

Este exemplar corresponde a
última final da tese defendida pela
Candidata Diolana M. Silva, e aprovada
pela comissão julgadora.
25.5.90

João Humberto INSTITUTO DE BIOLOGIA

**EFEITOS DO ALUMÍNIO SOBRE A FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA
(*Glycine max* (L.) MERRIL) cv. SANTA ROSA**

CAMPINAS - SP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



DIOLINA MOURA SILVA

**EFEITOS DO ALUMÍNIO SOBRE A FIXAÇÃO
BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA
(*Glycine max* (L.) MERRIL) cv. SANTA ROSA**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Biologia Vegetal.

Orientador: PROF. DR. LADASLAV SODEK

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CAMPINAS – SP – 1990

À minha mãe JOANA
Por aquilo que sou
À minha filha DEUSIANNE
Por aquilo que serei

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. LADASLAV SODEK, orientador deste trabalho, que nestes anos de convivência muito me ensinou, contribuindo grandemente para o meu crescimento científico e intelectual através da orientação segura e amigável; bem como pela dedicação, estímulo e interesse com que acompanhou a execução desta tese em todas as suas etapas, o meu agradecimento especial.
- Ao Professor Dr. PAULO R. MOSQUIM, que com seu entusiasmo contagiante pela fisiologia vegetal acompanhou com interesse o desenvolvimento deste trabalho, ensinando-me o valor das coisas simples e colocando à minha disposição o seu conhecimento e a sua amizade.
- Ao Professor Dr. LUIZ G. SANTORO, pela colaboração durante as etapas finais deste trabalho, pela paciente revisão e sugestões apresentadas na fase da pré-banca.
- Ao Professor Dr. ANTONIO CELSO MAGALHÃES, pelas valiosas críticas e sugestões que enriqueceram sobremaneira este trabalho.
- Aos Professores de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pelos ensinamentos e pela colaboração.
- Aos amigos do Departamento de Fisiologia Vegetal, por tornarem agradável e produtivo o nosso ambiente de trabalho e, em especial, ao FELÍCIO ARASAKI pela ajuda prestada.
- Aos Funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, que com sua boa vontade e eficiência muito contribuíram para o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho, em especial ao Sr. PEDRO e Sr. SEBASTIÃO, ao ARIBES e ao JOÃO HUMBERTO.

- Aos amigos do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo apoio e estímulo, e em especial, à LYDIA BEHAR, a quem devo meus primeiros conhecimentos de Fisiologia Vegetal e à MARIA LUIZA C. NATALLI, pela amizade e incentivo ao longo da minha carreira.
- À minha filha, DEUSIANNE MOURA ACYLINO, pelo apoio, amor, carinho e sobretudo pela compreensão nos momentos difíceis.
- Aos amigos do dia-a-dia, MARIA AUXILIADORA e JOTA, JOÃO e NIDE, JORGE e MARCIA, ROSANGELA e PAULO, pelo apoio, incentivo, ajuda e carinho.
- À Sra. ANNA GAGLIARDI, diretora técnica da biblioteca do Instituto de Biologia, pelo auxílio nas normas de referências bibliográficas.
- À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.
- Agradeço ainda, a todos os que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*Tanto que fazer!
Livros que não se lêem, cartas que não se
escrevem línguas que não se aprendem,
amor que não se dá,
tudo quanto se esquece.
Amigos entre adeuses,
crianças chorando na tempestade,
cidadãos assinando papéis,
papéis, papéis... E os pássaros detrás de
grades de chuva,
e os mortos em redoma de cânfora.
(E uma canção tão bela) Tanto que fazer!
E fizemos apenas isto.
E nunca soubemos quem éramos
nem prá que.*

(Cecília Meireles).

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	O ALUMÍNIO NO SOLO	3
2.2	EFEITOS DO ALUMÍNIO NA PLANTA	5
2.3	TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO	7
2.4	EFEITOS DO ALUMÍNIO SOBRE A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	9
2.5	AValiação DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	15
3.2	SOLUÇÕES NUTRITIVAS	16
3.3	INOCULAÇÃO DAS PLANTAS	18
3.4	SISTEMAS DE CULTIVO	19
3.5	CONTROLE FITOSSANITÁRIO	23
3.6	EXPERIMENTO PRELIMINAR: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO	23
3.6.1	CULTIVO DAS PLANTAS	23
3.6.2	COLETA DO EXSUDATO DA SEIVA DO XILEMA	24
3.6.3	COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL VEGETAL	24
3.7	EXPERIMENTO I: EFEITO DIRETO DO ALUMÍNIO	25
3.8	EXPERIMENTO II: EFEITO INDIRETO DO ALUMÍNIO	26
3.9	EXPERIMENTO III: AValiação DO EFEITO DIRETO E INDIRETO DO ALUMÍNIO	27
3.10	ANÁLISE DO EXSUDATO DA SEIVA DO XILEMA	28
3.10.1	DOSAGEM DE UREÍDEOS TOTAIS	28
3.10.2	DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS TOTAIS	29
3.10.3	DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS EM HPLC (HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	29
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	EXPERIMENTO PRELIMINAR: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO	31
4.1.1	CULTIVO DA SOJA EM HIDROPÔNICA	31
4.1.2	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO	34
4.2	EXPERIMENTO I: EFEITO DIRETO DO ALUMÍNIO	43
4.2.1	NÚMERO E PESO SECO DOS NÓDULOS	43
4.2.2	PESO SECO DA RAÍZ E DA PARTE AÉREA	47
4.2.3	ANÁLISE DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS TOTAIS	49

4.3	EXPERIMENTO II- EFEITO INDIRETO DO ALUMÍNIO	52
4.3.1	NÚMERO E PESO SECO DE NÓDULOS	53
4.3.2	PESO SECO DA RAÍZ E DA PARTE AÉREA	56
4.3.3	ANÁLISE DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS TOTAIS	59
4.4	EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DO EFEITO DIRETO E INDIRETO DO ALUMÍNIO	61
4.4.1	NÚMERO E PESO SECO DOS NÓDULOS	63
4.4.2	PESO SECO DA RAÍZ E DA PARTE AÉREA	66
4.4.3	ANÁLISE DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS TOTAIS	68
4.4.4	ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS EM HPLC	72
5	CONCLUSÕES	79
6	RESUMO	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

É bem conhecido o fato de serem comumente ácidos os solos das regiões tropicais e subtropicais úmidas, sendo que em muitas delas a presença de altos teores de alumínio trocável, associados a valores de baixo pH, é uma constante. No Brasil este problema é particularmente importante, tendo em vista a grande área de cerrado com problemas de toxicidade, para onde as fronteiras agrícolas se expandiram (OLMOS e CAMARGO, 1976).

De acordo com dados publicados pela imprensa, o Brasil é o segundo produtor mundial de soja, tendo produzido 18 milhões de toneladas deste grão em 1987. Segundo FREIRE (1976), as áreas de cultivo de soja no Brasil estão localizadas principalmente em regiões onde a acidez do solo e a toxicidade do alumínio podem limitar o crescimento das plantas. A correção da acidez, pela aplicação de cálcio na parte arável do solo, não corrige a acidez do subsolo, e a aplicação de cálcio no subsolo não é economicamente praticável.

Trabalhos sobre o comportamento de plantas de soja e de seu microorganismo simbiote, *Bradyrhizobium japonicum*, têm sido realizados por muitos pesquisadores. FREIRE (1976) obteve ótima nodulação de plantas de soja que cresceram em solos ácidos (pH 4.0-4.5) do Rio Grande do Sul, porém com adequado suprimento de nutrientes e sem teores tóxicos de alumínio. MUNNS et al. (1981), trabalhando com plantas de soja em solução nutritiva, observaram que o crescimento das plantas não foi afetado pelo pH baixo (4.5), mas foi diminuído por 30 e 65 μM de alumínio. Os autores sugerem que a sensibilidade da planta ao alumínio, maior do que a nodulação, parece ter sido o fator limitante do crescimento e da fixação de

N_2 . Porém, ALVA et al. (1987), após trabalharem com plantas de soja em solução nutritiva, concluíram que a nodulação foi mais sensível à acidez e ao alumínio do que o crescimento da planta.

Segundo FOY (1976), a toxidez causada pelo alumínio é especialmente prejudicial nos solos ácidos, porque restringe a profundidade das raízes e sua ramificação, o que causa um decréscimo na tolerância à seca e no uso dos elementos minerais do subsolo. Entretanto, poucas informações existem em relação ao efeito do alumínio sobre a fixação biológica do nitrogênio em plantas de soja quando este íon está presente nos solos ácidos. Tais informações podem ser importantes, uma vez que os nódulos se concentram na região basal do sistema radicular em *Vigna* (KHANNA-CHOPRA et al., 1984) e em soja (L. SODEK, comunicação pessoal).

Assim, com o objetivo de avaliar indiretamente o efeito do alumínio sobre a fixação biológica do nitrogênio em plantas de soja, simulando calagem superficial de solos ácidos, este trabalho foi conduzido em duas etapas. A primeira foi desenvolvida com o objetivo de analisar o efeito direto do alumínio sobre a capacidade da planta em fixar o nitrogênio. A segunda foi designada para mostrar o efeito do alumínio presente somente na parte apical do sistema radicular. Em ambos os casos, o alumínio foi adicionado antes do início da nodulação, para verificar seu efeito sobre o processo e também após a nodulação plena, para verificar o efeito sobre a atividade do nódulo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ALUMÍNIO NO SOLO

A presença de altas concentrações de alumínio solúvel no solo pode ser considerada como um dos principais fatores limitantes do desenvolvimento vegetal. GOODLAND (1971) cita o alumínio como sendo o terceiro elemento mais abundante na litosfera, ficando atrás somente do oxigênio e do silício. Segundo o autor, nos solos de cerrado predominam as argilas caulinita e gibsitita, as quais apresentam altos teores de alumínio.

A toxidez do alumínio é particularmente severa em solos com pH abaixo de 5.0 mas o elemento pode ocorrer em concentrações tóxicas em pH ao redor de 5.5 (FOY, 1976).

A aplicação de calcáreo no solo, com o objetivo de elevar o pH a níveis superiores e deste modo insolubilizar o alumínio, é uma prática recomendada, porém limitada por fatores de ordem mecânica e econômica. A ausência de um sistema radicular profundo, causada pela presença de alumínio nos horizontes subsuperficiais, abaixo de 15-20 cm da superfície do solo (camada arável), torna-se responsável pela maior susceptibilidade à deficiência de água, tanto mais grave nos erráticos períodos de estiagem, durante o ciclo vegetativo das plantas cultivadas (OLMOS e CAMARGO, 1976) e pela menor capacidade da planta de utilizar os nutrientes do solo (FOY, 1974). As interações do alumínio com elementos essenciais à planta, são frequentemente mencionados na literatura. SANTANA e BRAGA (1977) observaram que as concentrações de P, Ca e Mg na parte aérea de plantas de arroz,

diminuía com o aumento da concentração de alumínio no solo. JAMES et al. (1978) concluíram que a deficiência de fósforo, induzida pelo alumínio, reduzia o crescimento de abeto vermelho na Escócia, devido à correlação negativa que ocorria entre o crescimento das raízes (enrolamento das raízes causado pelo alumínio) e a concentração de alumínio nas folhas. HELYAR (1978) observou que os efeitos de toxicidade do alumínio foram grandemente associados com a interferência deste elemento no metabolismo de fósforo e com a ligação do alumínio às pectinas da parede celular das raízes, o que provocava a parada de alongamento. ALAM e ADAMS (1980) encontraram que o alumínio induzia deficiência de ferro em aveia e propuseram que o alumínio interferia com a redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} dentro da planta, um processo essencial para o metabolismo normal do ferro. As interações do alumínio com o cálcio foram relatadas em plântulas de pêsego, onde a toxicidade do alumínio reduz a absorção de cálcio, mas não seu transporte (EDWARDS e HOSTON, 1977). AWAD et al. (1976) e SIMPSON et al. (1977) atribuíram o pequeno crescimento de plantas de alfafa e gramíneas à interação alumínio/cálcio. BRUCE et al. (1988) encontraram que a deficiência de cálcio no solo foi a primeira limitação do crescimento de raízes de plantas de soja, apesar da alta saturação de alumínio e do baixo pH dos solos onde o experimento foi realizado. Eles sugerem que a toxidez do alumínio poderia estar induzindo, através do aumento da força iônica da solução destes solos, à deficiência de cálcio. KRIZEK e FOY (1988) relatam que o estresse de alumínio provocou uma diminuição nas concentrações de P, Ca e Mg e um aumento nas concentrações de Zn, Sr e Ba na parte aérea de dois cultivares de cevada, um tolerante e outro sensível ao alumínio, crescendo em subsolo ácido. NOBLE e SUMNER (1988) obtiveram uma relação altamente significativa entre os níveis de cálcio na parte aérea e nas raízes de dois cultivares de soja. O aumento da concentração de alumínio na solução nutritiva diminuiu significativamente as concentrações de Ca, bem como as concentrações de Mg, P e Mn na parte aérea das plantas de todos os tratamentos. Deste modo, observa-se

que o alumínio, indiretamente acarreta severos danos ao desenvolvimento normal do vegetal.

2.2 EFEITOS DO ALUMÍNIO NA PLANTA

Os sintomas de toxicidade do alumínio não são sempre facilmente identificados (FOY et al., 1978). Em muitas plantas, os sintomas foliares lembram aqueles de deficiência de fósforo (folhas atrofiadas, verde escuro, pequenas e com maturidade tardia; caules, folhas e nervuras foliares de cor púrpura e extremidades foliares mortas ou amarelecidas). Entretanto, para outras, eles aparecem como uma deficiência de cálcio ou deficiência no transporte de cálcio (folhas jovens enroladas ou com os bordos ondulados e colapso dos pontos de crescimento). As pontas das raízes e raízes laterais ficam engrossadas e tornam-se amarronzadas. O sistema radicular, como um todo, toma uma aparência coraliforme. Tais raízes são ineficientes na absorção de nutrientes e água. Assim, plantas crescendo em solos cujas camadas de subsolo são fortemente ácidas, sempre sofrem mais o problema da seca, agravadas pelo alumínio. O alumínio também pode reduzir o uso da água, mesmo quando a zona da raiz está úmida. Plantas de algodão, afetadas pela toxicidade de alumínio, algumas vezes murcham quando cultivadas em solução nutritiva, especialmente em presença de altas temperaturas (FOY, 1983). Em geral, plantas jovens são mais sensíveis à toxicidade do alumínio do que as plantas mais velhas (THAWORUWONG e VAN DIEST, 1974). SARTAIN e KAMPRATH (1977), analisando a presença de nutrientes em plantas de soja submetidas a diferentes concentrações de alumínio, encontraram que a concentração de fósforo na parte aérea não foi afetada pela alta concentração de alumínio, enquanto que, nas raízes, a concentração de fósforo foi tanto mais alta quanto maior a concentração de alumínio. Os nódulos tinham maior concentração de fósforo, do que as outras partes da planta. A parte aérea possuía as concentrações mais altas de cálcio

enquanto que os nódulos, as mais baixas. O alumínio não afetou a concentração de magnésio na parte aérea e nas raízes primárias. À medida que se aumentou a concentração de alumínio, a concentração de magnésio nos nódulos diminuiu. Os autores concluem que as respostas de crescimento de plantas de soja à redução de saturação de alumínio parece ser devido aos efeitos do pH e/ou ao suprimento de cálcio, elemento necessário para a iniciação dos nódulos.

Para as plantas, em geral, o excesso de alumínio interfere com a divisão celular nas pontas das raízes e raízes laterais, aumenta a rigidez da parede celular por ligar-se com as pectinas, reduz a replicação do DNA por aumentar a rigidez da dupla hélice, fixa o fósforo em formas menos disponíveis no solo e na superfície das raízes das plantas, diminui a respiração radicular, interfere com enzimas da fosforilação dos açúcares e da deposição de polissacarídeos na parede celular e interfere com a absorção, transporte e uso de elementos essenciais tais como Ca, Mg, K, P, e Fe (FOY, 1974, 1983; FOY e FLEMING, 1978). SANTORO et al. (1984), trabalhando com plântulas de milho em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de alumínio, observaram baixo conteúdo de nitrato e uma queda de atividade da redutase de nitrato nas folhas. Os autores sugerem que existiria um efeito do alumínio sobre as membranas celulares causando uma inibição do sistema de absorção de nitrato e conseqüentemente baixa atividade da enzima. Além disso o alumínio induziria o acúmulo de N reduzido dentro das folhas o que poderia ser o resultado de uma combinação de efeitos: diminuição da síntese e aumento da degradação de proteínas, devido ao desequilíbrio do metabolismo de nitrogênio nas células da folha. Íons metálicos, tais como o alumínio, formam fortes complexos com ácidos nucléicos. MATSUMOTO et al. (1979) encontraram o alumínio ligado ao fósforo do DNA. ULMER (1979, apud FOY, 1983) observou que em cultivares de trigo sensíveis, o alumínio causou inibição do crescimento das raízes e inibição da síntese de DNA. McLEAN (1979, apud FOY, 1983) observou que o alumínio causou uma distribuição anormal de ribossomas sobre o retículo endoplasmático

das células de raiz de cevada e sugere a interferência do alumínio com a síntese de proteínas.

Muitos efeitos do alumínio na planta estão provavelmente associados com a alteração da estrutura e função das membranas das raízes. As membranas celulares dos vegetais segundo o modelo mosaico fluido, são visualizadas como arranjos semifluidos de lipídeos e proteínas, os quais podem ser afetados pelo alumínio. VI-ERSTRA e HANG (1978) relatam que o alumínio diminuiu a fluidez lipídica nas membranas celulares de *Thermoplasma acidophilum*. Uma solução de 270 ppm de alumínio produziu mudanças drásticas, mas os efeitos foram também detectáveis com somente 0.27 ppm de alumínio em pH 4.0. GOMES-LEPE et al. (1979) relatam que o alumínio ligou-se às proteínas da membrana celular no interior das células epidérmicas de cebola. CAMPBELL et al. (1989) concluíram que níveis tóxicos de alumínio podem causar severa redução na produção de alfafa (*Medicago sativa* L.). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as plantas tratadas em solos com diferentes concentrações de alumínio e as plantas estudadas em solução nutritiva. Em ambos os tratamentos, altas concentrações do íon reduziram o vigor e a produção das plantas.

2.3 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO

Muitos trabalhos têm mostrado que espécies de plantas e variedades dentro de espécies diferem grandemente na tolerância ao excesso de alumínio no meio de crescimento. O mecanismo fisiológico exato de tolerância ao alumínio, contudo, é controverso. Ele pode ser controlado por diferentes genes, através de diferentes caminhos bioquímicos, em diferentes plantas. EPSTEIN (1969) descreve que um elemento presente em excesso pode interferir com o metabolismo vegetal via competição por absorção, inativação de enzimas, deslocamento ou substituição de elementos dos seus sítios funcionais.

