



<https://doi.org/10.15202/1981996x.2017v11n1p57>

EFEITOS DO NITRATO E AMÔNIO APLICADOS VIA FOLIAR SOBRE NA EXTRUSÃO DE H⁺/OH⁻ NA RIZOSFERA E NA NODULAÇÃO DO FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS*)

EFFECTS OF NITRATE AND AMMONIA APPLIED TO FOLIAR ON EXTRUSION OF H⁺ / OH⁻ IN RIZOSPHERE AND NODULATION OF BEAN

RICARDO ANTÔNIO TAVARES DE MACEDO

Doutor em Agronomia Fitotecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil.
rizosferaagrociencias@gmail.com

JORGE JACOB NETO

Docente na Agronomia Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil.
j.jacob@globocom

RESUMO

O nitrogênio (N) é um macronutriente essencial à sobrevivência e ao crescimento dos organismos vegetais, pois é um dos principais componentes das estruturas dos ácidos nucleicos, proteínas e clorofila, além de participar de diversos processos metabólicos da planta. Além da fixação biológica de N, o feijoeiro também pode obter o N das formas minerais nitrato e amônio. No entanto, é conhecido na ciência que estas fontes minerais promovem um efeito inibidor à nodulação e à FBN, e também provocam alterações no pH da rizosfera ao serem absorvidas pela planta. Considerando que a rizosfera das plantas supridas com fontes nítricas de N via foliar é alcalinizada e com fontes amoniacaais de N via foliar é acidificada, este trabalho objetivou avaliar o efeito das alterações de pH rizosférico (*pHR*), causadas pelo metabolismo destas duas fontes minerais de N via foliar, na produção de nódulos radiculares. Os resultados mostraram que, dentre as fontes de N mineral aplicadas via foliar, o amônio foi a fonte que mais acidificou a rizosfera e, também, promoveu os maiores impactos negativos na nodulação do feijão (*pHR* 4,15 e 14 nódulos planta⁻¹) em comparação com o nitrato (*pHR* 5,03 e 27 nódulos planta⁻¹).

Palavras chave: Balanço iônico. Nitrato. Amônio. Aplicação foliar. pH. Rizosfera. Rizóbio. Nodulação.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is a macronutrient essential to the survival and growth of plant organisms, as it is one of the main components of the structures of nucleic acids, proteins and chlorophyll, besides participating in several metabolic processes in plants. In addition to the biological N fixation, the common bean can also obtain the N of the nitrate and ammonium mineral forms. However, it is known in science that these mineral sources promote an inhibitory effect on nodulation and BNF, and also cause alterations in the pH of the rhizosphere when uptaken by the root plants. Considering that the rhizosphere of the plants supplied with nitric sources of N through the leaf is alkalized and with ammoniac sources of N via foliar is acidified, this work aimed to evaluate the effect of rhizospheric pH changes caused by the metabolism of these two mineral sources of N leaf applied, in the production of root nodules. The results showed that ammonium was the source that most acidified the rhizosphere and promoted the greatest negative impacts on bean nodulation (*pH* 4.14 and 14 plant⁻¹ nodules) in comparison with nitrate (*pHR* 5.03 and 27 plant⁻¹ nodules).

Key words: Ionic balance. Nitrate. Ammonium. Foliar application. pH. Rhizosphere.

Rizobium. Nodulation.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, entre outros, e participando de processos metabólicos envolvidos no crescimento da planta, o que o torna um elemento essencial à sobrevivência e crescimento dos organismos vegetais (MACEDO, 2003). O nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) são as formas minerais de N absorvíveis pelas plantas e, no caso de espécies como o feijoeiro, existe também o processo de fixação biológica do N_2 atmosférico (FBN) como fonte de N (HUNGRIA & KASCHUK, 2014; LEAL et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013; HUNGRIA et al., 1997).

O nitrato é absorvido ativamente, contra um gradiente de potencial eletroquímico da membrana plasmática, em um cotransporte (simporte) com prótons (MCCLURE et al., 1990). Após absorvido o nitrato pode sofrer ação das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase e ser reduzido a amônio, pode ser armazenado no vacúolo ou pode ser exportado para a parte aérea pelo xilema (SANTOS, 2006). A absorção do amônio ocorre de forma passiva, a favor de um gradiente de potencial eletroquímico da membrana, através de um transportador do tipo uniporte (SANTOS, 2006). O amônio é incorporado à estrutura orgânica da planta (assimilado) através da formação inicial de glutamina, processo comum para o amônio proveniente da absorção (amônio mineral), da redução do nitrato ou da FBN. A síntese de glutamina é intermediada pela enzima glutamina sintetase (GS), onde o amônio é ligado ao grupo carboxílico do glutamato usando energia fornecida pelo ATP (SOUZA et al., 2002). A assimilação do amônio é finalizada com a produção de 2 glutamatos a partir da glutamina e do α -cetoglutarato, através da ação da enzima glutamato oxo-glutarato amônio transferase (GOGAT) e gasto de poder redutor.

Já a FBN, ocorre através da interação entre a planta fixadora e bactérias genericamente denominadas rizóbio, que quebra a tripla ligação do N_2 atmosférico por meio da enzima nitrogenase, transformando-o em amônio no interior dos nódulos radiculares, e a planta fornece

fotoassimilados como fonte de energia para o desenvolvimento e manutenção dos nódulos (HUNGRIA & KASCHUK, 2014; MAHON, 1979). Os primeiros passos da FBN envolvem diversos processos, onde o rizóbio necessita, antes de tudo, aproximar e colonizar a rizosfera (microrregião ao redor da raiz) para iniciar a formação dos nódulos nas raízes. A planta exsuda na rizosfera compostos orgânicos, como os flavonóides no caso do feijoeiro (ARAÚJO et al., 1996), para atrair as bactérias por quimiotactismo (DROZDOWICZ, 1991). As bactérias se aderem aos pêlos radiculares e compostos químicos induzem à transcrição de genes de nodulação nas bactérias, conduzindo à síntese dos fatores Nod, moléculas de lipoquitooligosacarídeos responsáveis pelo reconhecimento entre bactéria e a planta hospedeira (LIMPENS & BISSELING, 2003). Os fatores Nod induzem as várias respostas na planta, como o aumento da divisão celular no córtex radicular, deformação dos pêlos radiculares e a transcrição de genes relacionados à formação do nódulo (LIMPENS & BISSELING, 2003; FISHER & LONG, 1992). Com o nódulo formado, as bactérias mudam de forma e tamanho e perdem a motilidade, passando a se chamar bacteróides e fixar o N_2 atmosférico. Embora o N seja um nutriente essencial às plantas, altas concentrações de N mineral no meio de crescimento da planta inibem a nodulação e a FBN (COLLINO et al., 2015; NOVA-FRANCO et al., 2015; REID et al., 2011; FERGUSON et al., 2013; JACOB et al., 1998; BANDYOPADHYAY et al., 1996; DENISON & HARTE, 1995; DUSHA et al., 1989; TANNER & ANDERSON, 1964).

