retention in nodule and export in xylem, we can look for evidence of H^+ excretion from nodules and of net organate synthesis in nodules.

Dealing first with net organate synthesis in nodules, much has been made of the capacity of nodules to fix $^{14}CO_2$, and the extractable activity of

Mo and of H_2PO_4^- adsorbed to Fe_2O_3 and Al_2O_3 (see Section II), we deal particularly with the two nutrient Fe and Mo.

We have already seen that, for uptake by roots, apical alkalinisation and more basal acidification would favour, respectively, Mo uptake and P uptake from adsorbed H_2PO_4^- , and Fe uptake and P uptake from rock phosphate. If the nodule behaved similarly, then the apex would favour uptake of Mo and of P from absorbed H_2PO_4^- and the more basal regions Fe uptake and P uptake from rock phosphate. However, we have already seen that there is no direct evidence for such a zonation in nodules.

The observed acidification would favour Fe uptake. The minimum radius of functional nodules (Sheehy & Thornley, 1988), and hence their maximal surface area per unit volume, means that the area of interface between plant and soil per unit biomass is much lower for nodules than for absorbing roots (Sprent & Raven, 1985). This differential is increased if the occurrence of root hairs and/or mycorrhizas on roots, but not, generally on nodules, is taken into account. For legumes and other symbiotic diazotrophs this is not necessarily a great problem for Fe acquisition, since their mechanism for obtaining Fe from low-Fe environments is an 'intensive' surface reduction and rhizosphere acidification, rather than the graminaceous strategy of producing phytosiderophores and recovering them, loaded with Fe, over an 'extensive' surface (see Section III). Doubts as to the efficacy of graminaceous phytosiderophores, and the role of microbial siderophores in Fe acquisition by non-graminaceous plants, blurs this distinction (see Section III). Nevertheless, the acidified nodule surface does present a potential surface for Fe acquisition by surface reductant generation. However, there are no morphological or biochemical data favouring such a role.

Another consideration related to Fe acquisition by nodules relates to the net need for Fe by the nodule in terms of the time course of acidification. The net Fe need occurs during nodule growth, while H^+ extrusion related to acid-base regulation during N_2 reduction and export only occurs from mature functional nodules or parts of nodules. This means that H^+ extrusion from this source would not be temporally attuned to the Fe need in determinate nodules, while there would be some temporal dislocation between H^+ extrusion and Fe uptake even in indeterminate nodules, where some Fe is needed before any N_2 fixation can occur. If these are a component of H^+ extrusion related to H^+ recirculation in growth of the nodule, then some acidification necessarily occurs during the time of net Fe need in both determinate and indeterminate nodules.

Clearly, much more work is needed to elucidate the role of the nodule surface in Fe acquisition as an alternative to the mechanism involving uptake by the general root surface, followed, presumably, by

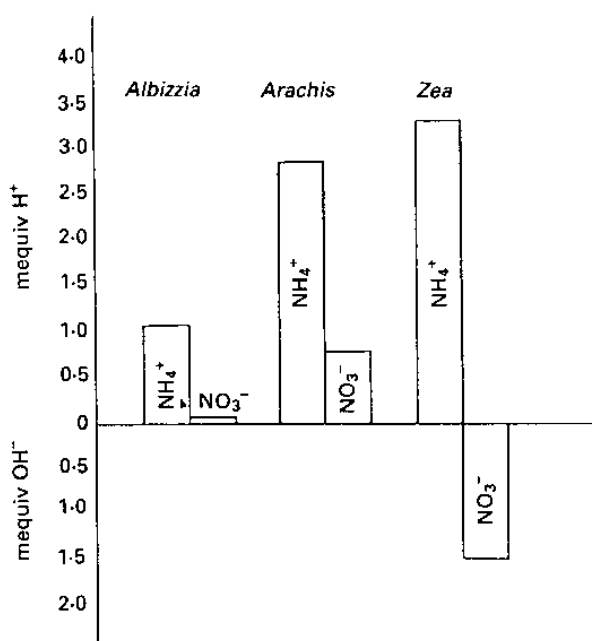


Figure 1. Quantity of H^+ or OH^- extruded to the culture solution in days by three different plant species supplied with NH_4^+ or NO_3^- after 20 days' growth in soil (Jacob-Neto *et al.*; unpublished). All plants were of the same size, and all differences in H^+ extrusion were significant at the 5% level.

transfer to the xylem, movement up the xylem, and finally transfer to the phloem stream moving to the nodule (Maas *et al.*; 1988). Even more work is needed to distinguish the possible routes of uptake of Mo. In immediate practical terms, however, the variable extent of net acidification by root systems of N_2 -fixing plants maybe of more significance (Israel & Jackson, 1978; Nyatsanga & Pierre, 1973; Aguilar & Van Diest, 1981; Fig. 1; Table 5). While acidification of the rhizosphere during diazotrophic plant growth may, as we have seen, aid acquisition of at least some nutrients from alkaline soils, it is important to emphasise that in the steady state, with no loss of material from, or gain of material by, a 'climax' community, net acidification of soil does not continue; as much H^+ is removed in the mineralisation of plants and their consumers as is produced in their growth (see Helyar, 1976). However, this is also the case in which legumes are used for green manuring. In this case the acidifying effect on the rhizosphere could benefit, for example, P acquisition from rock phosphate without any long term effect on the soil (Aguilar & Van Diest, 1981; Mengel & Steffens, 1982; Hauer & Steffens, 1985). However, even in a community which is not anthropogenically influenced, long-term changes in acidity occur due to material gains and losses, changes in plant species in the community and changes in N forms other than N_2 (Helyar, 1976; Haynes, 1986). Agriculture, by removing all or part of the tops of plants, prevents return of a substantial fraction of the intraplant base equivalent to the H^+ lost to the soil during diazo-

phosphoenolpyruvate carboxylase in nodules (see reviews by Minchin *et al.*; 1981; Pate & Atkins, 1983; Pate *et al.*; 1981; Rawsthorne *et al.*; 1980). The available data may be summarized as follows.