Obviamente, plantas tolerantes ao alumínio podem ou prevenir a absorção de excesso de alumínio, ou desintoxicar o alumínio após ele ter sido absorvido. Segundo FOY (1983), plantas tolerantes ao alumínio podem ser divididas em três grupos, quanto ao teor de alumínio que acumulam na parte aérea. No primeiro grupo, estão incluídas as plantas tolerantes que não diferem das sensíveis quanto à concentração de alumínio na parte aérea, mas as raízes destas plantas contêm menos alumínio. São consideradas como pertencentes a esse grupo vários cultivares de trigo, cevada, soja, feijão-vagem e ervilha. Tem sido sugerido um mecanismo de exclusão do Al^{+3} para este tipo de tolerância. O segundo grupo inclui plantas onde a tolerância ao alumínio está associada com baixos níveis de Al^{+3} na parte aérea e/ou bloqueio de excesso de alumínio nas raízes. Cultivares de arroz, alfafa, milho, centeio e batata são considerados exemplos deste grupo. Plantas cuja tolerância ao alumínio está diretamente associada com o acúmulo de alumínio na parte aérea e assim tais plantas têm alta tolerância interna ao alumínio, constituem o terceiro grupo. Exemplo de plantas acumuladoras de Al^{+3} são o salgueiro, o pinheiro, bétula e o chá.

MUZILLI et al. (1978) procuraram identificar, em condições de campo, os valores-limite da "porcentagem de saturação em alumínio" dos solos, para dez cultivares de soja, visando quantificar a tolerância dos cultivares à acidez. Eles constataram uma reação variável à calagem, existindo cultivares mais sensíveis à acidez, e conseqüentemente mais exigentes em calcário, até cultivares que não apresentaram reação significativa à calagem. A identificação de graus de tolerância à acidez, obtida pela produção de grãos, evidenciou cultivares muito sensíveis [limite de saturação de $Al^{+3} < 10\%$] até tolerantes [limite de saturação de $Al^{+3} = 21$ a 25%]. O cultivar Santa Rosa, foi caracterizado como medianamente tolerante, suportando de 16 a 20% de saturação de alumínio na camada arável do solo.

A tolerância ao alumínio, tem sido associada com mudanças do pH na zona da raiz (FOY e FLEMING, 1978; FOY et al., 1978; WAGATSUMA e YAMA-

1985), bloqueio do alumínio em sítios não metabólicos dentro da planta (SIEGEL e HAUG, 1983; LARKIN, 1987), eficiência do uso do fósforo (CLARKSON, 1966; ANDREW e VANDEN BERG, 1973; CAMBRAIA e CALBO, 1980), eficiência na absorção e transporte de cálcio e magnésio (CALBO, 1978), tolerância ou preferência ao NO_3^- ou NH_4^+ (RAVEN e SMITH, 1976; MARCUS-WYNER e RAINS, 1982; TOLLEY-HENRY e RAPER Jr., 1986) e conteúdo de ácidos orgânicos (LEE e FOY, 1986; SUH AYDA e HAUG, 1986).

Um resumo sobre os mecanismos de tolerância à toxidez de alumínio em plantas é apresentado por CAMBRAIA (1989).

2.4 EFEITOS DO ALUMÍNIO SOBRE A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de verificar o comportamento de diferentes espécies dependentes da fixação biológica do dinitrogênio, quando tratadas com alumínio. Os resultados têm sido, muitas vezes, contraditórios. SILVA (1981), trabalhando com *Stylosanthes guianensis*, uma forrageira que ocorre predominantemente no Brasil Central e Nordeste, observou uma queda de 40% no crescimento da parte aérea da planta, metade do teor de N-total e redução de 1/5 da fixação de nitrogênio nas plantas tratadas com 9 e 12 ppm de alumínio, em solução nutritiva. OGATA et al. (1986) obtiveram resultados diversificados ao trabalharem com quatro leguminosas forrageiras tropicais e uma de região temperada. Eles consideraram que a concentração crítica de alumínio que afetava a fixação de N_2 foi de cerca de 20 ppm em algumas leguminosas de pastagem tropical, exceto para *Macroptilium atropurpureum*, na qual 100 ppm de alumínio na solução nutritiva não teve nenhum efeito adverso. Os autores sugerem que o efeito de toxicidade do alumínio na planta afeta mais a fixação de N_2 através de sua ação nos nódulos, do que o crescimento da própria planta.

MUNNS et al. (1981), trabalhando com cultivares de soja em solos ácidos contendo diferentes concentrações de alumínio, encontraram evidências de que a acidez do solo pode diminuir o crescimento das plantas de soja supridas com nitrogênio mineral ou dependentes da fixação de N_2 , porque a limitação efetiva do crescimento e da fixação de nitrogênio é a susceptibilidade da planta à toxicidade do alumínio. De acordo com os autores, o crescimento pobre das plantas de soja em solos com baixo pH não foi devido à deficiência de nitrogênio, como sugerem alguns trabalhos (ALBRECHT e DAVIS, 1929; FRED et al., 1938), nem ao fracasso da nodulação (MENGEL e KAMPRATH, 1978), mas pode ser atribuído simplesmente à sensibilidade da planta ao alumínio. Entretanto, ALVA et al. (1987) estudando os fatores de infertilidade dos solos ácidos sobre o crescimento e nodulação de plantas de soja, encontraram que 5 a 9 μM de alumínio foram concentrações críticas para o crescimento da raiz e parte aérea das plantas estudadas, enquanto que 0.4 μM de alumínio já afetava muito o número e peso da matéria seca dos nódulos. Os autores concluem que a nodulação foi muito mais sensível do que foi o crescimento da planta inteira, à toxicidade do alumínio. Conclusões semelhantes foram também relatadas por CARVALHO et al. (1982) e MURPHY et al. (1984).

A ação do alumínio sobre a fixação biológica do nitrogênio tem sido também correlacionada com seu efeito sobre o microorganismo simbiote. FREIRE (1976), estudando o comportamento de plantas de soja e do *Bradyrhizobium japonicum*, observou que o pH baixo do solo, isoladamente, não prejudicou a nodulação nem o rendimento das plantas. Porém, estas plantas tiveram ótima nodulação em solos ácidos quando supridas de nutrientes e sem teores tóxicos de alumínio e/ou manganês. Segundo o autor, teores tóxicos destes elementos em conjugação com a deficiência de fósforo e de cálcio são altamente prejudiciais para a formação e/ou funcionamento dos nódulos. KEYSER e MUNNS (1979a) encontraram que a toxicidade do alumínio e a acidez do solo foram mais importantes do que a toxicidade do manganês e a deficiência de cálcio na limitação do crescimento do

Rhizobium sp. de caupi e *Bradyrhizobium japonicum* de soja. As concentrações de alumínio de 0.68 e 1.35 ppm produziram um estresse mais severo do que alta concentração de manganês (10.8 ppm), ou a baixa concentração de cálcio (2 ppm). Além disso, a adição de 0.2 a 40 ppm de cálcio não protegeu as linhagens estudadas da toxicidade do alumínio.

Em outro estudo, KEYSER e MUNNS (1979b) relatam que 1.35 ppm de alumínio foi mais prejudicial ao *Bradyrhizobium japonicum* do que foi o baixo pH (4.5) ou a baixa concentração de fósforo (0.3 ppm). Assim, pode-se observar que o alumínio causa prejuízo à fixação biológica do nitrogênio tanto por afetar a absorção e transporte de elementos essenciais na planta inteira, como por afetar o crescimento do microorganismo e/ou sua infecção. Segundo FOY (1983), o processo simbiótico de fixação de nitrogênio é aparentemente menos sensível ao alumínio do que é o processo de formação dos nódulos.

SARTAIN e KAMPRATH (1975) avaliaram o efeito da calagem em solos com alta concentração de alumínio sobre o crescimento da raiz, da parte aérea e da nodulação de plantas de soja e constataram que a calagem promoveu a formação de um grande número de raízes laterais e que a nodulação foi bem significativa. O aumento do número de nódulos foi altamente correlacionado com o conteúdo de cálcio das raízes primárias. Segundo os autores, o conteúdo de fósforo, maior após a calagem, também influenciou no aumento do número de nódulos. MENGEL e KAMPRATH (1978) observaram que o crescimento da parte aérea de plantas de soja, cultivadas em oito diferentes tipos de solo orgânico na Carolina do Norte, foi significativamente relacionado ao pH do solo entre 4.0 e 5.0. Com o aumento do pH, o número e peso da matéria seca dos nódulos e o conteúdo de nitrogênio total das plantas aumentava marcadamente. O pH crítico para o crescimento da parte aérea, raízes e nódulos ficou entre 4.6 e 4.8. A resposta de crescimento obtida através da calagem foi atribuída à diminuição do conteúdo de alumínio trocável e solúvel em água, ao aumento da concentração de cálcio solúvel em água e à

condição favorável do pH para o crescimento do *Bradyrhizobium japonicum*.

2.5 AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A diminuição da nodulação e atividade dos nódulos em leguminosas por um ambiente estressante pode induzir a deficiência de nitrogênio e limitar o crescimento da planta. Por outro lado, a diminuição do crescimento da planta por um ambiente estressante pode limitar a nodulação e fixação de nitrogênio. Segundo MUNNS et al. (1981), as investigações têm sido feitas quase sempre ignorando a distinção entre estas duas afirmativas. O autor ressalta a necessidade de se fazer pelo menos uma distinção simples entre elas. Em ambos os casos, existirá menor crescimento do vegetal, menor nodulação, pouca produção de nitrogênio e diminuição da fixação de N_2 . Porém, se a baixa fixação de N_2 é limitante do crescimento, existirá também evidências de deficiência de nitrogênio, como por exemplo, folhas amareladas é uma resposta positiva de deficiência de nitrogênio. Plantas controle, adubadas com nitrogênio mineral, serão menos afetadas do que plantas simbióticas se o estresse, primariamente, impedir a fixação.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito de fatores ambientais estressantes em leguminosas. A metodologia utilizada é variada, porém o uso de plantas cultivadas em solução nutritiva tem sido uma constante. IMSANDE e RALSTON (1981) descrevem um meio de crescimento em solução nutritiva bem tamponada para suportar o crescimento de plantas de soja. De acordo com os autores, este método não impediu a nodulação e tornou mais rápido e prático o ensaio de redução de acetileno, para medir a fixação biológica do nitrogênio. Através deste método os autores puderam, mais tarde, avaliar o efeito do nitrato sobre a fixação de N_2 , onde o nitrato restringiu o desenvolvimento dos nódulos, mas não inibiu apreciavelmente a atividade ou síntese da nitrogenase nos

nódulos já formados (RALSTON e IMSANDE, 1983). IMSANDE (1988), em trabalho realizado em solução nutritiva, sugere que a demanda de nitrogênio e a taxa fotossintética, e não a floração, são os maiores fatores na determinação do início da nodulação e da rápida fixação de N_2 durante a fase reprodutiva em soja.

Os trabalhos sobre o efeito do alumínio na fixação biológica de nitrogênio mostram que a presença deste elemento no solo reduz o pH, diminui a disponibilidade de Ca, Mg, P e Mo no solo, o que pode limitar a nodulação e o funcionamento dos nódulos (MUNNS et al., 1981; FRANCO E MUNNS, 1982; ALVA et al., 1986a; SUTHIPRADIT e ALVA, 1986; ALVA et al., 1987).

A avaliação da fixação biológica do nitrogênio tem sido realizada usando-se parâmetros tais como número e peso da matéria seca dos nódulos, crescimento da planta inteira e produção de grãos, geralmente acompanhados de análise do conteúdo total de nitrogênio, presença de compostos nitrogenados na seiva do xilema ou redução de acetileno (STREETER, 1972; PATE, 1973; MATSUMOTO et al., 1976; 1977a; 1977b; 1977c; STREETER, 1979; PATE, 1980; PATE et al., 1980). Uma análise dos compostos nitrogenados, transportados pela corrente transpiratória em algumas leguminosas, tem sido muito útil para avaliar a fixação de nitrogênio, uma vez que a natureza destes compostos está estreitamente relacionado com a atividade da nitrogenase. Assim, um exame do conjunto de solutos nitrogenados de plantas de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) e caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) revelam que os ureídeos, alantoina e ácido alantóico, são os produtos específicos da fixação biológica do nitrogênio (OHYAMA e KAMAZAWA, 1979), responsáveis pelo transporte de aproximadamente 80% do nitrogênio fixado nos nódulos, em plantas totalmente simbióticas. Por outro lado, os ureídeos estão presentes somente em pequenas quantidades em plantas não noduladas e dependentes de nitrogênio mineral (MATSUMOTO et al., 1976; HERRIDGE et al., 1978); quando o aminoácido asparagina (ASN), torna-se o composto nitrogenado predominante (PATE et al., 1977). Estas observações sugerem que a abundância

de ureídeos, pode refletir a dependência simbiótica da planta e proporcionar um ensaio quantitativo da fixação biológica do nitrogênio “in situ” (McCLURE et al., 1980; HERRIDGE, 1982).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste estudo, foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max (L.) Merril, cv. Santa Rosa*), cedidas pelo IAC (Instituto Agronômico de Campinas, SP), e reproduzidas em canteiro experimental no Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP.

No início de cada experimento, as sementes foram previamente selecionadas, quanto a uniformidade, lavadas em água destilada e colocadas para germinar em vasos plásticos de 3 litros de capacidade, contendo vermiculita como substrato.

Após a germinação, as plantas de soja foram cultivadas em casa de vegetação, em condições naturais de radiação luminosa e temperatura.

Quando a parte aérea das plântulas atingia o estágio de desenvolvimento correspondente a abertura total de cotilédones, (estádio denominado V_0 , Tabela 1), estas foram retiradas do substrato, as raízes lavadas e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho. Posteriormente as plantas foram transferidas para os tratamentos.

Tabela 1 - Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), citadas neste estudo, segundo FEHR et al., (1971).

Estádios	Descrição
V ₀	cotilédones abertos
V ₁	folha primária "aberta"
V ₂	1ª folha trifoliolada "aberta"
V ₃	2ª folha trifoliolada "aberta"
R ₁	uma flor aberta
R ₄	vagem de 2cm num dos 4 nós mais altos com folha "aberta"
R ₅	início do desenvolvimento das sementes

3.2 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

A composição das soluções nutritivas usadas como suprimentos nutricionais das plantas foi:

a) Solução nutritiva sem nitrogênio

Macronutrientes	(concentração final)
KH_2PO_4	0,2mM
K_2SO_4	0,4mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4mM
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,4mM

Micronutrientes	(concentração final)
H_3BO_4	5,72µg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3,62µg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44µg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,16µg/l
H_2MoO_4	0,04µg/l

<i>Fe - EDTA</i>	(concentração final)
<i>FeSO₄.7H₂O</i>	5,0mg/l
<i>EDTA.Na₂</i>	6.6mg/l

b) Solução nutritiva sem nitrogênio e baixa concentração de fósforo

Macronutrientes	(concentração final)
<i>KH₂PO₄</i>	0,05mM
<i>K₂SO₄</i>	0,4mM
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	1,0mM
<i>CaSO₄.2H₂O</i>	1.0mM

Foram mantidas as mesmas concentrações de micronutrientes, inclusive Fe-EDTA, da solução nutritiva sem nitrogênio (item 3.2a).

Até a nodulação das plantas em cada tratamento, as soluções nutritivas recebiam também:

- 5 ml/l de solução nutritiva completa de HOAGLAND E ARNON (1950), para fornecer 75 μ M de NO_3^- .

- 1 ml/l de uma solução contendo 201,7 mg/l de $CoCl_2$ para fornecer 0,05 ppm de cobalto.

c) Solução de alumínio

Nos tratamentos com alumínio, a solução nutritiva sem nitrogênio e baixa concentração de fósforo (item 3.2.b) continha 2, 5 ou 10 ppm de alumínio, adicionado sob a forma de $AlK(SO_4)_2.12H_2O$.

d) Ajuste do pH

O pH da solução nutritiva sem nitrogênio foi mantido entre 6.0 e 7.0 pela adição de KOH 0.1 M, enquanto que o pH das soluções nutritivas sem nitrogênio e baixa concentração de fósforo, com ou sem alumínio, foi mantido em 4.0 ± 0.1 pela adição de H_2SO_4 0.1 N.

Durante toda a fase experimental o pH das soluções nutritivas foi medido diariamente e, sempre que necessário, ajustado aos valores iniciais.

3.3 INOCULAÇÃO DAS PLANTAS

Para o cultivo em hidropônica, a inoculação foi feita antes do início de cada tratamento. As plântulas foram selecionadas e suas raízes lavadas (item 3.1.). A seguir, as raízes foram lentamente mergulhadas em 50 ml de inóculo de *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe SMS 463, fornecido pelo IAC) e em seguida preparadas para o cultivo em hidropônica.

No cultivo em vermiculita/hidropônica (ver item 3.4b), as plantas foram inicialmente transferidas para sacos plásticos pretos, contendo vermiculita, e a inoculação feita quando as raízes atingiram o fundo do saco, ou seja, a superfície da água do sistema hidropônico inferior. Quando isto ocorreu, foi espalhado sobre a vermiculita (que servia de substrato para cada planta), 2 ml de inóculo de *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe SMS 463, fornecido pelo IAC) e em seguida 5 ml de água destilada para ajudar na dispersão do inóculo. Logo após, a água dos vasos foi substituída pelas soluções nutritivas de cada tratamento.

3.4 SISTEMAS DE CULTIVO

Para avaliar o efeito direto e indireto do alumínio sobre o desenvolvimento das plantas de soja, foram utilizados 2 sistemas de cultivo:

a - Cultivo em Hidropônica

Com o objetivo de avaliar o efeito direto do alumínio sobre a fixação biológica do nitrogênio em plantas de soja, foi escolhida a técnica de cultivo em solução nutritiva.