Dentre os mecanismos inibitórios à nodulação devido às altas concentrações de N, uma das razões pode estar associada às alterações de pH ocorridas na rizosfera, considerando que o rizóbio apresenta alta sensibilidade às condições inadequadas de pH no solo e na rizosfera (FARIAS et al., 2016; FERGUSON & GRESSHOFF, 2015; FERGUSON et al., 2013; CAMPANHARO, 2006; VINUESA et al., 2003; ANDRADE et al., 2002; MIGUEL & MOREIRA, 2001; RIBEIRO JÚNIOR et al., 1987).

As variações no pH rizosférico em plantas absorvendo N mineral ocorrem devido a um processo chamado balanço iônico vegetal (MC-

NEAR JR., 2013, MARSCHNER, 2012, SHEN et al., 2012; RAVEN et al., 1990). Este processo está fundamentado na necessidade da planta em compensar as cargas elétricas e em regular o pH celular, cujas variações internas estão relacionadas ao influxo de íons de diferentes cargas no citossol. O controle do pH citoplasmático, para que seja mantido em valores próximos a 7,3, é realizado por um sistema denominado "pH-stat", que conta com a manutenção do pool de ácidos orgânicos que são carboxilados ou descarboxilados no interior da célula e está associado às trocas de prótons com o meio externo com a participação das H⁺-ATPases (HINSINGER et al., 2003).

Neste sentido, a geração de acidez ou alcalinidade na rizosfera é diretamente influenciada pela absorção de íons e ocorre pela absorção desigual de nutrientes catiônicos em relação aos aniônicos, quando expressos em equivalências de cargas (HAYNES, 1990). Como o N é o único o nutriente mineral absorvido como cátion (amônio) e ânion (nitrato), e por ser demandado em altas quantidades, a absorção destas duas formas de N promovem a acidificação e a alcalinização da rizosfera, respectivamente (MARSCHNER, 2012; RODRIGUEZ et al., 2008; CARVALHO et al., 2005; HINSINGER et al., 2003; JACOB NETO, 2003; RAVEN et al., 1990). É importante ressaltar que a FBN, assim como o amônio mineral, também gera acidificação da rizosfera, cuja explicação também está baseada na necessidade da planta em equilibrar eletroquimicamente o meio intracelular. Neste caso, ao metabolizarem biologicamente o N₂ atmosférico, que apesar de ser uma molécula neutra em relação à carga, as plantas absorvem do solo mais cátions do que ânions e, conseqüentemente, liberam na rizosfera excessos de cargas positivas em relação às negativas, gerando acidificação neste ambiente (TANG et al., 1997; ALLEN et al., 1988; JARVIS & ROBSON, 1983).

Considerando que o balanço iônico vegetal envolve a necessidade da planta em excretar na rizosfera excessos de cargas elétricas para regular-se internamente, a planta como um todo, entende-se que a aplicação de N via foliar também pode alterar o pH da rizosfera, especialmente considerando que no metabolismo do N na planta existe uma estreita relação entre as folhas e as raízes, estabelecida graças às translocações existentes entre estes dois órgãos

da planta (GASSER et al., 2015). Neste sentido, diversas pesquisas indicam que produtos aplicados ou metabolizados nas folhas podem ser translocados para as raízes, resultando em alterações das propriedades químicas e biológicas da rizosfera (IMPARATO et al., 2016; GASSER et al., 2015; LANE et al., 2012; SCAGEL, 2008; YILDIRIM et al., 2007; VRANY, 1974; VRANY, 1972; BEN ZIONI et al., 1971; RAMACHANDRA REDDY, 1968; RAMACHANDRA REDDY, 1959; HALLECK & COCHRANE, 1950). Pesquisadores da área de microbiologia, por exemplo, verificaram a possibilidade de modificar a dinâmica microbiana da rizosfera através da aplicação foliar de produtos como fungicidas (HALLECK & COCHRANE, 1950), micronutrientes (RAMACHANDRA REDDY, 1968) e ureia (VRANY, 1974; RAMACHANDRA REDDY, 1959). Mais recentemente cientistas observaram que o herbicida glifosato aplicado nas folhas também altera as condições químicas da rizosfera e a atividade microbiológica nesta região (IMPARATO et al., 2016; LANE et al., 2012).

Na nutrição nitrogenada, as inter-relações entre folhas e raízes estão demonstradas no modelo proposto por BEN ZIONI et al. (1971) para plantas de soja crescidas com nitrato. Após o metabolismo foliar, o malato produzido na folha com o uso da OH⁻ resultante da redução do nitrato é transportado pelo floema, acompanhado de K⁺, para ser descarboxilado na raiz com a produção de HCO₃⁻, que pode ser liberado na rizosfera alcalinizando-a (TOURAINNE et al., 1992). No modelo de BEN ZIONI et al. (1971), o HCO₃⁻ produzido na raiz é trocado por um novo nitrato, que é transportado para a parte aérea pelo xilema, também na presença de K⁺, estabelecendo-se assim um processo de redução de nitrato nas folhas controlado pela absorção de nitrato nas raízes. De acordo com SCAGEL (2008), a aplicação de ureia via foliar pode alterar a exsudação pelas raízes e, conseqüentemente, alterar também o pH da rizosfera (GASSER et al., 2015) e a disponibilidade de nutrientes (YILDIRIM et al., 2007). Desta mesma maneira, no trabalho de VRANY (1972) a aplicação de ureia via foliar em plantas de trigo cultivadas em um solo contaminado pelo fungo *Fusarium sp.* promoveu alterações químicas na rizosfera, que resultou em impactos nas populações microbiológicas de fungos e bactérias desta região.

Considerando que o rizóbio que nodula o feijoeiro é sensível às condições inadequadas de pH na rizosfera, e que a aplicação via foliar das diferentes fontes minerais de N podem causar diferentes alterações no pH da rizosfera, local onde o rizóbio necessita aproximar-se e colonizar para formar nódulos, este trabalho objetivou avaliar a nodulação do feijoeiro suprido com diferentes fontes de N via foliar.

2 METODOLOGIA

2.1 Local de crescimento das plantas e preparo das sementes

Foram realizados 2 experimentos em câmara de crescimento instalada no Laboratório de Química da Rizosfera do Instituto de Agronomia da UFRRJ, sob iluminação com lâmpadas incandescentes e fluorescentes, taxa de luminosidade média de 400 Lux e fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro). As paredes internas foram revestidas com papel alumínio e a temperatura foi constantemente controlada na faixa de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com o uso de condicionador de ar. As sementes de feijão da cultivar Ouro Negro foram padronizadas por tamanho e inoculadas com inoculante turfoso produzido pela Embrapa Agrobiologia contendo em torno de 10^8 células g^{-1} das estirpes BR-322 e BR-520 de *Rhizobium tropici*, com a inoculação feita no mesmo dia da semeadura. Foi feita uma pasta de inoculante com água destilada, aplicada de forma a recobrir toda a superfície das sementes, e em seguida as sementes foram conduzidas à secagem na sombra sob temperatura ambiente. No experimento 1 o feijoeiro foi cultivado em solução nutritiva para facilitar o monitoramento das variações de pH do meio externo às raízes do feijoeiro submetido às diferentes fontes de N aplicadas via foliar. No experimento 2 as plantas de feijão, supridas com as mesmas fontes de N via foliar, foram cultivadas em vasos com areia, visando avaliar aos 10 DAE os valores de pH rizosférico e a produção de nódulos.