- (1) Like all living tissue, nodules fix exogenous ¹⁴CO₂.
 - (2) There is never a net CO₂ fixation by nodules.
 - (3) The early products of ¹⁴CO₂ fixation are consistent with a (C₃ + C₄) carboxylation.
 - (4) Phosphoenolpyruvate activity in nodule extracts is more than adequate to account for the ¹⁴CO₂-saturated rate of ¹⁴CO₂ fixation *in vivo*.
 - (5) Dependence of ¹⁴CO₂ fixation rate by nodules on exogenous ¹⁴CO₂ concentration is consistent with the observed location of phosphoenolpyruvate carboxylase within the variable resistance 'O₂ barrier' (Christeller, Laing & Sutton, 1977; Coker & Schubert, 1981; Sheehy & Thornley, 1988; Vance, Stadel & Maxwell, 1983; Maxwell *et al.*, 1984).
 - (6) Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in nodules exceeds that in the rest of the root on a fresh-weight basis (Christeller *et al.*; 1977; Day & Mannix, 1988; Smith, 1985), but not on a protein basis (Smith, 1985; cf. Day & Mannix, 1988).
 - (7) Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase from *Medicago sativa* is immunologically cross-reactive with a component of phosphoenolpyruvate carboxylase from uninfected roots of *Medicago sativa*, and with that of nodules of *Glycine max*; otherwise the nodule enzyme most closely resembles that from leaves of C₄ plants (Miller, Boyland & Vance, 1987).
 - (8) The rate of ¹⁴CO₂ fixation (insofar as this can be corrected for dilution by endogenous ¹²CO₂) is adequate to account for the rate of anaplerotic (C₃ + C₄) carboxylation needed to provide the C₄ and C₅ C skeletons of amino acids and amides (aspartate, glutamate, asparagine, glutamine) which are the main vehicles (other than ureides) for organic N export from nodules.
 - (9) The correlation between ¹⁴CO₂ fixation rate and N₂ fixation rate is closer in amide-exporting than in ureide-exporting plants; this is consistent with the pathways of C skeleton synthesis (Coker & Schubert, 1981).
 - (10) None of the foregoing rules out the possibility that phosphoenolpyruvate carboxylase activity compensates for respiratory use of organates entering in the phloem rather than bringing about net synthesis of organic acids; the nodules have enzymes which can dispose of organates (Lawrie & Wheeler, 1975a, b; Rawsthorne *et al.*; 1980). Nodules may also be able to synthesise C₄ dicarboxylic acids *via* the glyoxylate pathway (Rawsthorne *et al.*; 1980).
- The evidence summarized above is consistent with 'dark' CO₂ fixation generating organates in root nodules, although it does not compel us to assume that all, or even most, of the organates in nodule xylem sap represents *net* synthesis involving

anaplerotic C₃ + C₄ carboxylation in the nodule. This is true *a fortiori* of plants exporting much of their N as ureides (cf. Cookson, Hughes & Coombs, 1980); the negative charge on allantoate is not a product of C₃ + C₄ carboxylation (see Goodwin & Mercer, 1983; Pate *et al.*, 1981, and Rawsthorne *et al.*, 1980, for details of pathways of ureide synthesis) and the only C atom derived immediately from CO₂ during purine synthesis via phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (Lukens & Buchanan, 1959a, b; Ahmed, Missimer & Moat, 1965) is lost on conversion to allantoin and allantoic acid.

More generally, we can address the problem of organate synthesis in nodules without necessarily invoking C₃ + C₄ carboxylations. This possibility has already been mentioned in the context of C₄ dicarboxylic acid synthesis by the glyoxylate cycle, and ureide synthesis. To this we can add the synthesis of cell wall uronates (presumably synthesized in the cell whose wall they occur in). In none of these cases does available evidence for the occurrence of the synthetic pathway in nodules rule out the possibility that the synthesis of these organates is balanced by the metabolism of other organates which have been imported. For this, evidence is required *either* of a deficit of organate influx in the phloem relative to that exported in the xylem (see above) or remaining in the nodule, *or* of net H⁺ excretion by nodules, *or* of both.

We now address the small quantity of evidence available concerning H⁺ fluxes between nodules and their aqueous environment. It must be admitted that little such evidence exists. Work with the bromocresol purple technique (see Weisenseel, Dorn & Jaffe, 1979; Marschner & Romheld, 1983) using nodulated *Cajanus* showed that the nodules did acidify the medium (Miller, Sprent & Raven, unpublished). Quantitation of the bromocresol purple technique is not easy (Miller, 1986; cf. Weisenseel *et al.*; 1979), so the H⁺ flux data is only qualitative (Miller, Sprent and Raven, unpublished). Furthermore, it is not clear if the acidification relates entirely to net H⁺ efflux associated with net synthesis of an organic acid with H⁺ efflux in exchange for a cation such as K⁺, or to the acidifying part of an H⁺ circulation whose alkaline surface zone was not rendered visible in our observations, or to a mixture of the two. The data are clearly inadequate to draw any general conclusions as to the role of H⁺ efflux from *Cajanus* nodules in the acid-base regulation of the nodules. However, regardless of the source of the H⁺, it is possible that acidification of the medium could influence the acquisition of nutrients by the nodules. In view of the likelihood of a particular need for Fe and Mo (and P?), on a unit biomass basis, in nodules relative to the rest of the plant (Raven, 1988b), and the known influence of soil acidification in enhancing the acquisition of Fe and of P from rock phosphate, and diminishing that of

Table 5. *Rhizoplane acidification of four species of legume with NH₄⁺, N₂ or NO₃⁻ as N source (initial pH of soil was 6.2)*

Species of legume	Decrease in pH at root surface relative to bulk soil with N obtained indicated by the fraction of the area around the root in which the indicator turns yellow indicating acidification		
	NH ₄ ⁺	N ₂	NO ₃ ⁻
<i>Dolichos lablab</i> L. [= <i>Lablab purpureus</i> (L.) Sweet]	0.13	0.07	0.0
<i>Mucuna deeringiana</i> (Bort) Merr.	0.21	0.33	0.0
<i>Vigna unguiculata</i>	0.26	0.07	0.05
<i>Vigna mungo</i> (L.) Hepper.	0.21	0.07	0.04

Plants were grown for 36 days with bromocresol purple as pH indicator as described by Marschner & Romheld (1983). Previously unpublished data of Jesus and Franco.