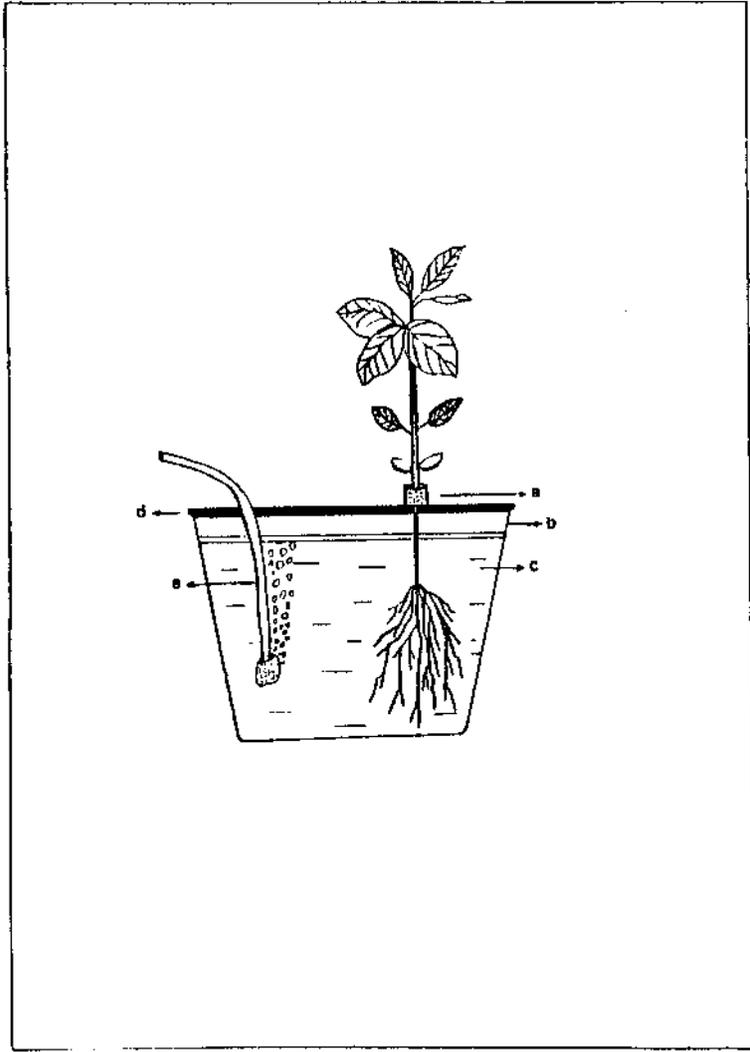
Inicialmente, cada plântula, após ter sido selecionada e inoculada (item 3.1. e 3.3.), teve o seu hipocótilo enrolado com uma tira de espuma e colocada em um anteparo de plástico contendo 2 aberturas, uma para a planta e outra para entrada do tubo de aeração contínua. Este anteparo foi então colocado sobre um vaso plástico de 3 litros de capacidade, contendo as respectivas soluções nutritivas (Figura 1). As soluções nutritivas foram renovadas 3 vezes por semana e seus pHs ajustados diariamente.

b - Cultivo em Vermiculita/Hidropônica

Para avaliar o efeito indireto do alumínio, foi escolhida a técnica de cultivo em vermiculita/hidropônica, uma vez que o cultivo das plantas em duas soluções nutritivas não era tecnicamente viável.

Figura 1 - Ilustração do sistema de cultivo usado para analisar a resposta da planta ao efeito direto do alumínio.

- a - tira de espuma
- b - vaso plástico
- c - solução nutritiva
- d - placa de isopor
- e - tubo de aeração contínua



Esta técnica, consiste em submeter o sistema radicular a dois tratamentos diferentes ao mesmo tempo e, deste modo, simular a calagem superficial de solos ácidos.

As plântulas foram selecionadas e transplantadas para sacos plásticos pretos de 25 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. Estes sacos foram inicialmente preenchidos com pedra tipo brita nº 0 (5 cm), posteriormente com vermiculita lavada (20 cm) e perfurados na base para permitir a passagem das raízes. Cada saco plástico contendo 1 planta foi colocado dentro de um cilindro de PVC, aberto em ambas as extremidades (para sustentação) e pendurados sobre vaso plástico de 3 litros de capacidade.

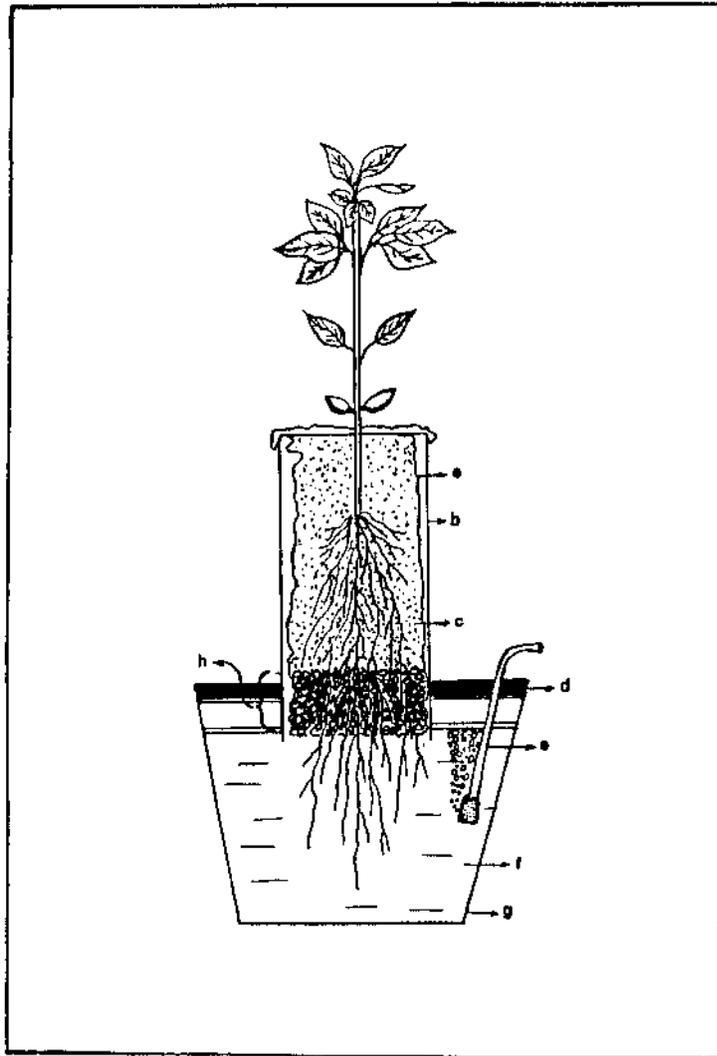
Os vasos plásticos foram mantidos com água até o aparecimento das raízes, quando as plantas foram inoculadas (item 3.3.) e receberam as respectivas soluções nutritivas.

Sobre a vermiculita, a cada 2 dias foram colocados 50 ml de água, até o início dos tratamentos. Para evitar o desenvolvimento de microrganismos nas soluções contidas nos vasos, estes foram tampados com placas de isopor contendo uma abertura maior, onde era encaixado o cilindro de PVC e outra menor, onde passava o tubo de aeração contínua (Figura 2).

Após iniciados os tratamentos, as soluções foram renovadas 3 vezes por semana, e o pH ajustado diariamente. Para evitar contaminação da solução do vaso inferior pela solução aplicada na parte superior do sistema, durante as trocas, foi utilizada a seguinte técnica:

Figura 2 - Ilustração do sistema de cultivo usado para analisar a resposta da planta ao efeito indireto do alumínio.

- | | |
|---------------------|------------------------------|
| a - saco plástico | e - tubo de aeração contínua |
| b - cilindro de PVC | f - solução nutritiva |
| c - vermiculita | g - vaso plástico |
| d - placa de isopor | h - pedra nº 0 |



– sobre a vermiculita colocava-se 150 ml da solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7;

– após 15 minutos retirava-se a solução nutritiva, os vasos eram lavados e preenchidos com água;

– após 1 hora a água era substituída por solução nutritiva.

Deste modo, o excesso de solução colocada na vermiculita percolava, passando para a água. Ao mesmo tempo, a parte apical das raízes de cada tratamento era lavada, antes de receber a solução nutritiva.

3.5 CONTROLE FITOSSANITÁRIO

O controle fitossanitário das plantas de soja foi feito utilizando soluções de DECIS (0,3 ml/l) e HOSTATION (0,5 ml/l) em duas pulverizações sucessivas, no intervalo de três dias, sempre que necessário.

3.6 EXPERIMENTO PRELIMINAR: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO

3.6.1 CULTIVO DAS PLANTAS

Após obtenção do material vegetal conforme item 3.1., foram selecionadas 20 plântulas. Estas foram inoculadas (item 3.3.) e cada uma delas foi então transferida para vasos plásticos, com capacidade de 3 litros, contendo solução nutritiva.

Durante as duas primeiras semanas, todas as plantas foram mantidas em solução nutritiva desprovida de nitrogênio e pH 6-7.

Quando as plantas atingiram o estágio V_2 , época do início da nodulação, foram testadas três concentrações de alumínio: 2, 5 e 10 ppm, adicionado à solução nutritiva sem nitrogênio e com baixa concentração de fósforo. Grupos de 4 plantas receberam cada um destes tratamentos. Quatro plantas foram mantidas com

solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7 e quatro receberam solução nutritiva sem nitrogênio, com baixa concentração de fósforo e pH 4.0 mas, sem alumínio.

A escolha de duas formas de controle teve como objetivo avaliar o comportamento das plantas sob condições ideais para a fixação biológica de nitrogênio, com bom suprimento de fósforo, para o crescimento em hidroponia e pH entre 6.0 e 7.0 (IMSANDE e RALSTON, 1981), e sob condições de acidez do solo, porém sem alumínio.

3.6.2 COLETA DO EXSUDATO DA SEIVA DO XILEMA

A coleta do exsudato foi feita 75 dias após a semeadura, quando as plantas atingiam o estágio R_5 . Os caules das plantas de cada tratamento foram seccionados com um estilete logo abaixo do ponto de inserção das folhas cotiledonares, tomando-se o cuidado de não macerar os tecidos durante o corte. O local cortado foi lavado com água destilada e seco com papel de filtro. A seguir, o exsudato do xilema foi coletado através de tubos capilares com capacidade de 10 μ l, de acordo com SAWAZAKI (1986), no período entre 11:00 e 13:00 horas. O material coletado foi imediatamente transferido para frascos de vidro com capacidade de 10 ml e mantidos à 0°C, em banho de gelo. Após a coleta, os frascos contendo o exsudado de cada planta foram armazenados à - 20°C, para análises posteriores.

3.6.3 COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL VEGETAL

Inicialmente, os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em placas de Petri. As raízes, a parte aérea (caule e pecíolos) e folhas foram separadas e colocadas em sacos de papel. Todos estes materiais foram levados para estufa de circulação forçada, a 80°C por 48 h, para obtenção do peso da matéria seca, determinado em uma balança MARTE Mod. A200.

3.7 EXPERIMENTO 1: EFEITO DIRETO DO ALUMÍNIO

O material vegetal e os procedimentos de montagem seguiram a metodologia descrita nos itens 3.1. e 3.4.a., logo após foram iniciados os seguintes tratamentos:

- a) Controle pH 6-7 (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7)
- b) Controle pH 4.0 (solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo e pH 4.0)
- c) 10ppm de Al^{+3} em V_0 (solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de alumínio no momento da montagem do experimento)
- d) 10ppm de Al^{+3} em V_2 (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7 por uma semana e em seguida a solução foi trocada por solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de alumínio)
- e) 10ppm de Al^{+3} em R_4 (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7 , e nos 7 últimos dias deste experimento, esta solução foi substituída por solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de alumínio).

O tratamento em R_4 objetivou testar o efeito do alumínio em plantas plenamente noduladas.

Para cada tratamento foram utilizadas 4 plantas.

A coleta de exsudato foi feita de modo semelhante àquela descrita no item 3.6.2..

A coleta e análise do material vegetal, incluindo frutos, foram feitas de acordo com o item 3.6.3.

3.8 EXPERIMENTO II: EFEITO INDIRETO DO ALUMÍNIO

Para simular o efeito do alumínio em subsolos ácidos, 20 plântulas obtidas segundo o item 3.1. foram cultivadas conforme o item 3.4.b.

Após a inoculação, a parte apical das raízes de um grupo de 5 plantas recebeu os seguintes tratamentos:

- a) Controle pH 6-7 (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7)
- b) Controle pH 4.0 (solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo e pH 4.0)
- c) 10ppm de Al^{+3} em V_1 (solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de alumínio no início do tratamento)
- d) 10ppm de Al^{+3} em R_4 (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7, e nos 7 últimos dias a solução foi substituída por solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de alumínio).

Sobre a vermiculita de cada pote, onde estavam os primeiros 20 cm de raiz, foi colocado nas duas primeiras semanas de tratamento 150 ml de solução nutritiva sem nitrogênio (item 3.2.), acrescido de 0,05ppm de $CoCl_2$ e 75 μM de NO_3^- . A partir da terceira semana de tratamento, foram suprimidos o cloreto de cobalto e o nitrato. As soluções foram trocadas 3 vezes por semana, usando-se a técnica descrita no item 3.4.b. e, sempre que necessário, foram adicionados 50 ml de água destilada sobre a vermiculita no intervalo das trocas.

A coleta e análise do exsudato e do material vegetal foi iniciada 75 dias após o plantio, conforme itens 3.6.2.e 3.6.3.. Entretanto, como as raízes tiveram tratamentos diferentes, os primeiros 20 cm (que receberam tratamento semelhante em todos os casos), foram separados da parte apical (que receberam tratamentos diferenciados), e os pesos da matéria seca determinados separadamente.

3.9 EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DO EFEITO DIRETO E INDIRETO DO ALUMÍNIO

Este experimento foi montado com o objetivo de avaliar os resultados obtidos nos experimentos I e II, realizados em diferentes épocas do ano.

Foram selecionadas 32 plântulas (item 3.1.). Dezesseis foram imediatamente inoculadas, recebendo os tratamentos em hidroponia, enquanto que as outras dezesseis plantas foram tratadas segundo o item 3.4.b..

Grupos de oito plantas, sendo quatro cultivadas em hidropônica e quatro em vermiculita/hidropônica, receberam os seguintes tratamentos:

- a) Controle pH 6-7 (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7)
- b) Controle pH 4.0 (solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo e pH 4.0)
- c) 10ppm de Al^{+3} em V_0 [hidropônica] e V_1 [vermiculita/hidropônica] (solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de Al^{+3} logo após a inoculação)
- d) 10ppm de Al^{+3} em V_2 [hidropônica] e V_3 [vermiculita/hidropônica] (solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7 por 1 semana e, em seguida, trocada por solução nutritiva sem nitrogênio, baixa concentração de fósforo, pH 4.0 e 10 ppm de Al^{+3})

A coleta e análise do material foi semelhante às descritas nos itens 3.6.2. e 3.6.3.

3.10 ANÁLISE DO EXSUDATO DA SEIVA DO XILEMA

3.10.1 DOSAGEM DE UREÍDEOS TOTAIS

Na determinação dos ureídeos alantoína e ácido alantóico, foi utilizado o método analítico proposto por VOGELS e VAN DER DRIFT (1970).

Seguindo a marcha analítica, foram colocados em tubos de ensaio 0.4 ml do exsudato e o volume completado para 0.75 ml com água destilada. Adicionou-se 0.25 ml de NaOH 0.5 N e uma gota de fenilhidrazina 0.33%. Os tubos foram transferidos para banho maria por 8 minutos (hidrólise alcalina). Após resfriamento em água corrente por 7 minutos, adicionou-se 0.25 ml de HCl 0.65 N e novamente foram levados ao banho maria por 4 minutos (hidrólise ácida). Após a solução ter atingido a temperatura ambiente, foram adicionados 0.25 ml de tampão fosfato pH 7.0 e 0.25 ml de fenilhidrazina 0.33%. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram resfriados à 0°C e adicionados 1.25 ml de HCl concentrado, previamente resfriado a 0°C e 0.25 ml de ferricianeto de potássio 1.65%. Após agitação, o material foi deixado em repouso por 15 minutos. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 535nm, em espectrofotômetro MICRONAL mod. B280.

As concentrações de ureídeos nas amostras foram determinadas a partir de uma curva padrão de alantoína, seguindo o mesmo método analítico, com concentrações até 100 nmoles.ml⁻¹.

3.10.2 DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS TOTAIS

As concentrações de aminoácidos foram determinadas segundo YEMM e COCKING (1955) através de reação colorimétrica com ninhidrina. 0.2ml da amostra foram completados para 1.0 ml com água destilada. Em seguida foram adicionados: 0.5 ml de tampão citrato 0.2 M pH 5.0, 0.2 ml de ninhidrina 5% em etilenoglicol e 1.0 ml de uma solução 2×10^{-4} M de KCN em etilenoglicol. Os tubos foram agitados, tampados com bolinhas de vidro e aquecidos em banho maria por 20 minutos. Após resfriamento em água corrente, o volume foi completado para 4.0 ml com etanol 60%. Em seguida, foram feitas as leituras das absorbâncias a 570 nm.

As concentrações de aminoácidos totais foram determinadas a partir de uma curva padrão de leucina, seguindo-se o mesmo método analítico, usando-se concentrações de até 200 nmoles. ml^{-1} .

3.10.3 DOSAGEM DE AMINOÁCIDOS EM HPLC (HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

A separação dos aminoácidos foi efetuada através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), conforme descrito por NASHOLM et al. (1987), com pequenas modificações.

O cromatógrafo usado consistia de 2 bombas LKB mod. 2150, controladas por um gerador de gradientes LKB mod. 2152. Uma coluna ODS-Hypersil de 250 x 4,6 mm foi usada, sendo os aminoácidos detectados por um monitor de fluorescência mod. RF 530 da Shimadzu, com comprimento de onda de excitação 263 nm e comprimento de onda de emissão 313 nm.

Os solventes usados para formação dos gradientes foram: solvente A constituído de 7 ml de ácido acético e 1 ml de trimetilamina em 1 litro de água destilada, pH 4.2 (ajustado com NaOH 1 N) e solvente B constituído de metanol.

As amostras de exsudato usadas foram obtidas da reunião de 4 repetições de cada tratamento, tendo sido diluídas 10 vezes, de modo a conter cerca de 0.5 a 1μ mol de aminoácido total por ml. Os derivados fluorescentes de aminoácidos foram preparados de acordo com EINARSSON et al.,(1983). Para cada 200μ l de amostra, foram adicionados 50μ l de tampão borato e 250μ l de reagente 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl). Após 45 segundos, o excesso de reagente foi removido com pentano (2 lavagens de 1 ml cada).

A fase aquosa com os aminoácidos derivados, após diluição conveniente, foi aplicada no injetor. Cada injeção correspondia a um volume de 10μ l. O gradiente inicial foi de 45% - 65% de B entre 0 - 20 min. e de 65% - 85% de B entre 20 - 35 min.. A velocidade de fluxo foi de 1 ml/min. O registro foi feito através de um registrador/integrador LKB mod. 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela altura dos picos comparados com a altura dos picos dos 20 aminoácidos usados como padrão.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado durante todo o desenvolvimento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados através de análise de variância e quando o valor "F" foi significativo, os valores foram comparados entre si pelo teste DUNCAN, ao nível de 5% de probabilidade (SNEDECOR, 1965).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO PRELIMINAR: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO

4.1.1 CULTIVO DA SOJA EM HIDROPÔNICA

Foram feitas avaliações preliminares sobre o comportamento das plantas de soja quanto ao seu cultivo em hidropônica, na presença e ausência do alumínio, principalmente com relação à nodulação.