2.2 Experimentos

2.2.1 Experimento 1 (solução nutritiva)

Com o objetivo de estudar se a aplicação

de fontes nitrogenadas via foliar nas plantas de feijão poderia alterar o pH da solução nutritiva, via liberação de OH^-/H^+ pelas raízes, este experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado com 5 fontes de nitrogênio (sem N, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 e uréia - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) e 4 repetições. Após a realização do teste de toxidez, devido à aplicação direta de N nas folhas, foi determinada a concentração de 1,35% de N para todas as fontes, correspondente à concentração de N em uma solução 3% de uréia, dose considerada de baixa toxidez ao feijoeiro (ALMEIDA et al., 2000). As sementes da cultivar Ouro Negro foram inoculadas e germinadas em areia lavada, posteriormente as plântulas aos 4 dias após a emergência foram fixadas em placas circulares de isopor e colocadas em vasos com 300 mL com a solução nutritiva ionicamente balanceada e constantemente aerada com o uso de compressores de aquário.

Neste mesmo dia foi feita a aplicação única do N através de pulverização nas folhas cotiledonares que se já encontravam completamente abertas. As plantas foram isoladas completamente com algodão e papel alumínio no processo de pulverização foliar para não cair N na solução nutritiva. A solução nutritiva foi composta por 0,5 mM de K na forma de K_2SO_4 ; 0,5 mM de Ca na forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM de Mg na forma de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM de P na forma de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 μM de Fe na forma de FeNa-EDTA; 0,5 μM de B na forma de H_3BO_3 ; 0,4 μM de Mn na forma de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16 μM de Zn na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 μM de Cu na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,04 μM de Co na forma de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 μM de Mo na forma de $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Esta solução nutritiva foi adaptada da metodologia proposta por JACOB NETO (2003). Apesar da elevação da concentração de cálcio, magnésio e fósforo para 0,5 mM o equilíbrio de cargas da solução foi conservado. As leituras de pH da solução nutritiva foram feitas nos tempos de 14, 24, 40, 64, 88, 112, 136, 160 e 280 horas após a aplicação da solução nitrogenada do respectivo tratamento nas folhas.

2.2.2 Experimento 2 (vasos com areia)

Após a realização do experimento 1, onde foi verificado que a aplicação foliar altera o pH rizosférico e pode ser usada para separar o efei-

to do contato direto das fontes de N nas raízes da extrusão de OH⁻/H⁺ na rizosfera via metabolismo foliar, este experimento foi realizado no substrato areia com a aplicação do N também via foliar. Neste experimento a dosagem de N foi dividida em duas pulverizações foliares, aplicadas na concentração de 0,67%, aos 4 e 6 DAE. O delineamento experimental, tratamentos e número de repetições foram os mesmos do experimento 1. As plantas de feijão foram cultivadas em potes de plástico sem drenagem com 230 g de areia. As sementes inoculadas foram posicionadas na região central do vaso e cobertas por uma camada de 1 cm de areia.

A adubação dos vasos, exceto com N, foi realizada no mesmo dia da semeadura. Os cálculos para a massa de fertilizantes aplicados por hectare foram feitos considerando uma camada de 20 cm de solo por hectare com massa de 2.000.000 de quilogramas, sendo a densidade considerada igual a 1 (um). A adubação de base, para todos os nutrientes menos o N, foi feita através de aplicações de 0,5 mL por vaso da solução de K₂SO₄ (0,5 M) e 1 mL por pote das soluções de CaCl₂.2H₂O (0,5 M), MgSO₄.7H₂O (0,5 M), NaH₂PO₄.2H₂O (0,5 M), resultando nas massas de 170 kg de K ha⁻¹, 174 kg de Ca ha⁻¹, 104 kg de Mg ha⁻¹ e 135 kg de P ha⁻¹. Para os micronutrientes foi aplicado 1 mL por pote da solução estoque de micronutrientes, que foi preparada de acordo com a metodologia proposta por JACOB NETO (2003) com a seguinte composição: 2.302 mg/L de FeCl₃.6H₂O; 1.289 mg/L de EDTA; 31 mg/L de H₃BO₃; 67,6 mg/L de MnSO₄.H₂O; 45,92 mg/L de ZnSO₄.7H₂O; 9,96 mg/L de CuSO₄.5H₂O; 9,51 mg/L de CoCl₂.6H₂O e 121 mg/L de Na₂Mo₄.2H₂O, resultando nas massas finais de 3.011 g ha⁻¹ de Fe; 41 g ha⁻¹ de B; 191 g ha⁻¹ de Mn; 91 g ha⁻¹ de Zn; 22 g ha⁻¹ de Cu; 17 g ha⁻¹ de Co e 417 g ha⁻¹ de Mo. A irrigação foi feita constantemente através da aplicação de água destilada em quantidades suficientes para manter a areia apenas úmida. Aos 2 dias após a emergência (6 dias após a semeadura) foi feito o desbaste, visando manter a plântula mais saudável de cada vaso e a mais uniforme em relação às dos demais vasos. Foi realizada uma amostragem aos 10 DAE para avaliação do número de nódulos e o pH da rizosfera do feijoeiro.

2.3 Parâmetros avaliados nos experimentos

2.3.1 Número de nódulos

Após a retirada das plantas dos vasos para a coleta do material mineral (areia e solo) para avaliação do pH da rizosfera, as raízes foram cuidadosamente lavadas com água corrente para não prejudicar os nódulos. A avaliação do número de nódulos foi realizada logo em seguida, enquanto os nódulos apresentavam-se bem frescos. A contagem dos nódulos foi feita sob uma lupa circular provida de lâmpada fluorescente sobre um pano preto.

2.3.2 Avaliações de pH na solução nutritiva e na rizosfera do feijoeiro

No experimento 1, com o uso do aparelho SCHOTT-HANDYLAB 1, foram feitas leituras no pH da solução nutritiva nos tempos de 14, 24, 40, 64, 88, 112, 136, 160 e 280 horas após a aplicação da solução nitrogenada nas folhas. No *experimento 2*, as plantas foram retiradas do vaso plástico e erguidas pelo caule para a retirada da areia e do solo das regiões mais distantes das raízes (região não rizosférica), permanecendo apenas a pequena porção aderida às raízes (areia ou solo da região da rizosfera). Esta porção foi extraída através de agitação leve em um copo plástico, evitando choques e possíveis danos aos nódulos. Foi feita a avaliação de pH em água, onde o extrato aquoso foi preparado conforme a metodologia da Embrapa em uma proporção 1:2,5 entre areia (ou solo) e água, com 10 gramas de material e 25 mL de água deionizada. O extrato foi feito através de agitação de 2 minutos e repouso por 2 horas. No momento da leitura foi realizada nova agitação de aproximadamente 1 minuto e a leitura também foi feita com o aparelho SCHOTT-HANDYLAB 1.