Table 6. *Excess base in grains and shoots of two legumes expressed per metric ton of grain, and the ratio of excess base to nitrogen*

Crop	Mol excess base per metric ton of grain		Mol excess base per mol N in the the grain	
	Grain	Shoot	Grain	Shoot
<i>Phaseolus vulgaris</i>	268.6	3324	0.11	0.46
<i>Glycine max</i>	1010.1	3642	0.09	0.28

The average yield of *Phaseolus vulgaris* in Brazil is 500 kg grain per hectare; that of *Glycine max* is about 2200 kg/ha. *Glycine* shoots are left in the field after the grain is harvested; the whole aerial parts of *Phaseolus* are removed.

trophy, and thereby leads to continued acidification. The magnitude of the changes are indicated in Table 6 for two species of legume.

VI. CONCLUSIONS

The diazotrophic symbioses involving higher plants commonly result in a substantial H⁺ excretion and corresponding accumulation of inorganic salts of organic anions in the cell for each N assimilated. This represents an additional generation of organic acids per unit N, or per unit biomass synthesised, than during growth on NH₄⁺, but resembles that found with urea as N source. The H⁺ excretion per N assimilated is thus larger than would occur without the additional organic acid synthesis and can approach the value found during growth on NH₄⁺, albeit at the expense of additional energy (and water) costs predicted for synthesis of additional organic acids. The overall prediction is an increased energy and water costs of some measure of inclusive fitness (e.g. production of a viable seed). This cost is additional to the intrinsic additional costs in terms of energy (and hence water) for diazotrophy (but not

urea assimilation) relative to ammonium assimilation because of the large reductant and ATP costs of diazotrophy.

A possible offset of the energy and water costs of organic acid synthesis and H⁺ excretion is, at least in a P- or Fe-limited environment with a relatively high soil pH value, an increased capacity for P and Fe acquisition. The diazotrophs could thus use a non-limiting resource (light, water) to acquire a more limiting resource (P or Fe) and thus, especially in the case of Fe, materially aid the acquisition of the co-limiting resource, N, via diazotrophy. There is reasonable evidence for this in the case of P, and some evidence in the case of Fe. Interesting tests of the P- and Fe-acquisition hypotheses would be an analysis of diazotrophs rooted in soil under light- or water-limited conditions, or of a floating aquatic diazotroph such as *Azolla* for which the observed acidification of the medium would be of less avail in the acquisition of P and Fe. The alternative mode of acidification of at least *part* of the rhizosphere is the circulation of H⁺, *out* of more mature zones and *into* the apex, on which any *net* acidification due to organic acid synthesis in diazotrophs is super-

imposed. The circulating H^+ alternative may be more energy (and water) efficient than net organic acid synthesis as a means of acidifying at least part of the rhizosphere, thus aiding acquisition of P from rock phosphate and of Fe from $Fe(III)$ deposits. This strategy might also lead to alkalization of the extreme apex which could be important in the acquisition of Mo and of P from adsorbed $H_2PO_4^-$, nutrients which are especially quantitatively important for (most) diazotrophs. However, it is important to remember that other N-sources (e.g. urea) which effectively introduce a neutral N source into the cells have similar H^+/N ratios despite not having the same predicted requirement for Fe or Mo as diazotroph (Raven, 1988b).

Acid-base regulation of the nodules of vascular plants associated with non-cyanobacterial inhabitants is poorly understood. Nodules which are not surrounded by an aqueous medium (e.g. naturally occurring stem nodules, or root nodules which are experimentally isolated from an aqueous medium) must conduct their acid-base affairs entirely via solute exchange with the rest of the plant and gaseous exchange with their immediate environment. The acid-base regulation of the 'isolated' nodules can just be accommodated in terms of reported values for the concentration of the relevant solutes in the phloem sap of the stem, and the xylem sap leaving the nodule, of diazotrophic legumes. For nodules growing in soil or culture medium there is the additional possibility of acid-base regulation by net H^+ efflux to the nodule's environment. There is some evidence consistent with such H^+ efflux, which could aid the acquisition from the nodule environment of Fe, a resource for which there is an especially high predicted requirement in diazotrophs. However, the timing of such acid-induced Fe acquisition may not be appropriate for Fe supply to growing, as opposed to functioning, nodules in those legumes with determinate nodules. For the nutrients P and Mo, where empirical data demonstrate a greater demand in diazotrophic than non-diazotrophic plants, acidification of the basal part of the growing nodule may help acquisition of P from rock phosphate in alkaline soils. Alkalization of the growing nodule apex may help $H_2PO_4^-$ and MoO_4^{2-} acquisition from acid soils with a high content of Fe_2O_3 and Al_2O_3 .

ACKNOWLEDGEMENTS

J. A. R. gratefully acknowledges the inspiration of Professor J. I. Sprent and Dr B. Wollenweber and the financial support of AFRC. J. A. R.'s visit to Brazil was made possible by the Inter American Institute for Cooperation on Agriculture.