Logo na primeira semana foi observado um amarelecimento nas folhas das plantas, que inicialmente estavam em solução nutritiva com pH 6-7, desprovidas de nitrogênio para promover a nodulação. Esta observação concorda com aquela descrita por FRED et al. (1937), de que leguminosas crescendo em substrato pobre em nitrogênio e dependentes da fixação de N_2 atmosférico frequentemente exibem, durante seu desenvolvimento, um período de "fome" de nitrogênio. Este período ocorre nos estádios iniciais do desenvolvimento da planta, quando as reservas de nitrogênio nas sementes foram exauridos e antes dos centros de fixação, os nódulos, terem se desenvolvido suficientemente para satisfazer a grande demanda de nitrogênio na planta. JONES et al. (1981), sugerem que as reservas cotiledonares não fornecem quantidades suficientes de nitrogênio para promover o máximo de crescimento das plântulas, nestas primeiras semanas, quando os nódulos funcionais ainda não estão estabelecidos. Assim, a partir da segunda semana, foi adicionado $75\mu M$ de NO_3^- à solução nutritiva e este só foi suprimido depois que os nódulos

estavam bem estabelecidos.

A adição de nitrogênio mineral na solução nutritiva, onde estão crescendo plantas inoculadas, não inibe o desenvolvimento dos nódulos aliás, na maioria das vezes, até ajuda o rápido estabelecimento destes. ATKINS et al. (1980) observaram um declínio total na concentração de solutos nitrogenados da seiva do xilema coletada de plantas de caupi noduladas, durante a fase inicial de rápido crescimento. Segundo SCHUBERT (1981), durante esta fase, o desenvolvimento dos nódulos pode ser limitado pelo nitrogênio. Por esta razão, o nitrogênio recentemente fixado poderia estar preferencialmente incorporado dentro do nódulo e, deste modo, diminuir a quantidade de nitrogênio disponível a ser exportado para outras partes da planta. A adição de uma solução contendo nitrogênio, em baixa concentração, durante este período, seria recomendada para aliviar esta deficiência, que afeta diretamente a fixação de N_2 , por retardar o desenvolvimento dos nódulos e indiretamente, por aliviar o estresse de nitrogênio que afeta a fotossíntese e, conseqüentemente, a planta inteira. Também foi adicionado cobalto às soluções nutritivas, uma vez que este elemento provou ser essencial à fixação simbiótica do nitrogênio (AHMED e EVANS, 1960).

Outro problema encontrado, após o início dos tratamentos, foi com relação ao controle do pH das soluções nutritivas. De início, estas soluções estavam sendo trocadas duas vezes por semana e as medidas do pH feitas diariamente. Porém, diariamente havia a necessidade de se adicionar solução de H_2SO_4 ou KOH para corrigir a grande variação do pH.

No primeiro dia após a troca, as soluções com pH 4.0 apresentavam-se em média com o pH ao redor de 5.0, enquanto que no segundo dia este caía para cerca de 3.5. Este aumento inicial do pH pode estar ligado a um mecanismo de resistência do cultivar, ao excesso de Al^{+3} , embora este aumento somente ocorresse durante as primeiras 24 horas. FOY et al. (1978) citam vários exemplos de cultivares tolerantes ao alumínio, os quais aumentam o pH de suas soluções nutritivas e as-

sim diminuem a solubilidade e toxicidade do alumínio, enquanto que os cultivares sensíveis ao alumínio diminuem ou não têm efeito sobre o pH de suas soluções nutritivas. CAMBRAIA (1989) relata que as modificações no pH do meio são determinadas pela absorção diferencial de cátions e de ânions e, portanto, dependem do suprimento relativo de nitrato (NO_3^-) e de amônio (NH_4^+). Segundo o autor, evidências recentes indicam que as plantas tolerantes ao alumínio são capazes de absorver o NO_3^- mais rapidamente que o NH_4^+ . Entretanto, as soluções usadas neste experimento não continham nitrogênio mineral e, portanto, podemos supor que a variação ocorrida no pH das soluções poderia ser devida ao excesso de absorção de ânions inicialmente, o que provocou um aumento do pH e, em seguida, excesso de absorção de cátions, provocando sua queda brusca.

Os dados preliminares mostraram a necessidade de pelo menos um controle diário do pH, para evitar problemas com a solubilidade do alumínio, nos tratamentos com este íon. Porém, uma vez que este problema poderia ser minimizado através de trocas mais frequentes da solução nutritiva, a partir daí as soluções foram renovadas a cada dois dias. Esta modificação foi feita também com o objetivo de evitar grandes distorções ou mesmo deficiências no meio, principalmente em relação ao fósforo, presente em quantidades mínimas.

O controle do pH e a concentração de fósforo das soluções nutritivas usadas aqui, diferem das técnicas usuais utilizadas recentemente por outros pesquisadores (IMSANDE e RALSTON, 1981; IMSANDE, 1986), inclusive em estudo com alumínio (ALVA et al., 1986a; 1986b). Apesar da nossa técnica ser relativamente simples, ela foi muito eficiente pois os resultados evidenciaram que a soja pode ser cultivada em hidropônica, com alto grau de nodulação, mesmo sob condições especiais, necessárias para se estudar o alumínio (pH baixo, concentração mínima de fósforo).

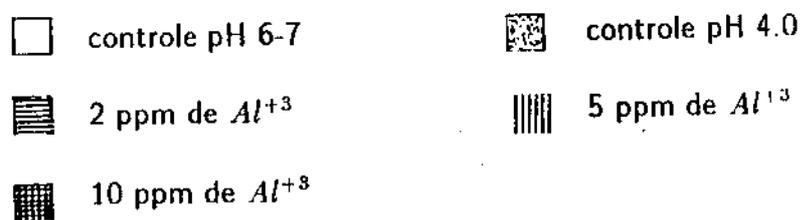
4.1.2 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO

Com a finalidade de verificar a concentração de alumínio efetiva para ser usada durante este estudo, plantas de soja foram submetidas a diferentes concentrações de alumínio. Embora existam sugestões na literatura de que plantas de soja devam desenvolver mais de uma população de nódulos, por exemplo SLOGER et al. (1976), propôs que a senescência dos nódulos primários na raiz principal tornaria necessária a produção de uma segunda população para proporcionar mais nitrogênio para o desenvolvimento dos frutos. PEAT et al. (1981), sugeriram que plantas de soja deveriam poder regular o tempo do principal período de fixação de nitrogênio através do aumento da nodulação nas raízes laterais durante o período reprodutivo, o que proporcionaria maior demanda de solutos nitrogenados para o crescimento das sementes. Com o objetivo de investigar a presença de uma segunda população de nódulos, neste experimento foram feitas duas contagens. A primeira foi realizada no início do estágio R_1 (Tabela 1), quando os nódulos foram contados sem serem destacados das raízes e a segunda, no final do experimento (estádio R_5), quando então os nódulos foram destacados e determinados os pesos de suas matérias secas.

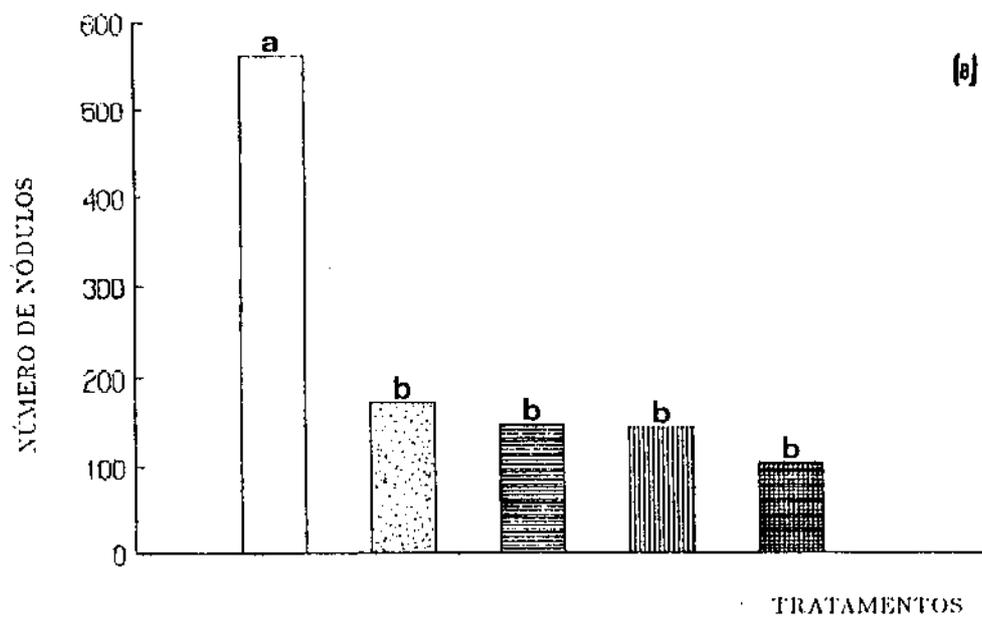
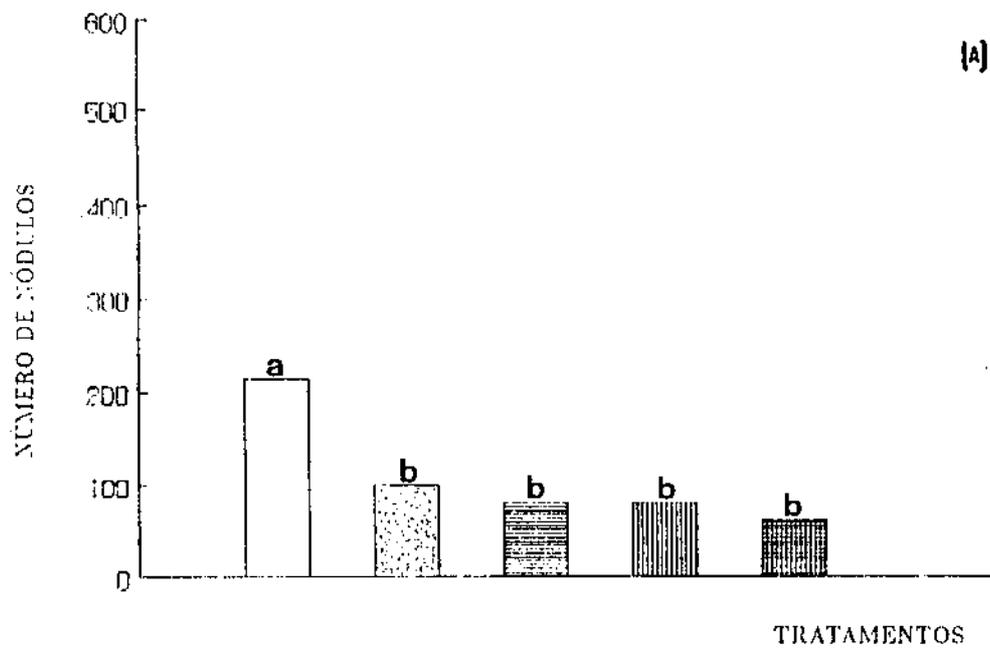
Na Figura 3 estão representados os resultados das duas contagens. O maior número de nódulos obtidos no final do experimento (Figura 3b) em relação ao início da floração (Figura 3a), evidencia claramente a presença de uma segunda população de nódulos.

Como se pode observar, não há diferenças estatisticamente significativas quanto ao número de nódulos entre o controle pH 4.0 e os tratamentos com 2, 5 e 10 ppm de alumínio, embora estes sejam bem menores que aqueles do controle pH 6-7, quer no início da floração, quer no final do experimento.

Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre o número de nódulos de plantas de soja cultivadas em solução nutritiva, no início da floração [A] e no final da frutificação [B].



*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

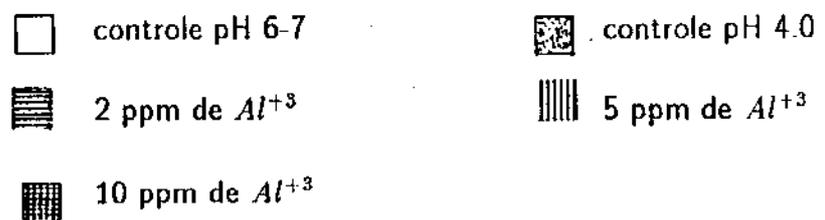


A nodulação não foi totalmente inibida nos tratamentos com pH baixo (4.0) nem com o alumínio. Nota-se entretanto que, tanto na primeira quanto na segunda população de nódulos, houve alguma inibição da nodulação, porém observa-se que o efeito é claramente do pH, e não do alumínio, uma vez que não existe diferenças estatísticas entre o controle pH 4.0 e os diferentes tratamentos com alumínio. KEYSER e MUNNS (1979a), trabalhando com diferentes linhagens de *Bradyrhizobium japonicum* observaram que a acidez, por si só, provocou severo estresse no crescimento das culturas. Porém, os autores ressaltam que as conclusões deste trabalho não podem ser generalizadas, pois dentro de cada grupo estudado existiam variações de linhagens para linhagens, quanto à tolerância. Além disso, a tolerância à acidez e a tolerância ao alumínio devem ser separadas, porque altas concentrações de alumínio parecem provocar estresse mais severo à cultura do que o baixo pH.

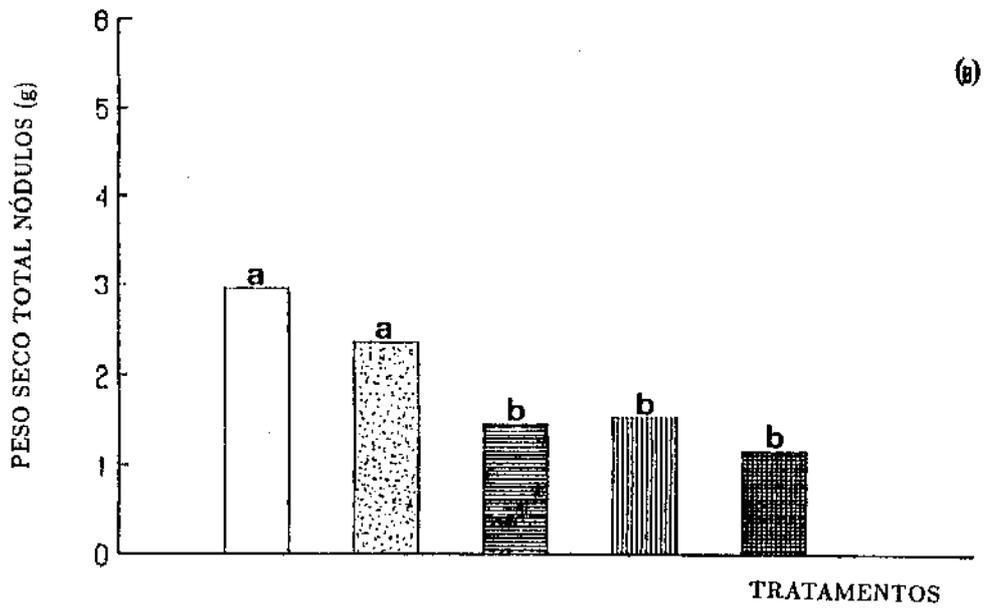
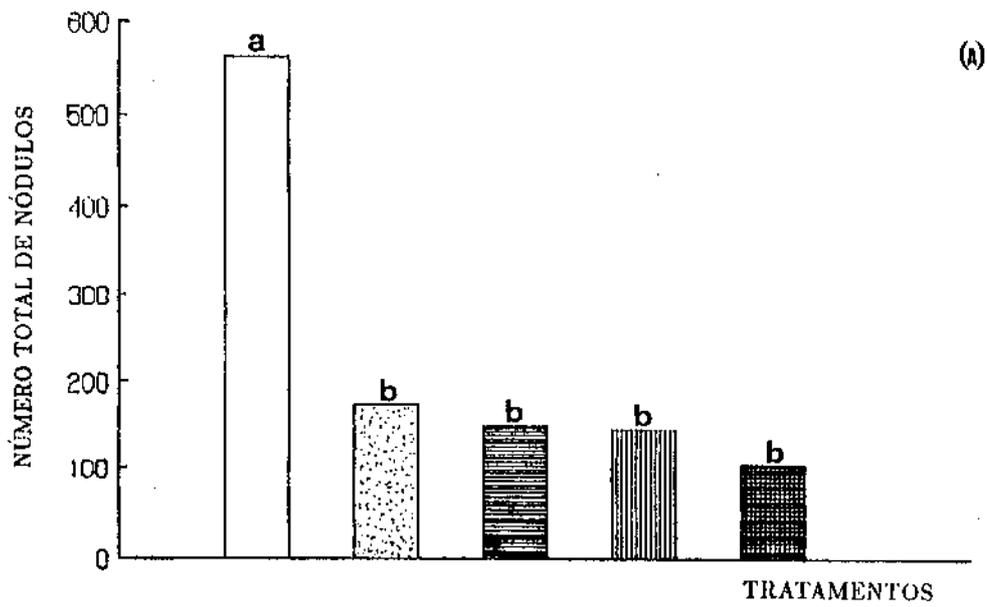
A contagem final dos nódulos e seus respectivos pesos da matéria seca estão representados na Figura 4. Apesar do número de nódulos das plantas do controle pH 6-7 e controle pH 4.0 serem estatisticamente diferentes, o peso de suas matérias secas são semelhantes. Pode-se, portanto, postular que somente a acidez da solução nutritiva inibe mais o estabelecimento dos nódulos do que seu desenvolvimento. Evidências neste mesmo sentido foram obtidas por ALVA et al. (1987) quando constataram que em pH baixo (4.5), houve uma diminuição do número de nódulos de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Fitzroy), cultivadas em solução nutritiva. O alumínio, por outro lado, parece inibir mais o crescimento do nódulo do que seu estabelecimento.

Os sintomas visíveis da toxidez do alumínio, observados ao longo do período experimental, manifestaram-se primeiramente nas plantas que receberam 10 ppm de alumínio.

Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre o número [A] e peso seco [B] de nódulos de plantas de soja cultivadas em solução nutritiva.



*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



As raízes tornaram-se curtas, grossas, quebradiças e amarronzadas. Sintomas semelhantes foram observados em leguminosas forrageiras (MOSQUIM, 1978; SILVA, 1981), sorgo (CALBO, 1978), mandioca (OLIVEIRA, 1979).

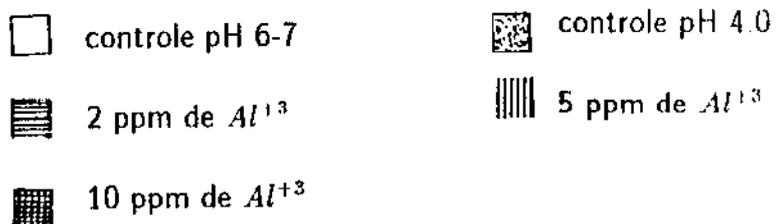
A parte aérea das plantas que receberam 5 e 10 ppm de alumínio, teve um reduzido crescimento, destacando-se daquelas do controle pH 6-7 e controle pH 4.0.