2.4 Análises de estatística

Para o experimento 1 foi feita ANOVA em esquema fatorial no SAEG, sendo neste programa também realizado o teste de média Tukey com 5% de significância (tabela 1). Tanto a ANOVA quanto o teste de Tukey foram realizadas assumindo distribuição normal e homo-

gênea dos dados, obtida pelo teste de Lilliefors e teste de Cochran e Bartlett. No experimento 2 (tabela 2), para cada parâmetro analisado (número de nódulos e pH da rizosfera) foi feita uma ANOVA geral e, por apresentarem normalidade e homogeneidade, em seguida foi feito o teste Tukey (5%). Para ambos os experimentos, estão apresentados os dados da ANOVA e os valores da probabilidade ($Pr > F$) seguindo a distribuição de Snedecor, encontrados pela análise das variâncias, para os fatores analisados.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1

Os fatores deste estudo foram fontes de N e tempos de leitura do pH da solução nutritiva após a aplicação do N via foliar. Os valores de F na análise da variância ($Pr > F$) foram significativos para todas as variáveis envolvidas no experimento e para a interação entre elas (tabela 1). Verificou-se uma queda gradativa do pH da solução nutritiva em função do tempo, independente da fonte de N. Na média geral das fontes de N aplicadas na folha do feijoeiro é possível notar que o nitrato foi a fonte que proporcionou os maiores valores de pH da solução nutritiva, seguido sequencialmente do nitrato de amônio, uréia ($CO(NH_2)_2$), amônio e por fim o tratamento sem N, que mais acidificou a solução nutritiva. Na análise da variável fonte de N, observa-se que no primeiro período após a

aplicação do N (14 horas) não houve diferença significativa entre as fontes de N. Com 24 horas houve a verificação dos maiores valores de pH com uso do nitrato em relação às demais fontes de N.

A partir de 40 horas após a aplicação iniciou a formação de três grupos de valores de pH, com os maiores valores para o tratamento com nitrato, valores intermediários de pH nos tratamentos com nitrato de amônio, uréia e amônio e os menores valores de pH no tratamento sem N. Nas medições realizadas 88 e 112 horas após a aplicação do N via foliar o tratamento com amônio teve o valor de pH inferior aos tratamentos com nitrato de amônio e uréia. O nitrato permaneceu proporcionando os maiores valores de pH, e a testemunha sem N os menores valores, até a última leitura com 280 horas após a adubação com N, indicando que quando não suprida com N a planta começa a acidificar o meio externo às raízes. No tempo de 280 horas as plantas com nitrato de amônio, uréia e amônio proporcionaram valores de pH da solução sem diferenças significativas. Com relação à variável “tempo” nota-se na tabela 1, para todas as fontes de N e também para o tratamento sem N, a mesma tendência existente na média geral para o fator pH, ou seja, do decréscimo progressivo do pH da solução ao longo do tempo até a última leitura realizada com 280 horas após a aplicação do N. Depois de 10 horas após aplicação de N os valores de pH das soluções começaram a alterar.

Tabela 1: Variação do pH da solução nutritiva do feijoeiro devido ao efeito de diferentes fontes de N via foliar e do tempo após a aplicação. Resultados da ANOVA ($Pr > F$) realizada em dados não transformados.

Fonte de N	Horas após aplicação de nitrogênio via foliar									Média geral Fonte N
	14	24	40	64	88	112	136	160	280	
Sem N	5,41 Aa	4,78 Bb	4,58 BCc	4,24 CDd	3,97 DEd	3,82 DEFd	3,55 EFGd	3,47 FGd	3,21 Gc	4,11 e
NO ₃ ⁻	5,65 Aa	5,41 Aba	5,42 ABa	5,40 ABa	5,42 ABa	5,34 ABa	5,25 ABCa	5,21 BCa	4,83 Ca	5,32 a
NH ₄ ⁺	5,28 Aa	4,78 Bb	4,73 BCbc	4,57 BCDcd	4,46 BCDEc	4,31 CDEc	4,21 DEc	4,07 EFc	3,71 Fb	4,46 d
NH ₄ NO ₃	5,38 Aa	5,02 ABb	4,90 ABb	4,90 ABb	4,90 ABb	4,80 Bb	4,71 Bb	4,61 Bb	3,94 Cb	4,82 b
CO(NH ₂) ₂	5,34 Aa	4,91 ABb	4,83 BCbc	4,74 BCDbc	4,56 BCDEc	4,42 CDEFc	4,38 DEFbc	4,28 EFbc	4,05 Fb	4,61 c
Pr > F										
Fonte de N	0,0001									
Tempo (T)	0,0001									
Fonte N x T	0,0001									
CV%	4,224									

Medias seguidas de letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

3.2 Experimento 2

Neste experimento as plantas de feijão também foram supridas com N via foliar utilizando-se as mesmas fontes de N, porém, neste caso, com o cultivo em areia. O uso deste meio teve o objetivo de verificar a nodulação do feijoeiro na coleta aos 10 DAE onde também foi avaliado o pH rizosférico. A tabela 2 mostra que na análise da variância houve significância para ambos os parâmetros avaliados. O amônio foi a fonte que proporcionou a maior acidez na rizosfera, com o valor significativamente inferior aos obtidos nas demais fontes de N e das plantas sem N. A uréia e o nitrato de amônio foram as fontes de N intermediárias no processo de acidificação da rizosfera do feijoeiro. A rizosfera das plantas sem N teve valores de pH estatisticamente semelhantes ao das plantas com nitrato de amônio e superior aos das plantas com uréia. Assim como verificado no experimento em solução nutritiva, na areia foram também observados valores estatisticamente superiores de pH na rizosfera das plantas que receberam o nitrato em relação às demais fontes testadas (tabela 2).

Quanto à nodulação, representada pelo número de nódulos planta⁻¹, os menores índices foram verificados nas plantas que receberam o amônio, uréia e nitrato de amônio, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estas fontes de N. Como estas fontes de N mineral foram as que mais acidificaram a rizosfera, este é um forte indício do efeito do H⁺ liberado na rizosfera pelo feijoeiro, devido ao metabolismo destas fontes de N, reduzindo a colonização da rizosfera pelo rizóbio. Nas plantas crescidas com nitrato houve superioridade na nodulação quando comparadas às plantas adubadas com demais fontes minerais de N, porém estas plantas com nitrato tiveram nodulação inferior às das plantas sem N mineral, dependentes apenas da fonte atmosférica (N₂). Os resultados deste experimento mostram a existência de uma relação muito estreita entre o processo de inibição da nodulação das plantas de feijão e as modificações do pH da rizosfera afetada pelo metabolismo do N onde, neste caso, destaca-se a influência da acidificação devido ao efeito do metabolismo do N, principalmente na forma de amônio, sobre o processo de nodulação do feijoeiro.