REFERENCES

- ABUZINADAH, R. A. & READ, D. J. (1986a). The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **103**, 481–493.
- ABUZINADAH, R. A. & READ, D. J. (1986b). The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. III. Protein utilization by *Betula*, *Picea* and *Pinus* in mycorrhizal association with *Hebeloma crustuliniforme*. *New Phytologist* **103**, 507–514.
- ABUZINADAH, R. A., FINLAY, R. D. & READ, D. J. (1986). The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. II. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*. *New Phytologist* **103**, 495–506.
- AGUILAR, S. A. & VAN DIEST, A. (1981). Rock-phosphate mobilization induced by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil* **61**, 27–42.
- AHMED, F., MISSIMER, P. & MOAT, A. G. (1965). Aminoimidazole ribonucleotide carboxylase. Partial purification and properties. *Canadian Journal of Botany*, **43**, 1723–1731.
- ALLEN, S. & RAVEN, J. A. (1987). Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: the role of long distance transport. *Journal of Experimental Botany* **38**, 580–598.
- ALLEN, S., RAVEN, J. A. & SPRENT, J. I. (1988). The role of long-distance transport in intracellular pH regulation in *Phaseolus vulgaris* grown with ammonium or nitrate as nitrogen source, or nodulated. *Journal of Experimental Botany* **39**, 513–528.
- ALLEN, S. & SMITH, J. A. C. (1986). Ammonium nutrition in *Ricinus communis*: its effects on plant growth and the chemical composition of the whole plant, xylem and phloem saps. *Journal of Experimental Botany* **37**, 1599–1610.
- ALLNUT, F. C. T. & BONNER, W. D. JR. (1987a). Characterization of iron uptake from ferrioxamate B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology* **85**, 746–750.
- ALLNUT, F. C. T. & BONNER, W. D. JR. (1987b). Evaluation of reductive release as a mechanism of iron uptake from ferrioxamate B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology* **85**, 751–756.
- BIENFAIT, F. (1987). Biochemical basis of iron efficiency reactions in plants. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals* (Ed. by G. Winkelmann, D. van der Helm & J. B. Neilands), pp. 339–349. VCH Verlagsgesellschaft MbH, Weinheim.
- BISHOP, P. E., PREMAMKUMAR, R., JOERGER, R. D., JACOBSON, M. R., DALTON, D. A., CHISNELL, J. R. & WOLFINGER, E. D. (1988). Alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. In *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Ed. by H. Bothe, F. J. de Bruijn & W. E. Newton), pp. 71–79. Gustav Fischer, Stuttgart.
- BLEDSE, C. S. & RYGIEWICZ, R. T. (1986). Ectomycorrhizas affect ionic balance during ammonium uptake by Douglas Fir roots. *New Phytologist* **102**, 445–454.
- BODDEY, R. M. (1987). Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Gramineae. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* **6**, 209–266.
- BOSTON, H. L., ADAMS, M. S. & PIENKOWSKI, T. P. (1987a). Utilization of sediment CO_2 by selected North American isoeutids. *Annals of Botany* **60**, 485–494.
- BOSTON, H. L., ADAMS, M. S. & PIENKOWSKI, T. P. (1987b). Models of the use of root-zone CO_2 by selected North American isoeutids. *Annals of Botany* **60**, 495–503.
- BREEZE, V. G. & HOPPER, M. J. (1987). Plant uptake of phosphate by plants from flowing solution culture. IV. Effect of phosphate concentration on the growth of *Trifolium repens* L. supplied with nitrate, or dependent upon symbiotically fixed nitrogen. *Journal of Experimental Botany* **38**, 618–630.
- BROWSE, J. A., BROWN, J. M. A. & DROMGOOLE, F. I. (1980). Malate synthesis and metabolism during photosynthesis in *Egeria densa* Planch. *Aquatic Botany* **8**, 295–305.
- CAMERON, H. J. & JULIAN, G. R. (1988). Utilization of hydroxyapatite by cyanobacteria as their sole source of phosphate and calcium. *Plant and Soil* **109**, 123–124.
- CHAN, Y.-K., PAU, R., ROBSON, R. L. & MILLER, R. W. (1988). Expression of unconventional nitrogenase reactions in several nitrogen-fixing bacteria. In *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Ed. by H. Bothe, F. J. de Bruijn & W. E. Newton), p. 88. Gustav Fischer, Stuttgart.
- CHRISTELLER, J. T., LAING, W. A. & SUTTON, W. D. (1977). Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. I. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiology* **60**, 47–50.
- CLARK, R. B. (1984). Physiological aspects of calcium, magnesium