Observa-se na Figura 5 os efeitos de diferentes concentrações de alumínio sobre a produção de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea. Embora pouco acentuado, o efeito foi significativo. Enquanto na parte aérea ocorreu uma redução na produção de matéria seca nas plantas tratadas com alumínio, nas raízes destacam-se somente as plantas tratadas 5 e 10 ppm de alumínio.

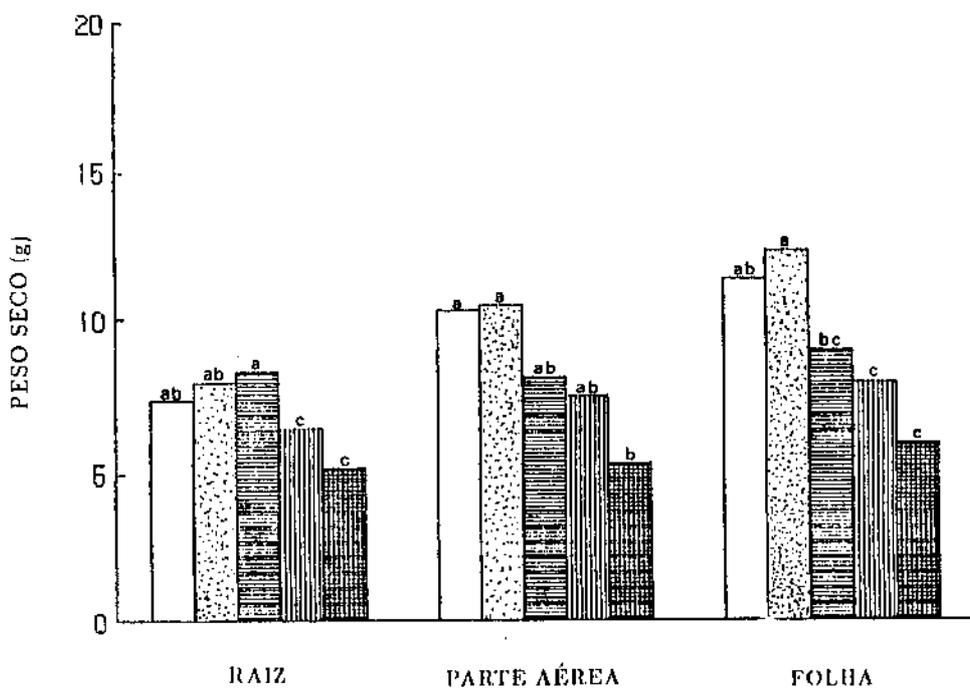
MUNNS et al. (1981) mostraram que a toxicidade do alumínio restringe o crescimento de plantas de soja devido à extrema susceptibilidade da planta hospedeira. Entretanto o cultivar Santa Rosa, utilizado neste trabalho, foi identificado como moderadamente tolerante ao alumínio, suportando de 16 a 20% de saturação em alumínio na camada arável do solo (MUZILLI et al., 1978).

Quando se observa a produção de matéria seca do controle pH 6-7 e do controle pH 4.0, nota-se que não existiu diferenças entre eles. Isto sugere que a acidez da solução nutritiva não afetou o crescimento da planta inteira e portanto, a redução do número de nódulos observados na Figura 4a deve ser um efeito direto do pH sobre a nodulação e não um efeito secundário (via efeito na planta). Estes resultados apontam também o fato de que todos os efeitos do alumínio são específicos para este íon e não um efeito da acidez da solução. O alumínio afetou o crescimento dos nódulos, mesmo em concentração baixa (2 ppm), e seu efeito não foi maior quando estava em concentração mais alta (Figura 4b). Por outro lado, sua ação sobre a produção de matéria seca da planta foi intensificada à medida que sua concentração foi sendo aumentada.

Figura 5 - Influência de diferentes concentrações de alumínio sobre a produção de matéria seca da raiz, parte aérea e folha, de plantas de soja cultivadas em solução nutritiva.



*as médias assinaladas com a mesma letra, em um mesmo bloco, não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



A análise de aminoácidos e ureídeos totais do exsudato da seiva do xilema, realizada para verificar a influência do alumínio sobre a fixação biológica do nitrogênio e sobre o transporte de solutos nitrogenados, foi bem esclarecedora.

Pode-se observar na Figura 6, que nos controles pH 6-7 e pH 4.0 a maior parte do nitrogênio fixado foi transportado sob a forma de ureídeo (alantoína e ácido alantóico), numa relação ureídeo/aminoácido > 2 .

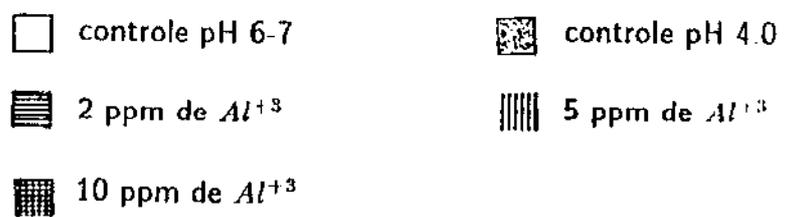
Estes resultados concordam com trabalhos anteriores (MATSUMOTO et al., 1977a.; McCLURE e ISRAEL, 1979) em soja, que afirmam serem os ureídeos os compostos nitrogenados predominantes em plantas de soja noduladas.

MATSUMOTO et al. (1977b.) sugerem uma especial associação entre a fixação biológica de N_2 e formação de ureídeos em plantas de soja e PATE et al. (1980), trabalhando com caupi (*Vigna unguiculata*) e outras leguminosas inclusive soja, constataram que em plantas de soja noduladas, cerca de 80% do N total da seiva do xilema era constituído de ureídeos.

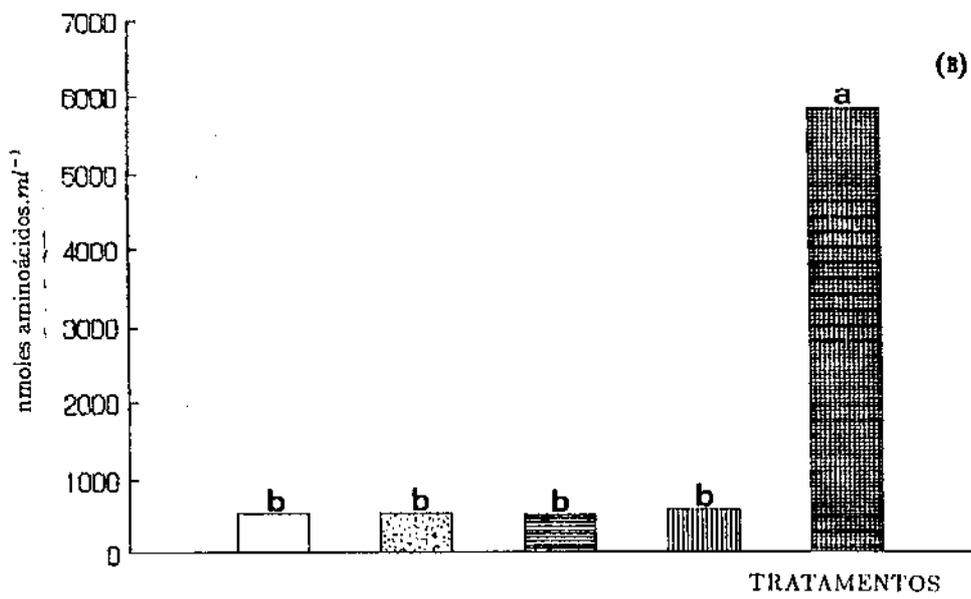
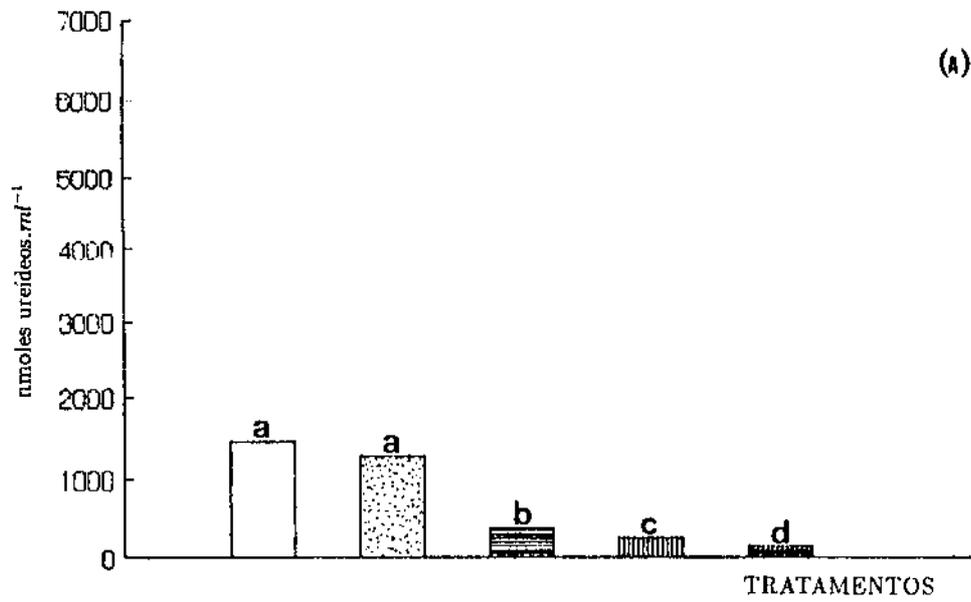
A análise dos solutos nitrogenados de plantas de soja e caupi em experimentos onde se utilizaram ^{15}N e ^{14}C (MATSUMOTO et al., 1977b; McCLURE e ISRAEL, 1979), revelam que os ureídeos são produtos da fixação biológica do N_2 , responsáveis pelo transporte de aproximadamente 80% do nitrogênio fixado nos nódulos radiculares de plantas totalmente simbióticas e estão presentes somente em pequenas quantidades nas plantas dependentes da absorção de nitrogênio mineral (HERRIDGE, 1982). Vários trabalhos mostram que na presença de NO_3^- e/ou NH_4^+ ocorre diminuição do número de nódulos, diminuição da atividade da nitrogenase e decréscimo no teor de ureídeos formado nos nódulos e transportados pela corrente transpiratória (FUJIIHARA e YAMAGUCHI, 1977; MATSUMOTO et al., 1977c, FUJIIHARA e YAMAGUCHI, 1978; MATSUMOTO et al., 1978; McCLURE et al., 1980; PATE et al., 1980).

No presente trabalho foi observado de modo semelhante que, à medida que se

Figura 6 - Teor de ureídeos [A] e de aminoácidos [B] contidos no exsudato da seiva do xilema de plantas de soja cultivadas em solução nutritiva, com diferentes concentrações de alumínio.



*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



elevaram os níveis de alumínio na solução nutritiva, ocorreu uma diminuição do teor de ureídeos (Figura 6a). Também foi observado que a presença do alumínio diminuiu o número e peso da matéria seca dos nódulos, bem como a produção de matéria seca da planta inteira. A relação ureídeo/aminoácido caiu abaixo de 1 (o que reflete uma baixa atividade de fixação de N_2) no tratamento com 2 ppm de alumínio e chegou a 0,02 quando as plantas receberam 10 ppm de alumínio. Quando se observa o teor de aminoácidos (Figura 6b), nota-se que somente no tratamento 10 ppm de Al^{+3} ocorreu um aumento considerável. Estas plantas, desde o início do experimento se destacaram das outras pois, possuíam poucos nódulos, sua segunda população de nódulos foi muito pequena, suas folhas eram de cor verde-amarelado e a partir do estágio R_1 houve acentuada senescência e abscisão das folhas mais velhas. Em todos os tratamentos, as soluções nutritivas administradas a partir da segunda semana, não possuíam N-mineral. Com base nestas evidências, podemos sugerir que este aumento de aminoácidos, presente no exsudato do xilema, seria consequência de uma reciclagem de N-solúvel das partes mais velhas da planta. Segundo SCHUBERT (1986), o processo de reciclagem frequentemente envolve catabolismo, reassimilação e síntese de novo de macromoléculas contendo nitrogênio. O alumínio reduz a replicação do DNA por aumentar a rigidez da dupla hélice da molécula, afeta a atividade de enzimas e interfere com a síntese de proteínas por causar distribuição anormal dos ribossomos do retículo endoplasmático (FOY, 1983). Deste modo, podemos supor que a síntese de proteínas, o processo de assimilação de nitrogênio estavam alterados e que os processos catabólicos poderiam estar sendo responsáveis por esta alteração no nível de aminoácidos. Assim, o exsudato coletado naquele momento, poderia estar mostrando a concentração de N-solúvel reciclado das partes mais velhas, através do floema, e que não estava sendo aproveitado nas partes mais novas do vegetal devido a diminuição da síntese de proteínas, sendo novamente transportado pelo xilema.

4.2 EXPERIMENTO I: EFEITO DIRETO DO ALUMÍNIO

Os resultados obtidos no experimento anterior permitiram avaliar que 10 ppm de alumínio afetou significativamente os parâmetros analisados, quanto à fixação biológica do nitrogênio. Ocorreu redução do número e peso da matéria seca dos nódulos que se refletiu na pequena produção de ureídeos, principal produto da fixação de nitrogênio, em plantas de soja noduladas. O efeito não foi tão proeminente nas plantas tratadas com 5 ou 2 ppm de alumínio.

Deste modo, este experimento foi realizado para avaliar a influência do alumínio, aplicado em diferentes estádios do desenvolvimento de plantas de soja cultivadas em solução nutritiva, sobre a fixação biológica de nitrogênio. Para este fim, o alumínio foi aplicado no estádio V_0 , junto com o inoculo, visando verificar seu efeito sobre o estabelecimento do nódulo, e em outro lote de plantas, no estádio V_2 , visando verificar seu efeito sobre o crescimento do nódulo. Foi aplicado também em plantas no estádio R_4 , ou seja, após o crescimento dos nódulos, para verificar seu efeito sobre a nitrogenase (avaliado através da dosagem de ureídeos).

4.2.1 NÚMERO E PESO SECO DOS NÓDULOS

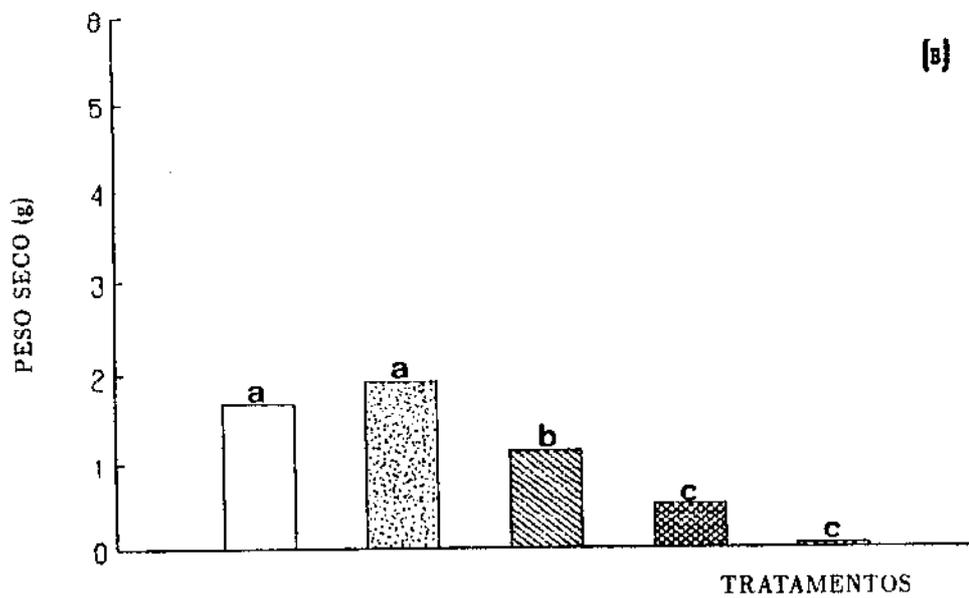
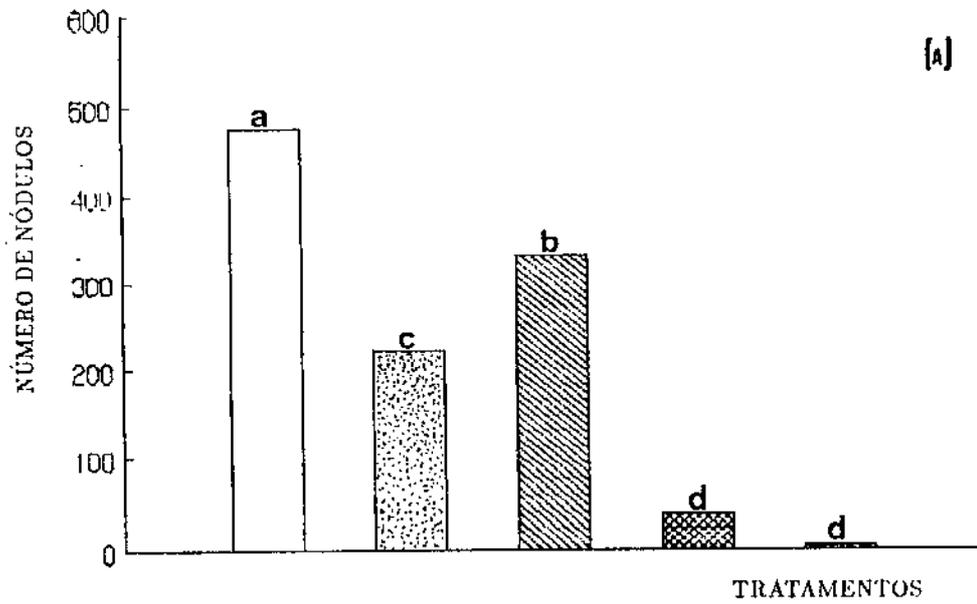
Os resultados das medidas de peso seco e contagem dos nódulos podem ser observados na Figura 7.

Verifica-se pelos resultados mostrados na figura que, nos tratamentos onde o alumínio foi aplicado no estádio V_0 e no estádio V_2 , o efeito foi severo, pois a nodulação foi quase que totalmente inibida.

Figura 7 - Efeito da adição de alumínio em diferentes estádios do desenvolvimento de plantas de soja cultivadas em solução nutritiva, sobre o número [A] e peso seco [B] dos nódulos.