Tabela 2: Médias do número de nódulos planta⁻¹ e do pH da rizosfera do feijoeiro devido ao efeito de diferentes fontes de N via foliar. Resultados da ANOVA (Pr>F) realizada em dados coletados aos 10 DAE, transformados por $\sqrt{x + 1}$ para número de nódulos e não transformados para pH rizosférico.

Fontes de N	pH da rizosfera	Nº de nódulos
Sem N	4,80 ab	35 a
N-NO ₃	5,03 a	27 b
N-NH ₄	4,15 d	14 c
N-NH ₄ NO ₃	4,71 bc	19 c
N-CO(NH ₂) ₂ (uréia)	4,46 c	17 c
Pr > F	0,0001	0,0001
CV%	2,816	16,096

Médias seguidas de letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si (teste Tukey 5%).

4 DISCUSSÃO

Foram avaliados nestes experimentos o efeito do balanço iônico vegetal, através da extrusão de H⁺/OH⁻ na rizosfera, na nodulação do feijoeiro devido à aplicação de N via foliar, evitando o contato do N com o rizóbio e um possível efeito direto nas raízes. Previamente, foi feita uma avaliação das variações de pH da solução nutritiva de plantas que receberam N via foliar (exp. 1), através de medições em diversas épocas, após a aplicação na folha de diferentes fontes de N nas mesmas concentrações. Neste ensaio, não foi feito o controle do pH da solução nutritiva, uma vez que o objetivo do estudo foi investigar as suas variações a partir da aplicação das diferentes fontes de N via foliar. Foi observada, no experimento 1, uma progressiva acidificação do meio externo às raízes para todos os tratamentos. Entretanto, observou-se que nas plantas adubadas com nitrato a acidificação da solução nutritiva foi amenizada em relação às plantas supridas com fontes amoniacais, mostrando que independente do órgão de absorção do N, neste caso foi a folha, a rizosfera teve o pH alterado pelo metabolismo deste elemento.

Nas plantas sem N a deficiência nutricional

nal é apontada como o principal agente intensificador da acidificação da solução nutritiva, especialmente considerando que a liberação de ácidos orgânicos pelas raízes é descrita por JONES (1998) como uma das principais respostas das plantas ao estresse por deficiência de minerais. No caso do feijoeiro, com a depleção total do N nas reservas da semente é fundamental a presença do N no solo ou o funcionamento dos nódulos nas plantas dependentes exclusivamente da FBN (HUNGRIA & KASCHUK, 2014; HUNGRIA et al., 1991). No experimento em areia (exp. 2) também foi verificado que o amônio foi a fonte de N que mais acidificou a rizosfera do feijoeiro e, neste experimento, a que mais inibiu a nodulação. Os resultados deste experimento mostram uma estreita relação entre o fornecimento de N mineral via foliar, a necessidade da planta em balancear-se eletricamente liberando na rizosfera cargas correspondentes às cargas dos íons absorvidos pela planta (MARSCHNER, 2012; RODRIGUEZ et al., 2008; HINSINGER et al., 2003; JACOB NETO, 2003; RAVEN et al., 1990) e a inibição da nodulação devido à condição de pH inadequada ao rizóbio gerada na rizosfera (FARIAS et al., 2016; FERGUSON & GRESSHOFF, 2015; FERGUSON et al., 2013; CAMPANHARO, 2006). A relação entre as modificações do pH rizosférico e a inibição da nodulação mostra-se consistente quando é feito um comparativo entre as quatro fontes de N.

Comparando as plantas supridas com nitrato com as plantas sem N nota-se que estas últimas apresentaram maior número de nódulos radiculares, mesmo com a geração de valores de pH inferiores aos das plantas com nitrato. O fato da FBN ser estimulada quando a planta está com deficiência de N pode explicar porque as plantas sem N tiveram a maior nodulação e a rizosfera mais acidificada, tendo em vista que a FBN acidifica esta região (TANG et al., 1997; ALLEN et al., 1988; JARVIS & ROBSON, 1983). A relação entre aplicação de substâncias via foliar e alterações na rizosfera, observadas nestes experimentos com aplicação de N via foliar, é investigada há várias décadas. Alterações na atividade de microrganismos na rizosfera foram estudadas por pesquisadores da área de microbiologia, que verificaram em alguns casos a possibilidade de modificar a dinâmica química e microbiológica da rizosfera através da aplicação

de diversos produtos na folha, como fungicidas (HALLECK & COCHRANE, 1950), micronutrientes (RAMACHANDRA REDDY, 1968), glifosato (IMPARATO et al., 2016; LANE et al., 2012) e ureia (GASSER et al., 2015; SCAGEL, 2008; YILDIRIM et al., 2007; VRANY, 1974; RAMACHANDRA REDDY, 1959).

A aplicação de uréia via foliar em plantas de trigo cultivadas em um solo contaminado pelo fungo *Fusarium sp.* resultou na redução da população do fungo na rizosfera e aumento nas populações de bactérias (VRANY, 1972). Em uma análise comparativa entre sorgo e crotalaria BALASUBRAMANIAM & RANGASWAMI (1973) notaram que a aplicação de NaNO_3 (0,1%) via foliar aumentou o teor de aminoácidos na rizosfera da leguminosa e alterou qualitativamente os açúcares liberados pela planta, o que supostamente foi o principal fator para incrementar a população de bactérias, fungos e actinomicetos na rizosfera de ambas as espécies vegetais estudadas. RANGA RAO et al. (1972) aplicaram o regulador de crescimento morfactina nas folhas de plantas de pimentão e observaram que a população fúngica da rizosfera foi fortemente reduzida nas mais altas dosagens, cujo efeito foi associado ao retardo no crescimento das raízes laterais e às alterações nos padrões dos exsudatos.

Estes autores atribuíram os efeitos da aplicação de substâncias na folha sobre variações na atividade de microorganismos mais às produções de diferentes compostos pela planta, e liberação dos mesmos na rizosfera, do que aos possíveis efeitos do pH ocorridos nesta região. A ação da acidez da rizosfera sobre a redução da nodulação pelo rizóbio foi, no presente trabalho, muito possivelmente, associada à sensibilidade do microorganismo a esta condição ambiental desfavorável à sobrevivência e colonização desta região pelas bactérias (FARIAS et al., 2016; FERGUSON & GRESSHOFF, 2015; FERGUSON et al., 2013; ANDRADE et al., 2002; MIGUEL & MOREIRA, 2001; GRAHAM & VANCE, 2000; VARGAS & GRAHAM, 1988). A acidificação da rizosfera devido à aplicação de amônio via foliar, por sua vez, possui relação com o balanço iônico vegetal, processo que leva em conta o equilíbrio das cargas internas da planta, como um todo (ALLEN et al., 1988), para que haja distribuição de cargas em toda a planta e a eletroneutralidade interna seja mantida.