- and molybdenum deficiencies in plants. In: *Soil Acidity and Liming* (Ed. by F. Adams), 2nd edn, pp. 99–170. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
- CLARKE, S. E., STUART, J. & SANDERS-LOEHR, J. (1987). Induction of siderophore activity in *Anabaena* spp. and its moderation of copper toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 917–922.
- COKER, G. T. III & SCHUBERT, K. R. (1981). Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules. I. Characteristics and comparison with N₂ fixation and composition of xylem exudate during early nodule development. *Plant Physiology* **67**, 691–696.
- COOKSON, C., HUGHES, H. & COOMBS, J. (1980). Effects of combined N on anaplerotic C assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **148**, 338–345.
- CRIDDLE, R. S., WARD, M. R. & HUFFAKER, R. C. (1988). Nitrogen uptake by wheat seedlings, interactive effects of four nitrogen sources: NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺ and urea. *Plant Physiology* **86**, 166–175.
- CROWLEY, D. E., REID, C. P. P. & SZANISZLO, P. J. (1987). Microbial siderophores as iron sources for plants. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals* (Ed. by G. Winkelmann, D. van der Helm & J. B. Neilands), pp. 375–286. VCH Verlags-gesellschaft MbH, Weinheim.
- DAY, D. A. & MANNIX, M. (1988). Malate oxidation by soybean root nodule mitochondria and the possible consequences for nitrogen fixation. *Plant Physiology and Biochemistry* **26**, 567–573.
- DIJKSHOORN, W. (1969). The relation of growth to the chief ionic constituents of the plant. *British Ecological Society Symposium* **9**, 201–213.
- DILWORTH, M. J. & GLENN, A. R. (1985). Transport in *Rhizobium* and its significance to the legume symbiosis. In: *Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism* (Ed. by P. W. Ludden & J. E. Burris), pp. 53–61. Elsevier, New York.
- DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. (1987). *Nitrogen-fixing Bacteria in Non-leguminous Crop Plants*. Science Tech. Publishers, Springer Verlag, Madison, Wisconsin and Berlin.
- EADY, R. R., ROBSON, R. L., PAU, R. N., WOODLEY, P., LOWE, D. J., MILLER, R. W., THORNLEY, R. N. F., SMITH, B. E., GORMAC, C., FISHER, K., ELDRIDGE, M. & BERGSTRÖM, J. (1988). The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. In: *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Ed. by H. Bothe, F. J. de Bruijn & W. E. Newton), pp. 81–86. Gustav Fischer, Stuttgart.
- FISCHER, W. R., FLESSA, H. & SCHALLER, G. (1989). pH values and redox potentials in microsites of the rhizosphere. *Zeitschrift für Pflanzenzucht und Bodenkund* **152**, 191–195.
- FRANCO, A. A. & MUNNS, D. N. (1981). Response to *Phaseolus vulgaris* L. to molybdenum under acid conditions. *Soil Science Society of America Journal* **45**, 1144–1148.
- GOODWIN, T. W. & MERCER, E. I. (1983). *Introduction to Plant Biochemistry*, 2nd edn. Pergamon Press, Oxford.
- HARLEY, J. L. & SMITH, S. E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- HAUTER, R. & STEFFENS, D. (1985). Einfluss einer mineralischen und symbiotischen stickstoffernährung auf protonen abgabe der Wurzeln, phosphataufnahme von rotkeel. *Zeitschrift für Pflanzenzucht und Bodenkund* **148**, 633–646.
- HAYNES, R. J. (1986). *Mineral Nitrogen in the Plant-Soil System*. Academic Press, Orlando.
- HELYAR, K. R. (1976). Nitrogen cycling and soil acidification. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **42**, 217–224.
- HENTSCHEL, G. (1970). The uptake of ¹⁵N-labelled urea by bush bean; In: *Nitrogen Nutrition of the Plant* (Ed. by E. A. Kirkby), pp. 30–34. University of Leeds, England.
- HILLS, S. (1988). How is nitrogenase regulated by oxygen? *FEMS Microbiology Reviews* **54**, 111–130.
- HOWARTH, R. W., MARINO, R. & COLE, J. J. (1988). Nitrogen fixation in freshwater, estuarine and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnology and Oceanography* **33**, 688–701.
- HOWARTH, R. W., MARINO, R., LANE, J. & COLE, J. J. (1988). Nitrogen fixation in freshwater, estuarine and marine ecosystems. I. Rates and importance. *Limnology and Oceanography* **33**, 669–687.
- ISRAEL, D. W. (1987). Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology* **84**, 835–840.
- ISRAEL, D. W. & JACKSON, W. A. (1978). The influence of nitrogen nutrition on ion uptake and translocation by leguminous plants. In: *Mineral Nutrition of Legumes in Tropical and Subtropical Soils* (Ed. by C. S. Andrew & E. J. Kamprath), pp. 113–129. CSIRO, Melbourne.
- ISRAEL, D. W. & JACKSON, W. A. (1982). Ion balance, uptake and transport processes in N₂-fixing and urea-dependent soybean plants. *Plant Physiology* **69**, 171–178.
- ISRAEL, D. W. & RUFTY, T. W. JR. (1988). Influence of phosphorus nutrition on phosphorus and nitrogen utilization efficiencies and associated physiological responses in soybean. *Crop Science* **28**, 954–960.
- JACOB-NETO, J. & FRANCO, A. A. (1989). Nivel critico de Mo nos nodulos de feijoeiro. *Turrialba* (in the press).
- JACOB-NETO, J., THOMAS, R. J. & FRANCO, A. A. (1988). Variacao estacional da concentracao de molibdenio nos nodulos e demais partes de planta de feijoeiro. (*Phaseolus vulgaris* L.). *Turrialba* **38**, 51–58.
- JARVIS, M. C., FORSYTH, W. & DUNCAN, H. J. (1988). A survey of the pectic content of non-lignified monocot cell walls. *Plant Physiology* **88**, 309–314.
- JARVIS, S. C. & HATCH, D. J. (1985). Rates of hydrogen ion efflux by nodulated legumes grown in flowing solution culture with continuous pH monitoring and adjustment. *Annals of Botany* **55**, 41–51.
- JESCHKE, W. D., ATKINS, C. A. & PATE, J. S. (1985). Ion circulation via phloem and xylem between root and shoot of nodulated white lupin. *Journal of Plant Physiology* **117**, 319–330.
- JESCHKE, W. D., PATE, J. S. & ATKINS, C. A. (1986). Effect of NaCl salinity on growth, ion transport and ion storage in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Ultra). *Journal of Plant Physiology* **124**, 257–274.
- JOERGER, R. D. & BISHOP, P. E. (1988). Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *Critical Reviews in Microbiology* **16**, 1–14.
- KENNEDY, I. R. (1986). *Acid Rain. The Impact of the Environment on Nitrogen and Sulphur Cycling*. Research Studies Press, Chichester.
- KENNEDY, I. R. (1988). The molecular basis of symbiotic nitrogen fixation. In: *Microbiology in Action* (Ed. by W. G. Durell & I. R. Kennedy), pp. 143–155. Research Studies Press, Chichester.
- KENTEMICH, T., DANNEBERG, G., HUNDESCHAGEN, B. & BOTHE, H. (1988). The occurrence of the alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. In: *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Ed. by H. Bothe, F. J. de Bruijn & W. E. Newton), p. 89. Gustav Fischer, Stuttgart.
- KINZEL, M. (1989). Calcium in the vacuoles and cell walls of plant tissue. *Flora* **182**, 99–125.
- KIRKBY, E. A. & MENGEL, K. (1967). Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. *Plant Physiology* **42**, 6–14.
- KIRKBY, E. A. & MENGEL, K. (1970). Preliminary observations on the effect of urea nutrition on the growth and metabolism of sunflower plants. In: *Nitrogen Nutrition of the Plant* (Ed. by E. A. Kirkby), pp. 35–38. The University of Leeds.
- KLEIN, R. M., ADAMOWICZ, S., PERKINS, T. D. & LIEDEKER, H. (1988). Precipitation as a source of assimilable nitrogen: a historical survey. *American Journal of Botany* **75**, 929–937.
- LAWRIE, A. C. & WHEELER, C. T. (1975a). Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon I. Plant growth and metabolism of photosynthetic assimilates. *New Phytologist* **74**, 429–436.
- LAWRIE, A. C. & WHEELER, C. T. (1975b). Nitrogen fixation in the root nodule of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon. II. The dark fixation of carbon dioxide. *New Phytologist* **74**, 437–447.
- LUKENS, L. N. & BUCHANAN, J. M. (1959a). Biosynthesis of purines XXIII. Enzymic synthesis of 1(5-amino-1-ribosyl-4-imidazolyl-carbonyl)-L-aspartic acid-5'-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **234**, 1791–1798.
- LUKENS, L. M. & BUCHANAN, J. M. (1959b). Biosynthesis of purines XXIV. Enzymic synthesis of 5-amino-1-ribosyl-4-imidazole carboxylic acid 5'-phosphate from 5-amino-1-ribosyl-imidazole 5'-phosphate and CO₂. *Journal of Biological Chemistry* **234**, 1799–1805.