- controle pH 6-7
- ▒ controle pH 4.0
- ▓ 10 ppm de Al^{+3} em R_4
- ▒ 10 ppm de Al^{+3} em V_2
- ▓ 10 ppm de Al^{+3} em V_0

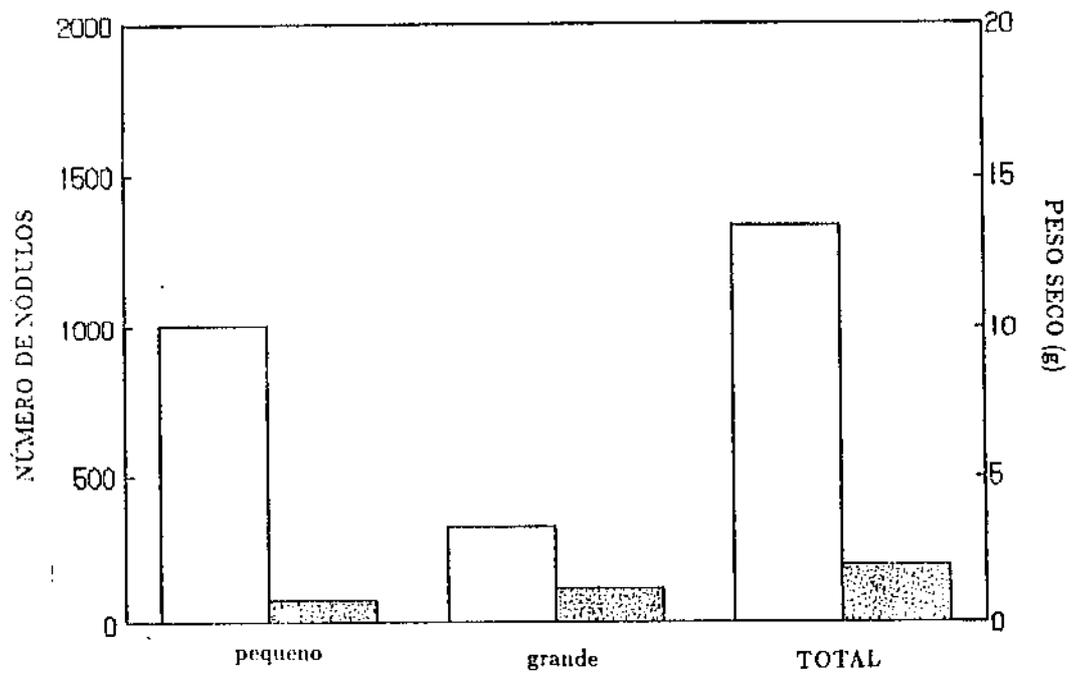
*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



Nas plantas que receberam alumínio no estágio V_0 , os nódulos encontrados no final do experimento achavam-se em adiantado estado de degeneração. Nestas plantas, não foi observada a formação de novos nódulos durante o estágio de floração. No tratamento onde o alumínio foi administrado no estágio V_2 , este íon causou uma diminuição no número e peso seco dos nódulos. Os resultados mostraram que o número de nódulos dos dois controles foram estatisticamente diferentes. A acidez do solo induz deficiência de nitrogênio em leguminosas, por impedir a nodulação normal. A acidez, a toxicidade do alumínio e a deficiência de cálcio inibem não somente o crescimento de *Bradyrhizobium*, mas também a infecção da raiz pelo microorganismo e a atividade do nódulo (MUNNS, 1979; MUNNS et al.,1981). Entretanto, vale salientar que os pesos da matéria seca dos nódulos de ambos os controles são semelhantes. O mesmo resultado foi observado no experimento anterior. Portanto, a acidez da solução nutritiva (pH 4.0) diminui o número de nódulos (Figura 7a) mas não o seu crescimento (Figura 7b), o que pode indicar a efetividade destes nódulos ou, pelo menos parte dela. O efeito do alumínio neste experimento mostrou-se mais forte sobre o número e peso seco dos nódulos.

No experimento anterior a acidez da solução nutritiva afetou o estabelecimento dos nódulos de modo semelhante ao alumínio, enquanto que aqui a presença deste íon diminuiu o número de nódulos quando comparados com o controle pH 4.0. Com relação às plantas submetidas ao tratamento com alumínio no estágio R_4 , vale relatar que por ocasião da coleta dos resultados, foram encontrados em todas as plantas deste tratamento uma grande quantidade de nódulos muito pequenos. Estes foram contados e pesados separadamente, tomando-se o seguinte critério: nódulos maiores ou igual a 1 mm de diâmetro foram considerados grandes e nódulos menores do que 1 mm de diâmetro foram considerados pequenos.

A Figura 8 mostra os resultados encontrados. Acreditamos que a presença destes nódulos poderia ser consequência de um atraso de parte da segunda população



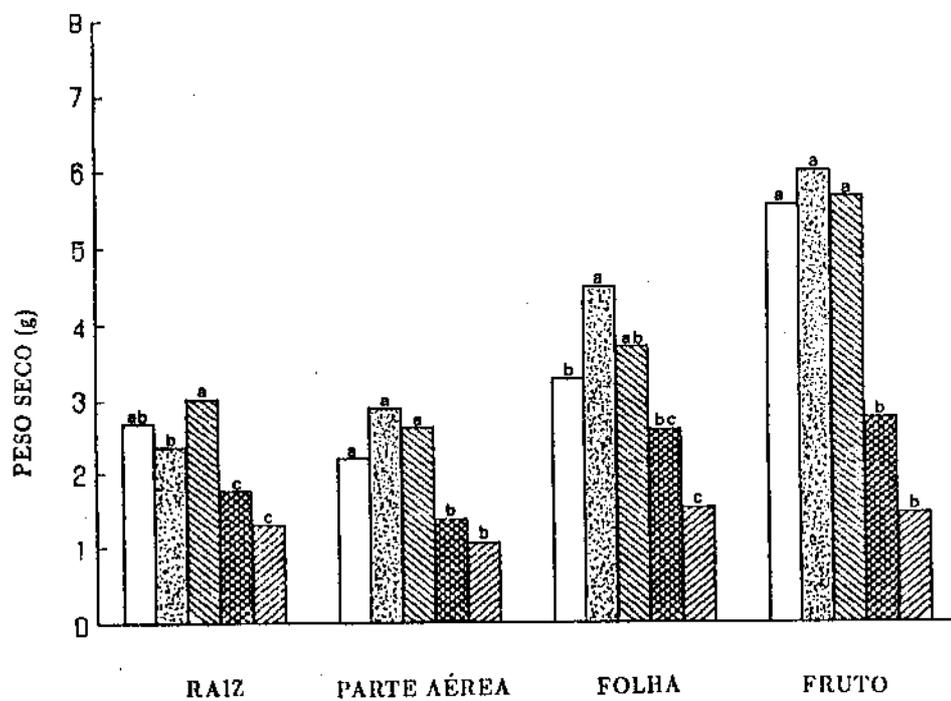
de nódulos, provocado pela presença do alumínio ou poderia ser uma terceira população de nódulos que ocorreu no início do período de frutificação, uma vez que no decorrer do experimento foi observada a presença da primeira e segunda população de nódulos. Teoricamente, os resultados esperados pela adição de alumínio no estádios R_4 não deveriam ser diferentes daqueles obtidos das plantas do controle pH 6-7, uma vez que as raízes destas plantas só ficaram em contato com o íon durante uma semana, ocasião em que os nódulos já estavam bem estabelecidos e desenvolvidos. Por outro lado, se for incluída a população de nódulos pequenos (Figura 8) àqueles já crescidos da Figura 7, o número de nódulos seria maior do que os do controle pH 6-7 e o peso seria estatisticamente semelhante.

4.2.2 PESO SECO DA RAÍZ E DA PARTE AÉREA

As plantas submetidas aos diferentes tratamentos apresentaram no final do experimento acentuado contraste visual. As plantas controle pH 6-7 e pH 4.0 e aquelas que receberam alumínio somente no estádio R_4 cresceram relativamente bem, exibindo raízes claras, muitos nódulos, folhas verdes e grande número de frutos.

Contrastando com estes resultados visuais, aquelas que receberam alumínio no estádio V_0 e V_2 tiveram um reduzido crescimento da parte aérea, folhas verdes de tonalidade mais clara, pequena quantidade de raízes, amarronzadas, grossas e o crescimento de raízes laterais inibido.

A Figura 9 evidencia uma menor produção de matéria seca pelas plantas que receberam alumínio nos estádios iniciais do desenvolvimento. Estes resultados confirmam a suposição de SILVA (1981) sobre o efeito do alumínio, em seu estudo com *Stylosanthes guianensis*, pouco eficaz devido à idade das plantas na época de exposição ao elemento. Pôde-se observar até aqui que, em relação à produção de nódulos, o alumínio diminuiu a nodulação nas plantas onde ele foi adicionado no



estádio V_0 , reduziu o desenvolvimento daqueles já formados, quando administrado no estágio V_2 e provavelmente atrasou o aparecimento da segunda população de nódulos quando foi adicionado no estágio R_4 .

Quanto à produção de matéria seca das raízes e parte aérea, também nota-se o efeito do alumínio em relação à idade das plantas na época da exposição. RORISON (1958) afirmou que controvérsias sobre o grau de toxidez de alumínio, para as diversas espécies, surgem em função de não se levar em conta a idade das plantas, o pH e a composição dos meios de crescimento empregados. Nota-se que nos controles e no tratamento com 10 ppm de Al^{+3} em R_4 houve grande produção de matéria seca, enquanto que esta produção nas plantas que receberam alumínio nos estádios iniciais de desenvolvimento (V_0 e V_2) foi reduzida tanto nas raízes, quanto na parte aérea. Estas plantas se destacaram das outras, devido a coloração de suas folhas, com tom amarelado, parte aérea pouco desenvolvida e colapso dos pontos de crescimento. A formação e desenvolvimento dos frutos também foi muito pequena e muito lenta.

4.2.3 ANÁLISE DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS TOTAIS

Pode-se observar na Figura 10 os resultados encontrados na análise de aminoácidos e ureídeos totais.

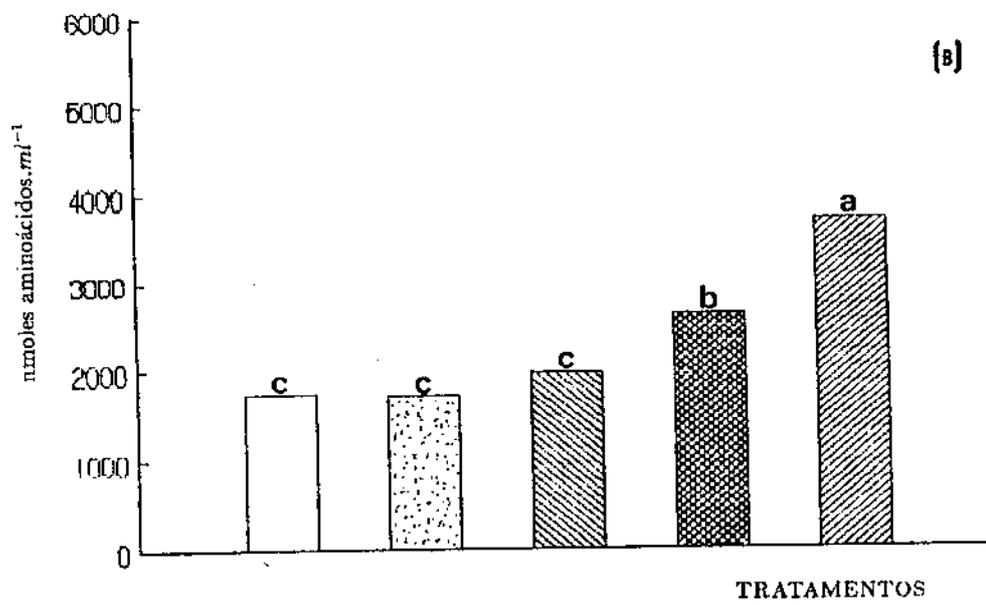
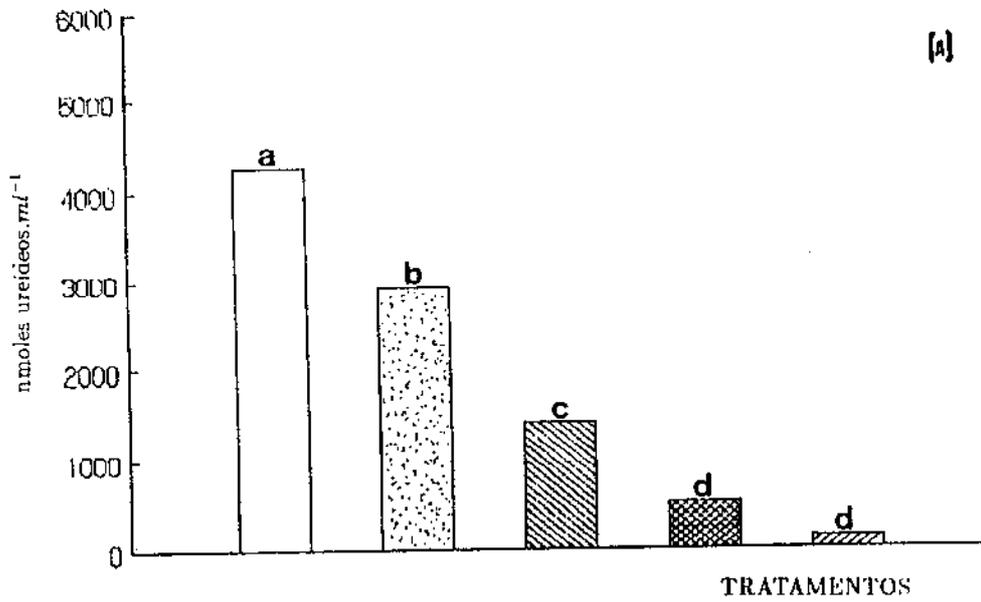
No controle pH 6-7 a relação ureídeo/aminoácido se mantém constante, maior que 2, de modo semelhante aos resultados do experimento anterior (Figura 6). Esta relação diminui consideravelmente nos tratamentos com alumínio, sendo o tratamento 10 ppm de Al^{+3} em V_0 o mais afetado. Nestes resultados, vale citar novamente RORISON (1958), que ressalta a importância da idade das plantas ao serem submetidas ao tratamento com alumínio.

Os resultados obtidos aqui mostram claramente a importância do estágio de desenvolvimento das plantas.

Figura 10 - Efeito do alumínio adicionado em diferentes estádios do desenvolvimento de plantas de soja, cultivadas em solução nutritiva, sobre o teor de ureídeos [A] e de aminoácidos [B], contidos no exsudato da seiva do xilema.

- controle pH 6-7
- ▒ controle pH 4.0
- ▨ 10 ppm de Al^{+3} em R_4
- ▩ 10 ppm de Al^{+3} em V_2
- ▧ 10 ppm de Al^{+3} em V_0

*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



No tratamento 10 ppm de Al^{+3} em R_4 , a relação ureídeo/aminoácido foi de 0,71. Estas plantas receberam durante todo o período experimental o mesmo tratamento das plantas controle pH 6-7, com excessão dos 7 últimos dias, quando então receberam 10 ppm de Al^{+3} . Os resultados de produção de matéria seca foram semelhantes àqueles dos controles, bem como o número e peso da matéria seca dos nódulos. Isto indicaria a efetividade dos nódulos na fixação biológica do nitrogênio, porém os resultados da análise de aminoácidos e ureídeos totais demonstraram o efeito do alumínio sobre o funcionamento dos nódulos, pois houve uma queda na produção de ureídeos e um aumento concomitante na produção de aminoácidos, quando comparados com o controle pH 6-7. Estes resultados parecem ser semelhantes daqueles obtidos por McCLURE e ISRAEL (1979) que, trabalhando com plantas de soja noduladas e não noduladas, mostram que os ureídeos foram os compostos nitrogenados predominantes na seiva do xilema de plantas inoculadas, enquanto que os aminoácidos foram a forma dominante na seiva de plantas não inoculadas, crescendo em presença de nitrato. Quando plantas noduladas receberam 20 mmol de nitrato, dos 65 dias até 126 dias de idade, houve uma diminuição de ureídeos na seiva do xilema e um aumento de aminoácidos.

De modo semelhante ao experimento anterior, aqui também não foi usada nenhuma fonte de N nas soluções nutritivas. Portanto, podemos sugerir que o efeito do alumínio nestas plantas (10 ppm de Al^{+3} em R_4) foi bem rápido, provávelmente diminuindo a atividade da nitrogenase, fato este evidenciado pela menor concentração de ureídeos presentes na seiva do xilema. O teor de aminoácidos encontrado nas plantas que receberam alumínio no estadio V_2 e V_0 foram estatisticamente diferentes entre si e aos outros tratamentos (Figura 10b). Houve um aumento significativo destes compostos à medida que o Al^{+3} foi adicionado mais cedo.

A figura mostra claramente o aumento do teor de aminoácidos à medida que o alumínio foi sendo administrado mais cedo às plantas, enquanto diminui o teor de ureídeos, chegando a 0,03 a relação ureídeo/aminoácido nas plantas que receberam

alumínio no estágio V_0 . Estes resultados parecem confirmar a sugestão anterior de que poderia estar havendo reciclagem de N-solúvel nestas plantas.

O pequeno desenvolvimento da parte aérea e a degeneração dos nódulos demonstram inibição do desenvolvimento da planta e pequena ou nenhuma atividade dos nódulos. Deste modo, o catabolismo de substâncias nitrogenadas poderia estar em plena atividade enquanto que as reações de síntese e assimilação de compostos nitrogenados e fotossintatos estariam sendo inibidos. O fato do alumínio aumentar a rigidez da parede celular, reduzir a replicação do DNA, diminuir a respiração radicular, interferir com a atividade de enzimas que promovem a fosforilação de açúcares e a deposição de polissacarídeos da parede celular e interferir com a absorção, transporte e uso de elementos essenciais, tais como Ca, Mg, P e Fe (FOY, 1983) parecem confirmar a idéia de redistribuição dos compostos nitrogenados no corpo da planta.

4.3 EXPERIMENTO II- EFEITO INDIRETO DO ALUMÍNIO

Neste experimento foi feita uma avaliação do efeito indireto do alumínio sobre a nodulação. Para isto foi utilizado um sistema vermiculita/hidropônica (ver item 3.8), onde a aplicação do alumínio foi feita exclusivamente na parte apical do sistema radicular (em hidropônica). Os primeiros 20 cm das raízes (isto é, a parte basal) onde se formam os nódulos, ficaram em vermiculita e recebendo solução nutritiva sem nitrogênio e pH 6-7.

Durante as primeiras semanas de tratamento todas as plantas tiveram o mesmo comportamento na parte aérea, onde as folhas permaneceram bem verdes e o crescimento bem visível. Os primeiros sintomas de toxidez de alumínio começaram a aparecer na terceira semana, onde a parte apical das raízes (em hidropônica) das plantas com tratamento 10ppm de Al^{+3} em V_1 continuavam pequenas, sem

ramificações e de cor amarronzada, enquanto que nos outros tratamentos a parte apical das raízes apresentava-se em grande quantidade, com muitas ramificações e já atingindo 30 cm de comprimentos.