De acordo com KIRKBY & KNIGHT (1977) a distribuição das cargas em toda a planta do tomateiro foi acompanhada pela absorção de nitrato, taxa de acúmulo de ânions e taxa de liberação de OH⁻ na solução nutritiva. O acúmulo de ânions na planta, promovido pelo aumento do nitrato na solução, foi mais evidente na parte aérea do que na raiz. Foi gerado um acúmulo de ânions orgânicos na parte aérea, que normalmente é balanceado por cátions acompanhando o nitrato, com destaque para o potássio. As relações entre parte aérea e sistema radicular envolvendo transporte de íons e compostos orgânicos, sob a ação do balanço iônico da planta, explicam a correlação entre a aplicação de N foliar e as alterações no pH da rizosfera e destas com a magnitude da nodulação do feijoeiro neste trabalho. Acredita-se, por exemplo, que o conjunto de mecanismos pelos quais o nitrato aplicado via foliar promoveu a menor acidificação da rizosfera, permitindo melhor nodulação em relação às plantas com amônio, seja o mesmo ocorrido com o nitrato aplicado pela raiz e reduzido na folha, local predominante para a redução do nitrato (IMSANDE & TOURAINÉ, 1994; KIRKBY & KNIGHT, 1977).

No caso do amônio, no presente trabalho, quando fornecido às folhas do feijoeiro provocou maior acidificação da rizosfera e promoveu acentuada redução no número de nódulos. A explicação fisiológica para este efeito está relacionada aos decréscimos do pH apoplástico de plantas supridas com amônio via foliar, fato verificado por MUHLING & LÄUCHLI (2001) quando testavam várias formas de aplicação de diferentes fontes de N em plantas de feijão e milho. Outra observação destes autores, que evidenciam as interações raiz/parte aérea em relação ao balanço iônico, foi que a partir da aplicação de nitrato e amônio na solução nutritiva detectou-se nas folhas elevação do pH apoplástico na presença do nitrato e acidificação com o amônio, concluindo que a atividade da enzima nitrato redutase da raiz foi responsável pelas concentrações de nitrato e variações do pH na folha. Já o gás amônia fumigado na folha gerou uma resposta bifásica, ou seja, uma alcalinização seguida de acidificação. Para YIN et al., (1998) a alcalinização do citossol e vacúolo das folhas submetidas ao gás

amônia foi causada, em seu trabalho, pela solução e protonação de NH₃⁺ nos compartimentos aquosos de folhas. A assimilação foliar da amônia em plantas de cevada e espinafre resultou em alterações citossólicas dos teores de aminoácidos (incrementos) e sacarose (reduções), correlacionadas com as variações ocorridas no apoplasto e na seiva do floema (LOHAUS & HELDTH, 1997), onde se acredita que foram geradas alterações nas propriedades eletroquímicas da raiz e da rizosfera. Nestes trabalhos foi mostrado que as folhas podem absorver o gás amoníaco atmosférico e utilizá-lo como fonte de N (FARQUHAR et al., 1980), em um processo onde a planta incorpora o amônio em aminoácidos através do complexo GS/GOGAT (BERGER et al., 1986).

No presente trabalho em plantas de feijão, a aplicação foliar de uréia, assim como nitrato de amônio, proporcionou acidificação rizosférica menos expressiva do que com o uso de amônio, o que não foi uma surpresa considerando o seu metabolismo em relação ao do íon amoniacal. É comum a utilização de uréia via foliar em soluções com concentrações na ordem de 2% em plantas de feijão (ALVIM, 1960), sendo normalmente utilizada como fonte complementar de N. A uréia aplicada é rapidamente absorvida e no citoplasma passa pela hidrólise que libera NH₃⁺, cuja protonação alcaliniza o pH citoplasmático (WITTE et al., 2002). Embora sejam poucas as informações referentes aos efeitos da assimilação foliar da uréia sobre possíveis variações químicas e microbiológicas na rizosfera, presume-se aqui que mesmo promovendo uma alcalinização inicial, seja possível o surgimento de uma acidificação posterior, como mencionado para a amônia fumigada nas folhas, por se tratar da entrada na planta de um íon de carga positiva que necessita da liberação de uma molécula de carga similar para a planta equilibrar-se ionicamente.

No caso do nitrato de amônio o pH da rizosfera foi estatisticamente igual ao da testemunha sem N, explicado pelo fato desta ser uma fonte eletricamente estável de N, com a presença de um íon de nitrato (-) e um íon de amônio (+). Em relação ao tratamento sem N

mineral, onde o N₂ atmosférico surge como a única possível fonte de N para as plantas inoculadas, os baixos valores de pH na rizosfera foram promovidos pela planta, que ao assimilar biologicamente o N₂ libera excessos de cargas positivas na rizosfera em relação às negativas gerando acidificação neste ambiente (TANG et al., 1997; ALLEN et al., 1988; JARVIS & ROBSON, 1983). Vale ressaltar que, pelos dados destes experimentos, as variações de pH rizosférico são atribuídas aos efeitos do balanço de cargas das plantas submetidas às fontes catiônicas ou aniônicas de N na folha e estão associadas tanto ao processo de absorção foliar do N, como verificado em plantas com N radicular que extrusam H⁺ ou OH⁻, quanto ao processo de assimilação foliar do N. Neste caso, posteriormente à incorporação do N em estruturas orgânicas alguns processos metabólicos, como a descarboxilação de ácidos orgânicos, ocorrem para que cargas excedentes sejam, ao final, liberadas pela raiz, órgão que possui entre outras funções a de excretar diversos íons, compostos e substâncias no meio externo (HINSINGER et al., 2003). É importante mencionar ainda que como as variações de pH rizosférico das plantas com N via foliar iniciam-se logo nas primeiras horas após a pulverização com N, verificado no experimento 1 em solução nutritiva, é muito provável que o amônio aplicado na folha começou a acidificar a rizosfera no momento da aproximação do rizóbio, conseqüentemente, influenciando a infecção e a formação dos nódulos (exp. 2).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados apresentados e discutidos neste trabalho, conclui-se:

- A aplicação de N via foliar alterou o pH da rizosfera e influenciou a nodulação.
- O amônio foi a fonte de N que mais acidificou a rizosfera e mais afetou a nodulação, associando a extrusão de H⁺ à aproximação do rizóbio e nodulação do feijoeiro.
- Nas plantas sem N ocorreu a maior nodulação e houve acidificação da rizosfera.
- Em todos os tratamentos foi verificada acidificação da solução nutritiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, S.; RAVEN, J.A.; SPRENT, J.L. *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**, v.39, p.513-528, 1988.
- ALMEIDA, C.; CARVALHO, M.A.C.; ARF, O.; SÁ, M.E.; BUZZETTI, S. *Uréia em cobertura e via foliar em feijoeiro.* **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.293-298, 2000.
- ALVIM, P.T. *Net assimilation rate and growth behavior of beans as affected by gibberellic acid urea and sugar sprays.* **Plant physiology**, v.35, n.3, 1960.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. *Effects of lime and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol.* **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, p.477-485, 2002.
- ARAUJO, F.F.; MUNHOZ, R.E.V.; HUNGRIA, M. *Início da nodulação em 7 cultivares de feijoeiro inoculadas com duas estirpes de Rhizobium.* **Pesq. Agrop. Bras.**, Brasília, v.31, n.6, p.435-443, 1996.
- BALASUBRAMANIAN, A. e RANGASWAMI, G. *Influence of Foliar Application of Chemicals on the Root Exudations and Rhizosphere Microflora of Sorghum vulgare and Crotalaria juncea.* **Folia Microbiol.**, v.18, p.492-498, 1973.
- BANDYOPADHYAY, A.K.; JAIN, V.; NAINAWATEE, H.S. *Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (Pisum sativum L.).* **Biol. Fertil. Soils**, v.21, p.189-192, 1996.
- BEN ZIONI, A.; VAADIA, Y.; LIPS, S.H. *Nitrate uptake by roots is regulated by nitrate reduction products of the shoot.* **Physiol. Plant.** v.34, p.288-290, 1971.
- BERGER, M.G.; KLAUS, R.E.; FOCK, H.P. *Assimilation of gaseous ammonia by sunflower leaves during photosynthesis.* **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.211-19, 1986.
- CAMPANHARO, M. *Acidez do solo na fixação biológica do nitrogênio no feijoeiro.* *Dissertação de mestrado, UFRPE, 2006.* 72 p.
- CARVALHO, A.O.; JACOB-NETO, J.; DO CARMO, M.G.F. *Colonização de raízes de tomateiro por Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio.* **Fitopatol. Bras.** v.30, n.1, 2005.
- COLLINO, D.J.; SALVAGIOTTI, F.; PERTICARI, A.; PICCINETTI, C.; OVANDO, G.; URQUIAGA, S.; RACCA, R.W. *Biological nitrogen fixation in soybean in Argentina: relationships with crop, soil, and meteorological factors.* **Plant Soil**, v.392, p.239-

- 252, 2015.
- DENISON, R.F. & HARTER, B.L. Nitrate Effects on Nodule Oxygen Permeability and Leghemoglobin. *Plant Physiol.*, v.107, p.1355-1364, 1995.
 - DROZDOWICZ, A. G. **Microbiologia ambiental**. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) *Tratado de microbiologia*. Rio de Janeiro, v.2, p.1-102, 1991.
 - DUSHA, I.; BAKOS, A.; KONDOROSI, A. BRUIJN, F.J.; SCHELL, J. The Rhizobium meliloti early nodulation genes (nodABC) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.*, v.219, p.89-96, 1989.
 - FARIAS, T.P.; TROCHMANN, A.; SOARES, B.L.; MOREIRA, F.M.S. Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.38(3), p.387-395, 2016.
 - FARQUHAR, G.D.; FIRT, P.M.; WETSELAAR, R.; WEIR, B.. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: determination of the ammonia compensation point. *Plant Physiology*, v.66, p.710-14, 1980.
 - FERGUSON, B.; LIN, M.H.; GRESSHOFF, P.M. Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signaling & Behavior*, v. 8 (3), 2013.
 - FERGUSON, B.J. & GRESSHOFF, P.M. Physiological implications of legume nodules associated with soil acidity (in: *Legume nitrogen fixation in a changing environment*). **Springer Int. Publ. Switzerland**, p.113-125, 2015.
 - FISHER, R.F. & LONG, S.R. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature*, v.357, p. 655-660, 1992.
 - GASSER, M.; HAMMELEHLE, A.; OBERSON, A.; FROSSARD, E.; MAYER, J. Quantitative evidence of overestimated rhizodeposition using ¹⁵N leaf-labelling. *Soil Biology and Biochemistry*, v.85, p.10-20, 2015.
 - GRAHAM, P.H. & VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, v.65, p.93-106, 2000.
 - HALLECK, F.E. & V.V. COCHRANE. The effect of fungistatic agents on the bacterial flora of rhizosphere. *Phytopathology*, v.40, p.715-718, 1950.
 - HAYNES, R.J. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil*, v.120, p.247-264, 1990.
 - HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; TANG, C.; JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, v.248, p.43-59, 2003.
 - HUNGRIA, M. & KASCHUK, G. Regulation of N₂ fixation and NO₃⁻/NH₄⁺ assimilation in nodulated and N-fertilized Phaseolus vulgaris L. exposed to high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, v.98, p.32-39, 2014.
 - HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A.A.; WALLS-GROVE, R.M. Nitrogen Fixation, Assimilation and Transport During the Initial Growth Stage Phaseolus vulgaris L. *Journal of Exp. Botany*, v.42, n.7, p.839-844, 1991.
 - HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & ARAÚJO, R.S. **Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro**. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., (eds.). *Biologia dos solos dos cerrados*. Brasília, EMBRAPA, p.187-294, 1997.
 - IMPARATO, V.; SANTOS, S.S.; JOHANSEN, A.; GEISEN, S.; WINDING, A. Stimulation of bacteria and protists in rhizosphere of glyphosate-treated barley. *Applied Soil Ecology*, v.98, p.47-55, 2016.
 - IMSANDE, JOHN & TOURAINE, B. N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. *Plant Physiology*, v.105, p. 3-7, 1994.
 - JACOB-NETO, J. **The interactions of H⁺/OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects**. University of Dundee. Scotland. Tese de PhD. 2003.
 - JACOB-NETO, J.; GOI, S.R.; SPRENT, J.I. Efeito de diferentes formas de nitrogênio na nodulação e crescimento de Acacia mangium. *Floresta e Ambiente*, v.5, p.104-110, 1998.
 - JARVIS, S.C. & ROBSON, A.D. The effects of nitrogen nutrition of plants on the development of acidity in Western Australian soils. I. Effects with subterranean clover grown under leaching conditions. *Aust. J. Agric. Res.*, v.34, p.341-353, 1983.
 - JONES D.L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*, v.205, p.25-44, 1998
 - KIRKBY, E.A. & KNIGHT, A.H. Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiology*, v.60, p.349-353, 1977.
 - LANE, M.; LORENZ, N.; SAXENA, J.; RAMSIER, C.; DICK, R.P. Microbial activity, community structure and potassium dynamics in rhizosphere soil of soybean plants treated with glyphosate. *Pedobiologia*, v.55(3), p.153-159, 2012.
 - LEAL, J.F.F.; RAMALHO, I.O.; OLIVEIRA, D.G.C.; PAULA, T.C.; DIAS, A.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Inoculação de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*)