- LUTHER, H. (1949). Vorschlag zu einer ökologischen Grundeinteilung der Hydrophyten. *Acta Botanica Fennica* **44**, 1-15.
- MAAS, F. M., VAN DE WETERING, D. A. M., VAN BEUSICHEM, M. L. & BIENFAIT, H. F. (1988). Characterization of phloem-iron and its possible role in the regulation of Fe-efficiency reactions. *Plant Physiology* **87**, 167-171.
- MANAHAN, D. T., WRIGHT, S. H., STEPHENS, G. C. & RICE, M. A. (1982). Transport of dissolved amino acids by the mussel, *Mytilus edulis*: demonstration of net uptake from natural seawater. *Science* **215**, 1253-1255.
- MANLEY, S. L. (1981). Iron uptake and translocation by *Macrocystis pyrifera*. *Plant Physiology* **68**, 9145-918.
- MARSCHNER, H. (1986). *Mineral Nutrition in Higher Plants*. Academic Press, London.
- MARSCHNER, H. & RÖHMELT, V. (1983). In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **111**, 241-245.
- MAXWELL, C. A., VANCE, C. P., HEICHEL, G. H. & STADE, S. (1984). CO₂ fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and partitioning of ¹⁴C to the plant. *Crop Science* **25**, 257-264.
- MCINROY, S. G., ANDREWS, M. & SPRENT, J. I. (1988). Growth, nodulation and nitrate reductase activity in the aquatic legume *Neptunia plena* (L.). Benth at different external NO₃⁻ concentrations. *Aquatic Botany* **30**, 379-388.
- MECKS, J. C., ENDERLIN, C. S., JOSEPH, C. M., CHAPMAN, J. S. & LOLLAR, M. W. L. (1985). Fixation of [¹⁵N]N₂ and transfer of fixed nitrogen in the *Anthoceros-Nostoc* symbiotic association. *Planta* **164**, 406-414.
- MECKS, J. C., STEINBERG, N. A., ENDERLIN, C. S., JOSEPH, C. M. & PETERS, G. A. (1987). *Azolla-Anabaena* relationship. XIII. Fixation of [¹⁵N]N₂. *Plant Physiology* **84**, 883-886.
- MENGEL, K. & STEFFENS, D. (1982). Beziehungen zwischen Kationen/Anionen Aufnahme von Rotklee und protonenabscheidung der Wurzeln. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkund* **145**, 229-236.
- MILLER, A. L. (1986). *The electrical control of root development*. PhD Thesis, University of Dundee.
- MILLER, S. S., BOYLAN, K. L. M. & VANCE, C. P. (1987). Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiology* **85**, 283-289.
- MILLER, A. L. & GOW, N. A. R. (1989). Correlation between profile of ion-current circulation and root development. *Physiologia Plantarum* **75**, 102-108.
- MILLER, A. L., RAVEN, J. A., SPRENT, J. I. & WEISENSEEL, M. H. (1986). Endogenous ion currents traverse growing roots and root hairs of *Trifolium repens*. *Plant, Cell and Environment* **9**, 79-83.
- MINCHIN, F. R., SUMMERFIELD, R. J., HADLEY, P., ROBERTS, E. H. & RAWSTHORNE, S. (1981). Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes: a review. *Plant, Cell and Environment* **4**, 5-26.
- MOBLEY, H. L. T. & HAUSINGER, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterisation. *Microbiological Reviews* **53**, 85-108.
- MODI, M., SHAH, K. S. & MODI, V. V. (1985). Isolation and characterization of a catechol-like siderophore from cowpea *Rhizobium* RA-1. *Archives of Microbiology* **141**, 156-158.
- MOORBY, H., WHITE, R. E. & NYE, P. H. (1988). The influence of phosphate nutrition on H ion efflux from roots of young rape plants. *Plant and Soil* **105**, 247-256.
- MUNNS, D. N. & FRANCO, A. A. (1982). Soil constraints to legume production. In *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture* (Ed. by P. H. Graham & S. C. Harris), pp. 103-152. CIAT, California.
- NAMBIAR, P. T. L. & SIVARAMAKRISHNAN, S. (1987). Detection and assay of siderophores in cowpea rhizobia (*Bradyrhizobium*) using radioactive Fe (⁵⁹Fe). *Letters in Applied Microbiology* **4**, 37-40.
- NEVES, M. C. P. & HUNGRIA, M. (1987). The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *C.R.C. Critical Reviews in Plant Science* **6**, 267-321.
- NOMOTO, K., SUGIURA, U. & TAKAGI, S.-I. (1987). Mugineic acids, studies on phytosiderophores. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals* (Ed. by G. Winkelmann, D. van der Helm & J. B. Neilands), pp. 401-425. VCH Verlagsgesellschaft MbH, Weinheim.