Após cinco semanas, com o início da floração, os sintomas de toxicidade do alumínio já eram nitidamente visíveis. A floração foi retardada nas plantas tratadas com alumínio no estágio V_0 , não houve aparecimento de novas raízes na solução hidropônica e a parte aérea destas plantas possuía menor número de folhas e frutos.

4.3.1 NÚMERO E PESO SECO DE NÓDULOS

Por ocasião da coleta dos resultados foi possível observar que as raízes contidas na solução hidropônica eram prolongamentos das raízes com maior número de nódulos na parte basal em vermiculita e que receberam solução nutritiva sem nitrogênio. Durante toda a fase experimental não foram observados nódulos na parte apical das mesmas em nenhum dos tratamentos.

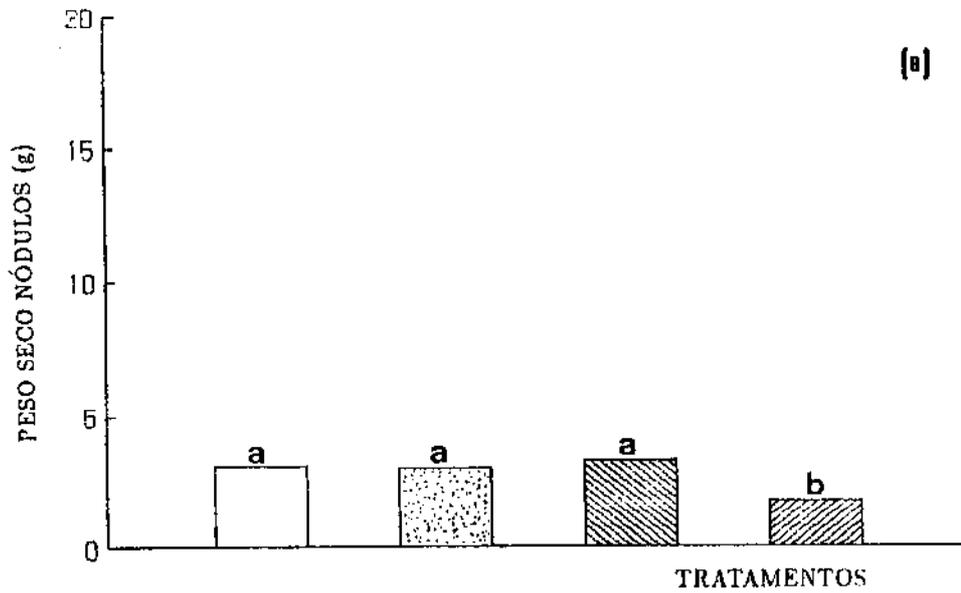
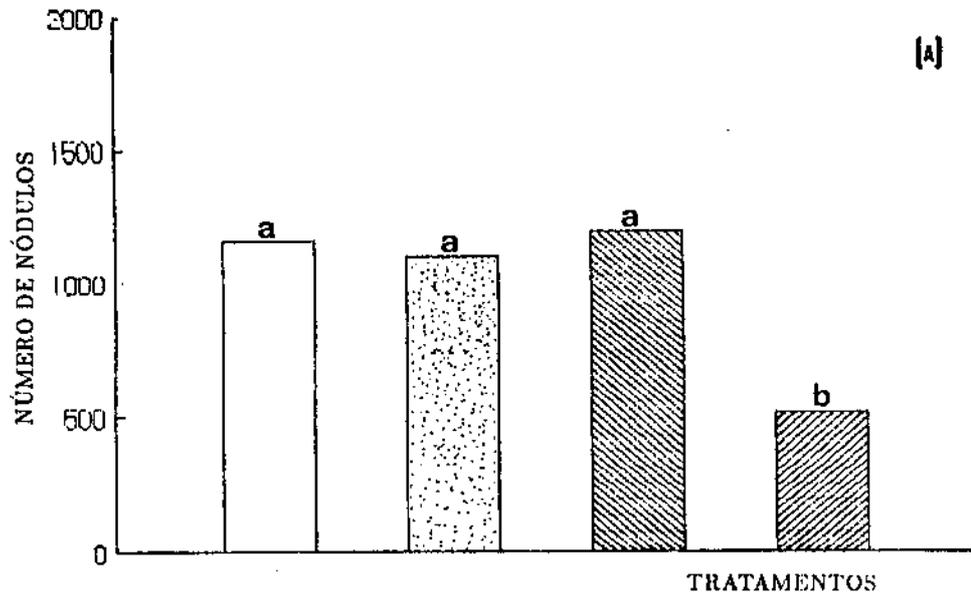
Os resultados da contagem do número de nódulos e seus respectivos pesos da matéria seca, nos diversos tratamentos deste experimento, estão representados na Figura 11.

Observa-se que, mesmo estando sendo administrado somente à parte apical das raízes, o efeito do alumínio é bem visível quando ele foi adicionado imediatamente após a inoculação. O número de nódulos (518 nódulos/planta) não chega a atingir a metade do número de nódulos encontrados nas plantas do controle pH 6-7 (1158 nódulos/planta) ou nas plantas do controle pH 4.0 (1099 nódulos/plantas). Da mesma forma, a produção de matéria seca por esses nódulos (1,81 g/planta) é bem menor que aqueles encontrados para os controles (3,1 g/plantas).

Figura 11 - Efeito da adição de alumínio em diferentes estádios do desenvolvimento de plantas de soja cultivadas em vermiculita/hidropônica sobre o número [A] e peso seco [B] dos nódulos.

- controle pH 6-7
- ▒ controle pH 4.0
- ▓ 10 ppm de Al^{+3} em R_4
- ▨ 10 ppm de Al^{+3} em V_1

*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



As plantas que receberam alumínio na parte apical das raízes somente por uma semana (tratamento 10ppm de Al^{+3} em R_4), não mostraram nenhum sintoma de toxicidade do elemento afetando a nodulação, uma vez que nestas plantas a nodulação efetiva já havia ocorrido, nem houve mudanças na produção de matéria seca dos nódulos.

Estes resultados concordam com a afirmativa de THAWORUWONG e VAN DIEST (1974) de que, em geral, plantas jovens são mais susceptíveis à toxicidade do alumínio do que plantas mais velhas.

Vários trabalhos têm mostrado que o excesso de alumínio interfere na divisão celular do meristema sub-apical da raiz e raízes laterais, aumenta a rigidez da parede celular, reduz a replicação do DNA por aumentar a rigidez da dupla helice do DNA, fixa o P em formas menos disponíveis no solo e sobre a superfície das raízes, interfere na ação de enzimas responsáveis pela fosforilação de açúcares e pela deposição de polissacarídeos da parede celular e interfere com a absorção, transporte e uso de elementos essenciais como o Ca, Mg, K, P, Fe, (FOY, 1974; FOY e FLEMING, 1978; FOY et al., 1978; FOY, 1982a; 1982b; LEE, 1982 apud FOY, 1983). Todas estas constatações nos levam a sugerir que o alumínio, presente somente na região apical das raízes, poderia estar interferindo na absorção, transporte e uso de elementos essenciais à nodulação na região basal das raízes, como por exemplo Ca, Mg e P (SARTAIN E KAMPRATH, 1977) e, deste modo, reduzindo a nodulação. MOSQUIM (1978), trabalhando com *S. humilis*, observou que o alumínio acumulava preferencialmente nas raízes. O autor esclarece, entretanto, que esta planta é altamente resistente ao alumínio enquanto que as plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa), foram identificadas como medianamente tolerantes por MUZILLI et al. (1978). KLOTZ e HORST (1988), afirmaram que genótipos de soja diferem consideravelmente em suas respostas ao tratamento com alumínio. Segundo os autores a inibição do alongamento da raiz, especialmente das raízes secundárias, foi o parâmetro mais sensível à injúria e concluem que as plantas

genotípicamente tolerantes, devem desintoxicar-se do alumínio ou dentro do simplasto ou no apoplasto através da formação de complexos. Assim, não pode ser descartada a possibilidade de que uma certa quantidade de alumínio tenha sido absorvida e translocada até as proximidades dos nódulos e, ali ter exercido seu efeito.

4.3.2 PESO SECO DA RAÍZ E DA PARTE AÉREA

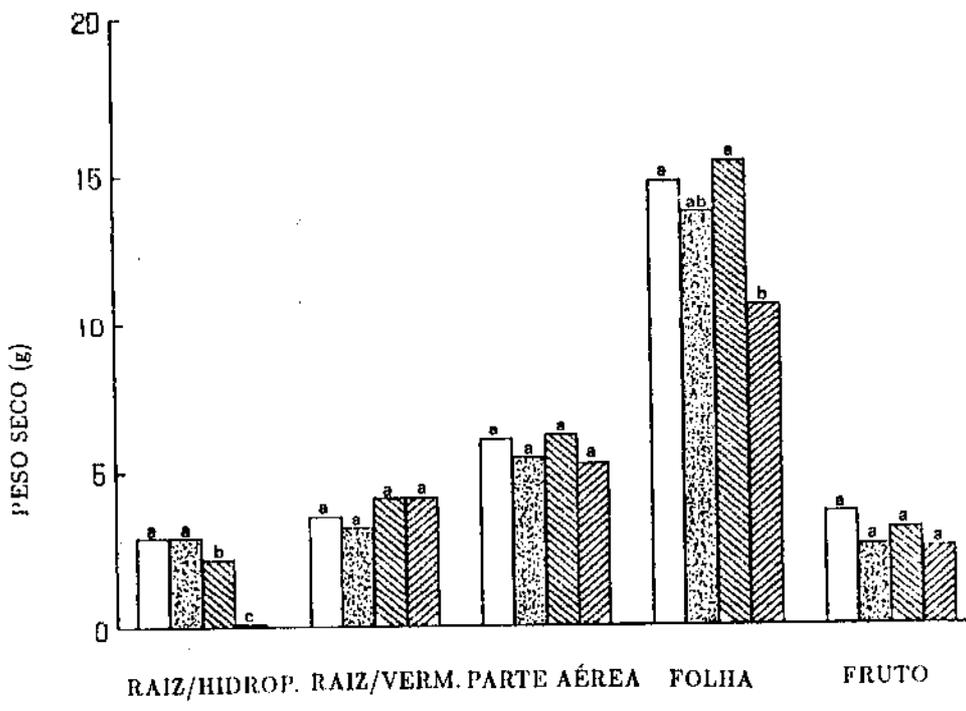
Os resultados obtidos neste experimento concordam com as afirmativas de FOY (1976a) de que a toxidez causada pelo alumínio é especialmente prejudicial nos solos ácidos, porque restringe a profundidade das raízes e suas ramificações. Pode-se observar na Figura 12 que a região basal das raízes, em vermiculita, e que receberam o mesmo tipo de solução nutritiva (sem nitrogênio e pH 6-7), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto à produção de matéria seca. Porém, a parte apical destas raízes que receberam diferentes tratamentos em solução hidropônica, apresentaram diferentes índices de produção de matéria seca. Naquelas que receberam alumínio no estágio V_1 verifica-se que, à medida que atingiam a solução nutritiva, seus crescimentos diminuíam, engrossam seus ápices e desapareciam as raízes laterais. Deste modo, ao fim do período experimental, o volume de raízes neste tratamento era pequeno, o que se refletiu na medida de seu peso seco. Também naquelas plantas que receberam alumínio somente por uma semana, isto é, no estágio R_4 , não foi observado o aparecimento de novas raízes, fato este notado nos controles. É sabido que o efeito inicial de excesso de alumínio no ambiente radicular é uma inibição da divisão celular no meristema sub-apical da raiz e subsequente inibição do alongamento das raízes (HUETT e MENARY, 1983). O acúmulo de alumínio na parede celular da coifa foi observado em feijão e algodão (NAIDOO et al., 1978).

Em milho, BENNET et al. (1985a; 1985b) sugerem que a coifa pode ser o sítio

Figura 12 - Efeito da adição de alumínio em diferentes estádios do desenvolvimento de plantas de soja cultivadas em vermiculita/hidropônica, sobre a produção de matéria seca da região apical da raiz (em hidropônica), região basal da raiz (em vermiculita), parte aérea, folha e fruto.

- controle pH 6-7
- controle pH 4.0
- 10 ppm de Al^{+3} em R_4
- 10 ppm de Al^{+3} em V_1

*as médias assinaladas com a mesma letra, em um mesmo bloco, não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



primário para a absorção de alumínio na raiz primária e os efeitos subseqüentes sobre a atividade meristemática podem ser secundários.

Estes trabalhos dão substancial evidências para explicar a menor produção de matéria seca na parte apical das raízes das plantas que receberam alumínio somente por uma semana, uma vez que até então estas plantas receberam o mesmo tratamento que aquelas do controle pH 6-7. É interessante observar que o alumínio não teve efeito tão drástico quando o sistema radicular inteiro foi submetido à sua ação (efeito direto-Figura 9). Os dados indicam que a planta pode se adaptar quando as raízes atingem um subsolo com alumínio, desviando o crescimento radicular para a camada superficial, o que não seria possível no caso direto. Pelos dados apresentados a massa de raízes na camada "superficial" (vermiculita), embora não significativamente maior no tratamento com alumínio do que no controle, foi relativamente maior se considerarmos a massa de raízes em relação ao resto da planta.

A produção de matéria seca na parte aérea (caule e pecíolos) e nos frutos foi semelhante em todos os tratamentos, entretanto, houve diferenças significativas de produção de matéria seca nas folhas. As plantas que receberam alumínio a partir do estágio V_1 produziram menor quantidade de matéria seca, seguidas das plantas do controle pH 4.0, cuja produção foi estatisticamente semelhante tanto ao controle pH 6-7, quanto ao tratamento 10ppm de Al^{+3} em V_1 . Estes resultados diferem daqueles encontrados por MUNNS et al. (1981), onde a acidez da solução nutritiva não afetou a produção de matéria seca da parte aérea (caule e folhas) de alguns cultivares de soja. Porém, os autores destacam que seus resultados não podem ser generalizados. Outras variedades simbiotes podem ser mais sensíveis à acidez do solo.

4.3.3 ANÁLISE DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS TOTAIS

Vários trabalhos têm demonstrado que as proporções de nitrogênio sob a forma de ureídeos, da seiva do xilema, de plantas de soja, podem ser usados como indicador da fixação biológica de nitrogênio (McCLURE et al.,1980; PATE et al.,1980; HERRIDGE,1982; PATTERSON e LARUE,1983a; 1983b). McCLURE e ISRAEL (1979) encontraram que cerca de 80% a 90% do N existente na seiva do xilema estão sob a forma de ureídeos, quando a planta era totalmente dependente da fixação de N_2 .

Os resultados obtidos da análise do exsudato do xilema mostram o efeito do alumínio sobre a fixação biológica do nitrogênio (Figura 13). Os teores de aminoácidos em todos os tratamentos foram estatisticamente iguais, enquanto os teores de ureídeos variaram bastante, dependendo do tratamento.

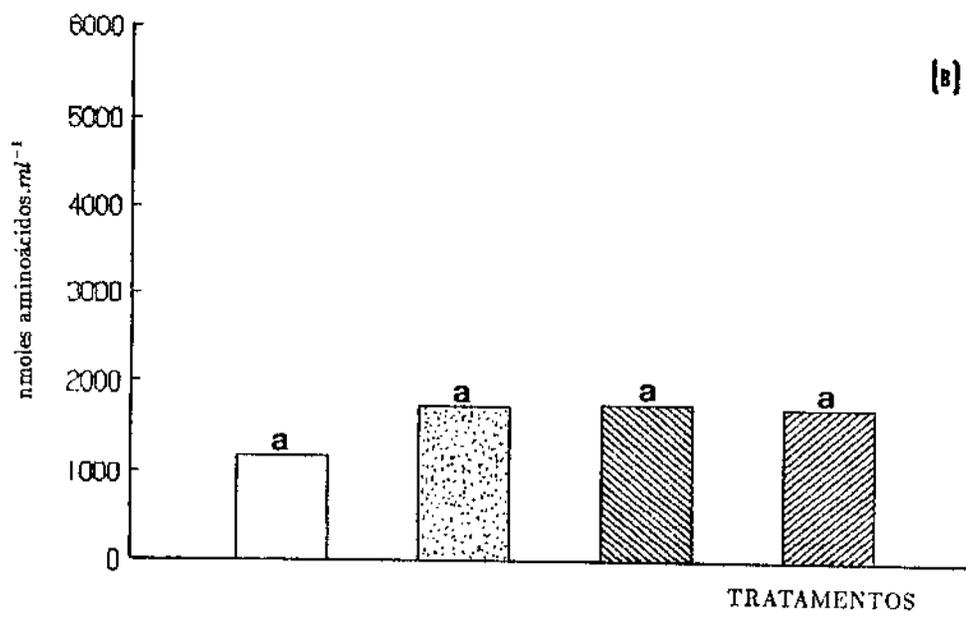
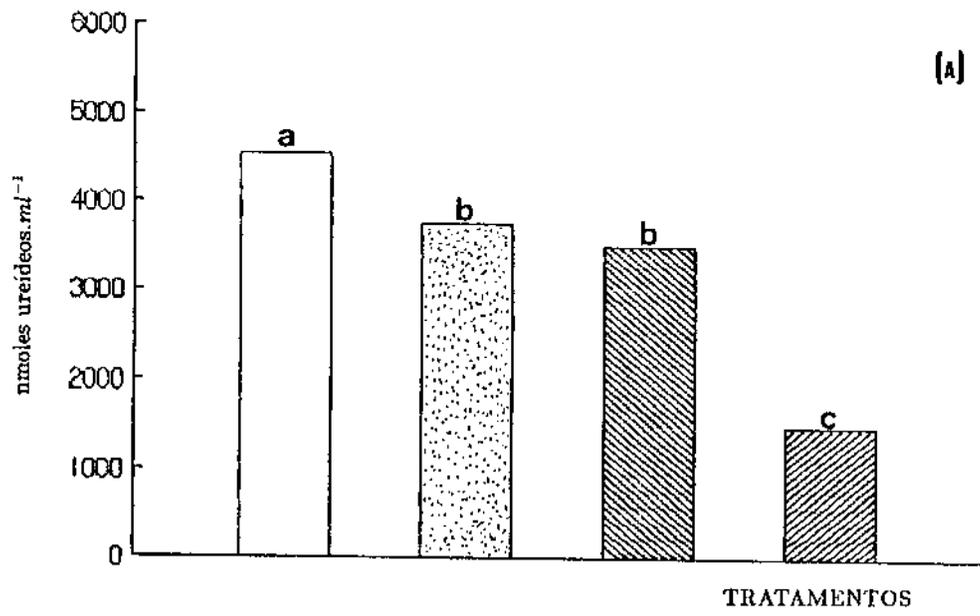
No controle pH 6-7 a relação ureídeo/aminoácido é bem alta (3,81). Esta alta relação demonstra a efetividade dos nódulos na fixação de N_2 . Apesar de não ter sido feita análise de N-total neste trabalho, a alta relação ureídeo/aminoácido encontrada neste tratamento mostra a total dependência simbiótica destas plantas.