- ris, L.) das classes preto e vermelho com extratos de nódulos e de raízes finas. **XIV Semana Científica Johanna Döbereiner**. Embrapa Agrobiologia (Serpédica, RJ), 2014.
- **LIMPENS, E.** e **BISSELING T.** Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.343-350, 2003.
 - **LOHAUS, G.** e **HELDTH, W.** Assimilation of gaseous ammonia and the transport of its products in barley and spinach leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.48(315), p.1779-1786, 1997.
 - **MACEDO, R.A.T.** **Influência de Fatores de Manejo Sobre a Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura da Soja em Áreas Experimentais e de Produção no Noroeste do Paraná.** Dissertação de Mestrado. Agronomia - Ciência do solo, UFRRJ, 2003.
 - **MAHON, J. D.** Environmental and genotypic effects on the respiration associated with symbiotic nitrogen fixation in peas. **Plant Physiology**, v.63, p.892-97, 1979.
 - **MARSCHNER P.** Mineral nutrition of higher plants. 3 Ed. London: Academic Press. 2012.
 - **MCCLURE, P.R.; KOCHIAN, L.V.; SPANSWICK, R.M.; SHAFF, J.E.** Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. **Plant Physiology**, v.93, p.281-289, 1990.
 - **MCNEAR JR., D. H.** The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge*. V.4(3):1, 2013.
 - **MIGUEL, D. L.** e **MOREIRA, F. M. S.** Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Rev. Bras. Ci. Solo**, Viçosa, v.25, p.873-883, 2001.
 - **MÜHLING, K.H.** & **LÄUCHLI, A.** Influence of chemical form and concentration of nitrogen on apoplastic pH of leaves. *Journal of Plant Nutrition*, v.24, p.399-411, 2001.
 - **NOVA-FRANCO, B.; ÍÑIGUEZ, L.P.; VALDÉS-LÓPEZ, O.; ALVARADO-AFFANTRANGER, X.; LEIJA, A.; FUENTES, S.I.; RAMÍREZ, M.; PAUL, S.; REYES, J.L.; GIRARD, L.; HERNÁNDEZ, G.** The Micro-RNA172c-APETALA2-1 Node as a Key Regulator of the Common Bean-Rhizobium etli Nitrogen Fixation Symbiosis. **Plant Physiology**, v.168, p.273-291, 2015.
 - **RAMACHANDRA REDDY, T. K.** Foliar spray of urea and rhizosphere microflora of rice (*Oryza sativa* L.). **Phytopathol. Z.**, v.36, p.286-289, 1959.
 - **RAMACHANDRA REDDY, T. K.** plant treatment in relation to the rhizosphere effect iii. foliar application of certain trace elements and metallic chelates in relation to rhizosphere microflora of rice (*oryza sativa* l.). **Plant and Soil**, v.29, n.1, 1968.
 - **RANGA RAO, V.; JAYAKAR, M.; SHARMA, K.R.; MUKERJI, K.G.** Effect of foliar spray of morphactin on fungi in the root zone of *apsicum annuum*. **Plant and Soil**, v.37, n.1, p.179-182, 1972.
 - **RAVEN, J.A.; FRANCO, A.A.; JESUS, E.L.; JACOB-NETO, J.** H⁺ extrusion and organic-acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants. **New Phytologist**. 114. 369-389. 1990.
 - **REID, D.E.; FERGUSON, B.J., GRESSHOFF, P.M.** Inoculation- and nitrateinduced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. **Mol Plant Microbe Interact.** v.24: p.606-618, 2011.
 - **RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; LOPES, E.S.; FRANCO, A.A.** Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em latossolo ácido. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.11. p.275-282, 1987.
 - **RIBEIRO, R.A.; ORMENO-ORRILLO, E.; DALLAGNOL, R.F.; GRAHAM, P.H.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M.** Novel **Rhizobium** lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican áreas. *Research in Microbiology*. V.64, p.740-748, 2013.
 - **RODRIGUEZ, M.B.; GODEAS, A.; LAVADO, R.S.** Soil Acidity Changes in Bulk Soil and Maize Rhizosphere in Response to Nitrogen Fertilization. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.39, n.17, p.2597-2607, 2008.
 - **SANTOS, L.A.** **Absorção e remobilização de NO₃⁻ em arroz (*Oriza sativa* L.): Atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo.** Dissertação de Mestrado. Depto Solos. UFRRJ. 2006.
 - **SCAGEL, C.F.** Rate of Nitrogen Application During th6'1Growing 'Season and Spraying Plants with Urea in the Autumn Alters Uptake of Other Nutrients by Deciduous and Evergreen Container-grown *Rhododendron* Cultivars. **Hortscience**, v.43(5), p.1569-1579, 2008.
 - **SHEN, J. LI, C.; MI, G.; LI, L.; YUAN, L.; JIANG, R. ZHANG, F.** Maximizing root/rhizosphere efficiency to improve crop productivity and nutrient use efficiency in intensive agriculture of China. **Journal of Experimental Botany**, v.18, 2012.
 - **SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S.** **Enzimas de assimilação de nitrogênio.** UFR-RJ. Copyright®. 2002. 57 p.
 - **TANG, C.; MCLAY, C.D.A.; BARTON, L.** A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. **Aust. J. Exp. Agric.** v.37, p.563-570, 1997.

- **TANNER, J.W.** e **ANDERSON, I.C.** External Effect of Combined Nitrogen on Nodulation. **Plant Physiology**, v.39(6), p.1039-1043, 1964.
- **TOURAINÉ, B.; MULLER, B.; GRIGNON, C.** Effect of Phloem-Translocated Malate on NO₃⁻ Uptake by Roots of Intact Soybean Plants. **Plant Physiology**, v.99, p.1118-1123, 1992.
- **VARGAS, A.A.T.** e **GRAHAM, P.H.** Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, v.19, p.91-101, 1988.
- **VINUESA, P., NEUMANN-SILKOW, F., PÁCIOS-BRAS, C., SPAINK, H. P., MARTÍNEZ-ROMERO, E., AND WERNER, D.** Genetic analysis of a pH-regulated operon from Rhizobium tropici CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.16, p.159-168, 2003.
- **VRANY, J.** Changes of Microflora of Wheat Roots after Foliar Application of Urea. **Folia Microbiol.** v.19, p.229-235, 1974.
- **VRANY, J.** The Effect of Foliar Application of Urea on Fungi of Wheat Growing in Soil Artificially Contaminated with Fusarium spp. **Folia Microbiol.** v.17, p.500-504, 1972.
- **WITTE, C.P.; TILLER, S.A.; TAYLOR, M.A.; DAVIES, H.V.** Leaf Urea Metabolism in Potato. Urease Activity Profile and Patterns of Recovery and Distribution of ¹⁵N after Foliar Urea Application in Wild-Type and Urease-Antisense Transgenics. **Plant Physiology**, v.8, p.1129-1136, 2002.
- **YILDIRIM, E.; GUVENC, I.; TURAN, M.; KARATAS, A.** Effect of foliar urea application on quality, growth, mineral uptake and yield of broccoli (Brassica oleracea L., var. italica). **Plant Soil Environ.**, v.5(3), p.120-128, 2007.
- **YIN, Z.H.; KAISER, W.; HEBER, U.; RAVEN, J.A.** Effects of gaseous ammonia on intracellular pH values in leaves of C3- and C4-plants. **Atmospheric Environment**, v.32. p.539-544, 1998.