- NYATSANGA, T. & PIERRE, W. H. (1973). Effect of nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agronomy Journal* **65**, 936-940.
- PATE, J. S. & ATKINS, C. A. (1983). Nitrogen uptake, transport and utilization. In: *Nitrogen Fixation*. vol. 3: *Legumes* (Ed. by W. J. Broughton), pp. 245-298. Oxford University Press, USA.
- PATE, J. S., ATKINS, C. A. & RAINBIRD, R. M. (1981). Theoretical and experimental costings of nitrogen fixation and related processes in the nodules of legumes. In: *Current Perspectives in Nitrogen Metabolism* (Ed. by A. H. Gibson & W. E. Newton), pp. 105-116. Australian Academy of Science, Canberra.
- PATE, J. S., GUNNING, B. E. S. & BRIARTY, L. G. (1969). Ultra-structure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. *Planta* **85**, 11-34.
- PETERS, G. A., KAPLAN, D., MECKS, J. C., BUZBY, K. M., MARSCH, B. H. & CORBIN, J. L. (1985). Aspects of nitrogen and carbon interchange in the *Azolla-Anabaena* Symbiosis. In: *Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism* (Ed. by P. W. Ludden & J. E. Burris), pp. 213-222. Elsevier, New York.
- PETERS, G. A. & MECKS, J. C. (1989). The *Azolla-Anabaena* symbiosis: basic biology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 193-210.
- PETERS, G. A., TOIA, R. E. JR., EVANS, W. R., CRIST, D. K., MAYNE, B. C. & POOLE, R. E. (1980). Characterization and comparisons of five N₂-fixing *Azolla-Anabaena* associations. I. Optimization of growth conditions for biomass increase and N content in a controlled environment. *Plant, Cell and Environment* **3**, 261-269.
- POSTGATE, J. R. & EADY, R. R. (1988). The evolution of biological nitrogen fixation. In: *Nitrogen Fixation: Hundred Years After* (Ed. by H. Bothe, F. J. de Bruijn & W. E. Newton), pp. 31-40. Gustav Fischer, Stuttgart.
- PRICE, N. M. & HARGREAVES, P. J. (1988). Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography* **33**, 528-537.
- PRINS, H. B. A. & ZANSTRA, P. E. (1985). Bicarbonate assimilation in aquatic angiosperms: significance of the apoplast and unstirred layer. *Verheir International Verein Limnology* **22**, 2962-2967.
- QUISPEL, A., VAN BRUSSEL, A. A. N., HOOYMANS, J. J. M., PRIEM, W. J. E. & STAAL, H. J. M. (1985). Intersymbiotic transport processes in nitrogen-fixing root nodules. In: *Nitrogen fixation and CO₂ Metabolism* (Ed. by P. W. Ludden & J. E. Burris), pp. 193-202. Elsevier, New York.
- RAVEN, J. A. (1977). H⁺ and Ca²⁺ in phloem and symplast: relation of relative immobility of the ions to the cytoplasmic nature of the transport paths. *New Phytologist* **79**, 465-480.
- RAVEN, J. A. (1980). Nutrient transport in micro-algae. *Advances in Microbial Physiology* **21**, 47-226.
- RAVEN, J. A. (1985a). pH regulation in plants. *Science Progress (Oxford)* **69**, 485-509.
- RAVEN, J. A. (1985b). Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytologist* **101**, 25-77.
- RAVEN, J. A. (1986). Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants? *New Phytologist* **104**, 175-206.
- RAVEN, J. A. (1987a). The role of vacuoles. *New Phytologist* **106**, 357-422.
- RAVEN, J. A. (1987b). Biochemistry, biophysics and physiology of chlorophyll b-containing algae: implications for taxonomy and phylogeny. *Progress in Phycological Research* **5**, 1-122.
- RAVEN, J. A. (1988a). Acquisition of nitrogen by the shoots of land plants: its occurrence and implications for acid-base regulation. *New Phytologist* **109**, 1-20.
- RAVEN, J. A. (1988b). The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. *New Phytologist* **109**, 279-287.
- RAVEN, J. A. & DE MICHELIS, M. I. (1979). Acid-base regulation during nitrate assimilation in *Hydrodictyon africanum*. *Plant, Cell and Environment* **2**, 245-257.
- RAVEN, J. A. & DE MICHELIS, M. I. (1980). Acid-base regulation during ammonium assimilation in *Hydrodictyon africanum*. *Plant, Cell and Environment* **3**, 299-311.
- RAVEN, J. A., HANDLEY, L. L., MACFARLANE, J. J., MCINROY, S., MCKENZIE, L., RICHARDS, J. H. & SAMUELSSON, G. (1988). The role of CO₂ uptake by roots and CAM in the acquisition of inorganic C by plants of the isoetid life-form: a review, with

- new data on *Eriocaulon decangulare* L. *New Phytologist* **108**, 125–148.
- RAVEN, J. A. & SMITH, F. A. (1976). Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist* **76**, 415–431.
- RAVEN, J. A. & SMITH, F. A. (1982). Solute transport at the plasmalemma and the early evolution of cells. *Biosystems* **15**, 13–26.
- RAVEN, J. A., SMITH, S. E. & SMITH, F. A. (1978). Ammonium assimilation and the role of mycorrhizas in climax communities in Scotland. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* **43**, 27–35.
- RAVEN, J. A., SMITH, F. A. & SMITH, S. E. (1980). Ions and osmoregulation. In: *Genetic Engineering of Osmoregulation: Impact on Plant Productivity for Food, Chemicals and Energy* (Ed. by D. W. Rains, R. C. Valentine & A. Hollaender), pp. 101–118. Plenum Press, New York.
- RAVEN, J. A. & SPRENT, J. I. (1989). Phototrophy, diazotrophy and palaeoatmospheres: biological catalysis and the H, C, N and O cycles. *Journal of the Geological Society, London*, **146**, 161–170.
- RAVEN, J. A., SPRENT, J. I., MCINROY, S. G. & HAY, G. T. (1989). Water balance of N₂-fixing root nodules; can phloem and xylem transport explain it? *Plant, Cell and Environment* **12**, 683–688.
- RAWSTHORNE, S., MINCHIN, F. R., SOMMERFIELD, R. J., COOKSON, C. & COOMBS, J. (1980). Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry* **19**, 341–355.
- READ, D. J. (1983). The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. In: *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium* (Ed. by D. H. Jennings & A. D. M. Rayner), pp. 215–240. Cambridge University Press.
- ROMHELD, V. (1987). Existence of two different strategies for the acquisition of iron and higher plants. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals* (Ed. by G. Winkelmänn, D. van der Helm & J. B. Neilands), pp. 353–374. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- SCHOBERT, C., KOCKENBERGER, W. & KOMOR, E. (1988). Uptake of amino acids by plants from soil: a comparative study with castor bean seedlings under natural and axenic soil conditions. *Plant and Soil* **109**, 181–188.
- SCHOBERT, C. & KOMOR, E. (1987). Amino acid uptake by *Ricinus communis* roots: characterization and physiological significance. *Plant, Cell and Environment* **10**, 493–500.
- SHEEHY, J. E. & TUORNILEY, J. H. M. (1988). Oxygen, the Nif gene, nodule structure and the initiation of N₂ fixation. *Annals of Botany* **61**, 605–609.
- SMITH, A. M. (1985). Capacity for fermentation in roots and *Rhizobium* nodules in *Pisum sativum* L. *Planta* **66**, 264–270.
- SMITH, M. J. & NEILANDS, J. R. (1984). Rhizobactin, a siderophore from *Rhizobium meliloti*. *Journal of Plant Nutrition* **7**, 449–458.
- SPRENT, J. I. (1979). *The Biology of Nitrogen-Fixing Plants*. McGraw-Hill, Maidenhead.
- SPRENT, J. I. (1987). *The Ecology of the Nitrogen Cycle*. University Press, Cambridge.
- SPRENT, J. I., GIANNAKIS, C. & WALLACE, W. (1987). Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. *Journal of Experimental Botany* **38**, 1121–1128.
- SPRENT, J. I. & RAVEN, J. A. (1985). Evolution of nitrogen fixing symbioses. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **83B**, 215–237.
- STREETER, J. G. (1979). Allantoin and allantoinic acid in tissues and stem exudates from field-grown soybean plants. *Plant Physiology* **63**, 478–480.
- THOMAS, R. J., LOGAN, K. A. B., IRONSIDE, A. D. & BOLTON, G. R. (1988). Transformations and fate of sheep urine-N applied to an upland U.K. pasture at different times during the growing season. *Plant and Soil* **107**, 173–181.
- TREERY, M., MARSHNER, H. & ROMHELD, V. (1989). Mobilisation of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial and synthetic metal chelators. *Plant and Soil* **114**, 217–226.
- TROELSTRA, S. R., BLACQUIERE, T., WAGENAAR, R. & VAN DIJK, C. (1987). Ionic balance, proton efflux, nitrate reductase activity and growth of *Hippophae rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides* as influenced by combined-N nutrition or N-fixation. *Plant and Soil* **103**, 169–183.
- TROELSTRA, S. R., VAN DIJK, C. & BLACQUIERE, T. (1985). Effects of N source on proton excretion, ionic balance and growth of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner: comparison of N₂ fixation with NO₃ and NH₄. *Plant and Soil* **84**, 361–385.
- VAN BEUSICHEM, M. L. (1981). Nutrient absorption by pea plants during dinitrogen fixation. I. Comparison with nitrate nutrition. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **29**, 259–272.
- VAN BEUSICHEM, M. L. (1982). Nutrient absorption by pea plants during dinitrogen fixation. 2. Effects of ambient acidity and temperature. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **30**, 85–97.
- VAN BEUSICHEM, M. L. (1983). Xylary charge distribution and nitrogen transport in *Pisum sativum* L. during dinitrogen fixation or nitrate nutrition. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **109**, 449–458.
- VAN BEUSICHEM, M. L., BAAS, R., KIRKBY, E. A. & NELEMANS, J. A. (1985). Intracellular pH regulation in shoot and roots of *Ricinus communis*. *Plant Physiology* **78**, 768–773.
- VAN BEUSICHEM, M. L. & NEETESON, J. J. (1982). Urea nutrition of young maize and sugar beet plants with emphasis on ionic balance and vascular transport of nitrogenous compounds. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **30**, 317–330.
- VAN BEUSICHEM, M. L. & VAN LOON, L. J. M. (1978). Nutrient-element balance in the maize plant in relation to ammonium, urea or nitrate nutrition. *Proceedings of the 11th Congress of the ISSS (Edmonton)*, vol. 1, pp. 307–308.
- VANCE, C. P., STADE, S. & MAXWELL, C. A. (1983). Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. I. Association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids. *Plant Physiology* **72**, 469–473.
- VIGUE, J. T., HARPER, J. E., HAGEMAN, H. R. & PETERS, D. B. (1977). Nodulation of soybeans grown hydroponically on urea. *Crop Science* **17**, 169–172.
- WACQUANT, J.-P. (1974). *Recherches sur les propriétés d'absorption cationique de racines (rôle physiologique et importance écologique)*. Ph.D. Thesis, Université des Sciences et Techniques, Languedoc, Montpellier.
- WALKER, N. A. (1983). The uptake of inorganic carbon by freshwater plants. *Plant, Cell and Environment* **6**, 323–238.
- WALKER, N. A., SMITH, F. A. & CATHERS, I. R. (1980). Bicarbonate assimilation by freshwater charophytes and higher plants. I. Membrane transport of bicarbonate ions is not proven. *Journal of Membrane Biology* **57**, 51–58.
- WALLACE, A. (1982). Effect of nitrogen fertilizer and nodulation on lime-induced chlorosis in soybeans. *Journal of Plant Nutrition* **5**, 363–368.
- WEISENSEELE, M. H., DORN, A. & JAFFE, L. F. (1979). Natural H⁺ currents traverse growing roots and root hairs of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology* **64**, 512–518.
- WHITE, P. F. & ROBSON, A. D. (1989). Rhizosphere acidification and Fe³⁺ reduction in lupins and peas: iron deficiency in lupins is not due to a poor ability to reduce Fe³⁺. *Plant and Soil* **119**, 163–175.
- WILLIAMS, S. L. (1984). Uptake of sediment ammonium and translocation in a marine green macroalga *Caulerpa cupressoids*. *Limnology and Oceanography* **29**, 374–379.
- WILSON, M. R., O'DONOHUE, S. I. & WALKER, N. A. (1988). The transport and metabolism of urea in *Chara australis* III. Two specific transport systems. *Journal of Experimental Botany* **39**, 763–774.
- WILSON, M. R. & WALKER, N. A. (1988a). The transport and metabolism of urea in *Chara australis*. I. Passive diffusion, specific transport and metabolism of urea, thiourea and methylurea. *Journal of Experimental Botany* **39**, 739–751.
- WILSON, M. R. & WALKER, N. A. (1988b). The transport and metabolism of urea in *Chara australis*. II. Urease and the distribution of transported urea. *Journal of Experimental Botany* **39**, 753–761.
- WONG, P. P. & EVANS, H. J. (1971). Poly-β-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiology* **47**, 750–755.