O conteúdo de ureídeos cai ligeiramente nas plantas do controle pH 4.0 e naquelas que receberam alumínio apenas por uma semana. Deste modo, a relação ureídeo/aminoácido diminuiu para cerca de 2.0. McCLURE e ISRAEL (1979) sugerem a existência de uma correlação positiva entre o conteúdo de ureídeos da seiva e o peso seco dos nódulos como sendo um índice da efetiva nodulação e fixação de nitrogênio. Porém, a produção de matéria seca nos nódulos das plantas do controle pH 4 foi semelhante ao controle pH 6-7. Podemos postular que o efeito da acidez sobre o crescimento do *Bradyrhizobium*, bem como a presença do alumínio, podem ter diminuído a atividade nodular, fato este também observado por KEYSER e MUNNS (1979a; 1979b). A constatação de FUJIHARA e YAMAGUCHI (1978) de que alantoína e ácido alantóico são produzidos via decomposição oxidativa de purinas dentro dos nódulos em plantas de soja, nos leva a sugerir que o alumínio

Figura 13 - Efeito da adição de alumínio em diferentes estádios do desenvolvimento de plantas de soja cultivadas em vermiculita/hidropônica, sobre o teor de ureídeos [A] e de aminoácidos [B] contidos no exsudato da seiva do xilema.

- controle pH 6-7
- controle pH 4.0
- 10 ppm de Al^{+3} em R_4
- 10 ppm de Al^{+3} em V_1

*as médias assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.



tem um efeito rápido dentro dos nódulos inibindo sua atividade.

O efeito do alumínio é bem severo quando administrado nos estádios iniciais do desenvolvimento de plantas de soja. Pode-se observar que o conteúdo de ureídeos cai a níveis bem baixos no tratamento 10ppm de Al^{+3} em V_1 . Aqui existe realmente uma relação entre peso seco dos nódulos e conteúdo de ureídeos. A relação ureídeo/aminoácido foi menor que 1,0.

MATSUMOTO et al. (1977a), trabalhando com plantas de soja nodulantes e não nodulantes, encontraram evidências de que ureídeos também ocorrem na ausência dos nódulos, entretanto a quantidade foi muito pequena quando comparada com a quantidade encontrada na variedade nodulante. A baixa relação ureídeo/aminoácido pode ser explicada, em parte, pelo baixo grau de nodulação. Entretanto, a queda no nível de ureídeos foi relativamente maior do que a queda na nodulação, o que indica um efeito sobre o processo de fixação de N_2 . Os dados obtidos com a aplicação do alumínio no estádio R_4 , que também provocou uma pequena queda no nível de ureídeos, apoiam esta afirmativa.

Com estes resultados, podemos sugerir que o alumínio, mesmo presente somente no subsolo, poderia afetar a fixação biológica do N_2 , mudando o padrão de solutos nitrogenados transportados pelo xilema. É possível que estes resultados possam ocorrer também em situações diferentes das da nossa amostragem, assim os dados aqui discutidos poderiam servir de base para trabalhos, realizados em condições de campo, que confirmassem ou rejeitassem esta sugestão.

4.4 EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DO EFEITO DIRETO E INDIRETO DO ALUMÍNIO

Uma vez que os experimentos I e II foram realizados em diferentes épocas do ano, este experimento foi montado usando os dois sistemas de cultivo com a finalidade de compararmos os resultados obtidos sobre o efeito direto e indireto do alumínio.

Entretanto, a época do ano em que o experimento foi realizado (maio a julho) teve algumas influências nos resultados obtidos. Nesta época do ano ocorreu grande variação de temperatura na região de Campinas, São Paulo, e como a casa de vegetação utilizada não possuía temperatura controlada, as plantas responderam à esta variação. Durante o dia a temperatura variava entre $27^{\circ}C$ e $30^{\circ}C$, enquanto à noite havia quedas bruscas de temperatura, chegando algumas vezes à $10^{\circ}C$.

SCHWEITZER e HARPER (1980) relatam que a temperatura afetou a atividade dos nódulos de plantas de soja, mantidas à luz. A exposição de raízes e parte aérea de plantas intactas à baixa temperatura resultou em uma marcante diminuição na atividade dos nódulos quando comparados com plantas mantidas em temperaturas mais altas. Os autores observaram uma relação direta entre a diminuição de atividade dos nódulos e a mudança de temperatura na parte aérea e sugerem que os tecidos da parte aérea devem servir como fonte primária de reserva de carboidaratos, que por sua vez são usados para a atividade dos nódulos. A baixa temperatura afeta a fotossíntese, diminui a taxa de reserva de carboidratos e, conseqüentemente, diminui a atividade dos nódulos. A análise do conteúdo de amido e açúcares, dos tecidos do caule, da raiz e dos nódulos realizadas por eles durante o estudo, foram consistentes com esta sugestão. Neste experimento, os efeitos da variação de temperatura puderam ser observados desde o início do desenvolvimento das plantas. O crescimento das plantas foi lento e os primeiros nódulos só começaram a aparecer na terceira semana após a inoculação enquanto que nos experimentos anteriores, os primeiros nódulos apareciam após 10 dias da inoculação. Depois de quatro semanas, as plantas apresentavam pequeno número de raízes, poucos nódulos, poucas folhas, sendo que as folhas mais velhas apresentavam-se amareladas e algumas queimadas pelo frio. Estes resultados visuais são semelhantes com aqueles obtidos por MATTEWS e HAYES (1982), onde baixas temperaturas nas raízes de plantas de soja noduladas restringiram o crescimento destas, enquanto que em plantas de soja não noduladas o efeito da tem-

peratura não foi estatisticamente significativa. Os autores sugerem também que a baixa temperatura na rizosfera pode ter um efeito direto sobre o *Bradyrhizobium*, alterando sua habilidade para infectar o sistema radicular e formar nódulos. O experimento realizado por eles não deu evidências diretas sobre este efeito, mas as observações feitas mostraram que a nodulação foi mais afetada do que a fixação biológica do nitrogênio. No nosso caso, as condições ambientais prejudicaram as tentativas de comparar os dados obtidos nos experimentos anteriores, e inicialmente deu a impressão de que o esforço havia sido em vão. Todavia, a análise pormenorizada destes resultados mostrou que os objetivos propostos não só foram alcançados como foram ampliados pelos efeitos obtidos com as variações da temperatura.

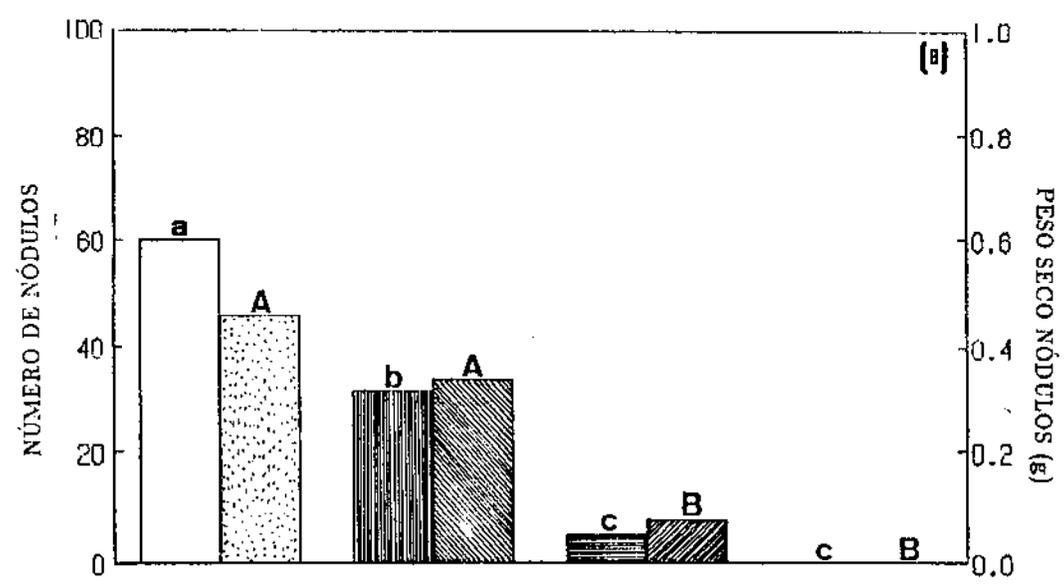
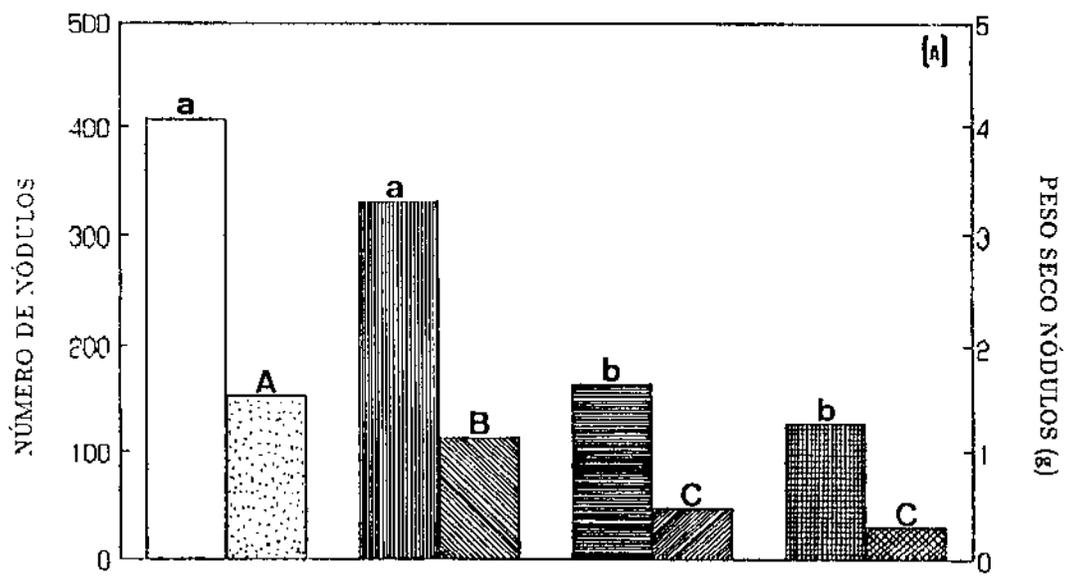
4.4.1 NÚMERO E PESO SECO DOS NÓDULOS

Na Figura 14 estão apresentados os resultados da contagem e peso da matéria seca dos nódulos encontrados em ambos os sistemas de cultivo.

Pode-se observar que o número de nódulos das plantas controle, cultivadas em vermiculita/hidropônica, foram significativamente diferentes daquelas tratadas com alumínio. Porém, não houve diferenças significativas entre as plantas que receberam alumínio no momento da inoculação (estádio V_1) e aquelas que o receberam no estágio V_3 .

O número de nódulos das plantas cultivadas em hidroponia com alumínio foram significativamente diferentes entre si. As plantas que receberam alumínio no estágio V_2 , isto é, quando os nódulos já estavam em desenvolvimento, apresentaram um pequeno número de nódulos (05 nódulos/planta), enquanto aquelas que receberam alumínio no momento da inoculação, apresentavam no final do experimento número de nódulos igual a zero.

Nestes resultados pôde-se constatar a influência de dois fatores sobre a no-



dulação: a presença de alumínio e a variação de temperatura.

Os efeitos da baixa temperatura nas raízes podem afetar indiretamente a nodulação e o processo de fixação de nitrogênio, particularmente no fornecimento e translocação de carboidratos para os nódulos, além de poder ter um efeito direto sobre o microorganismo simbiote (MATTHEWS e HAYES, 1982). Segundo estes autores, plantas de soja inoculadas, crescendo em solos com baixo teor de nitrogênio, sofreram um período maior de deficiência de nitrogênio nas primeiras semanas após a germinação com abaixamento de temperatura, do que plantas não inoculadas crescendo em solos com nitrogênio mineral.

Esta afirmativa está em concordância com o observado neste experimento, onde as plantas em hidropônica apresentaram um amarelecimento mais prolongado das folhas nas primeiras semanas, do que as plantas cultivadas em vermiculita/hidropônica, apesar de uma quantidade mínima de nitrogênio mineral só ter sido adicionado nas duas primeiras semanas, para contornar o período de "fome" de nitrogênio que ocorre neste período, e depois disso, não haver nitrogênio em nenhuma das soluções nutritivas.

O peso da matéria seca dos nódulos pode estar associado com a sua efetividade na fixação de nitrogênio. Comparando os resultados obtidos nos dois sistemas de cultivo, observa-se que somente a acidez da solução (controle pH 4.0) não afetou o estabelecimento dos nódulos no sistema vermiculita/hidropônica mas houve um pequeno, mas significativo efeito sobre a produção de matéria seca (Figura 14a), enquanto que no experimento anterior não foram observadas diferenças entre os controles com relação a estes parâmetros analisados (Figura 11). Do mesmo modo, o alumínio adicionado no momento da inoculação (estádio V_1) e quando os nódulos já estavam estabelecidos mas em processo de crescimento (estádio V_3), exerceu o mesmo efeito estressante nas plantas cultivadas em vermiculita/hidropônica. A variação de temperatura teve a mesma ação em ambos os sistemas, pois houve diminuição do número e peso seco dos nódulos, quando se compara estes resultados

com aqueles apresentados anteriormente.

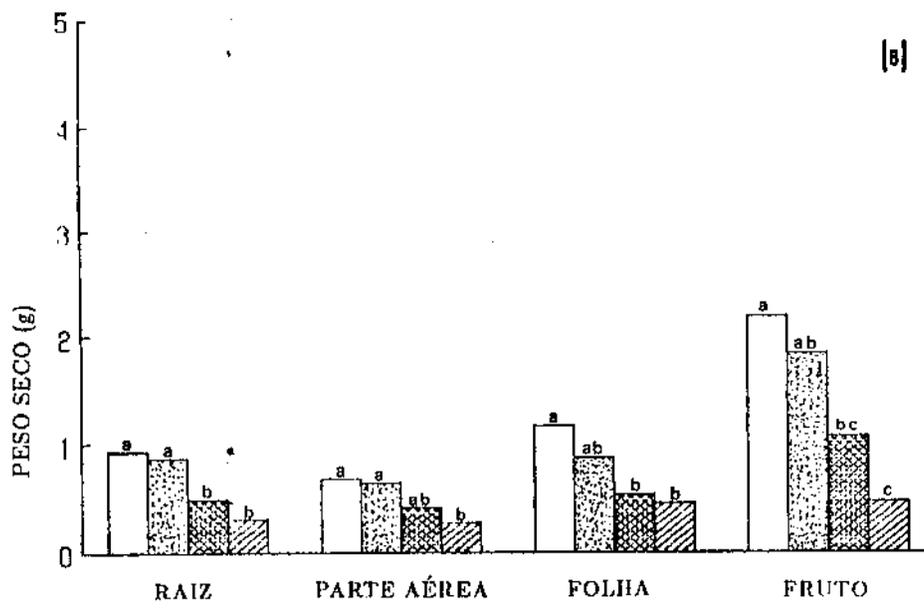
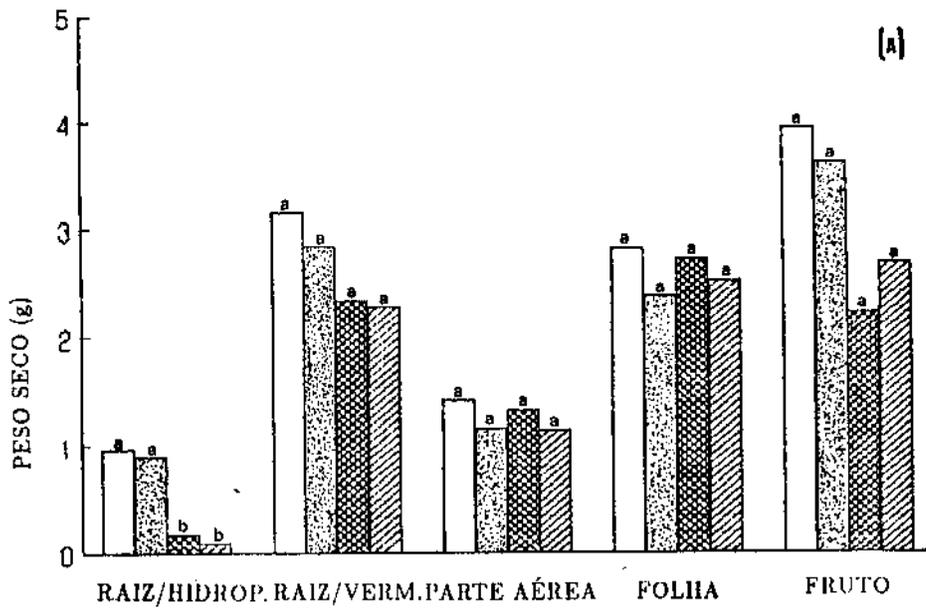
Nas plantas cultivadas em hidropônica, a somatória de efeitos (presença de alumínio e temperaturas baixas) foi mais evidente provavelmente devido ao contato direto de todo o sistema radicular com ambos. Todavia, examinando simultaneamente os resultados apresentados aqui (Figura 14b) com aqueles observados na Figura 7, podemos afirmar que a acidez, por si só, afeta o estabelecimento do nódulo mas não interfere na produção de matéria seca destes. Por sua vez, o alumínio inibe o desenvolvimento dos nódulos já formados e seu efeito é mais proeminente quando adicionado nos estádios iniciais do desenvolvimento da planta.

4.4.2 PESO SECO DA RAÍZ E DA PARTE AÉREA

Na determinação da matéria seca, somente a parte apical das raízes das plantas cultivadas em verniculita/hidropônica apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, enquanto que as plantas cultivadas no sistema em hidropônica, as diferenças aparecem em todos os órgãos (Figura 15).

Os resultados obtidos com as plantas cultivadas em verniculita/hidropônica concordam com as afirmativas de FOY (1976), de que a toxidez causada pelo alumínio é especialmente prejudicial nos solos ácidos porque restringe a profundidade das raízes e suas ramificações, causando uma diminuição do uso dos elementos minerais do subsolo.

Trabalhos com leguminosas forrageiras, têm mostrado que os efeitos de toxicidade do alumínio são mais severos sobre a nodulação do que sobre o crescimento da planta hospedeira ou do microorganismo de vida livre (CARVALHO et al., 1981; 1982; MURPHY et al., 1984). OGATA et al., (1986), ao avaliar o efeito do alumínio sobre o crescimento e fixação de N_2 destas plantas, sugeriram que os efeitos de toxicidade do alumínio nas plantas hospedeiras afetaram mais a fixação de N_2 pelos nódulos do que o crescimento da planta inteira. Estas afirmativas

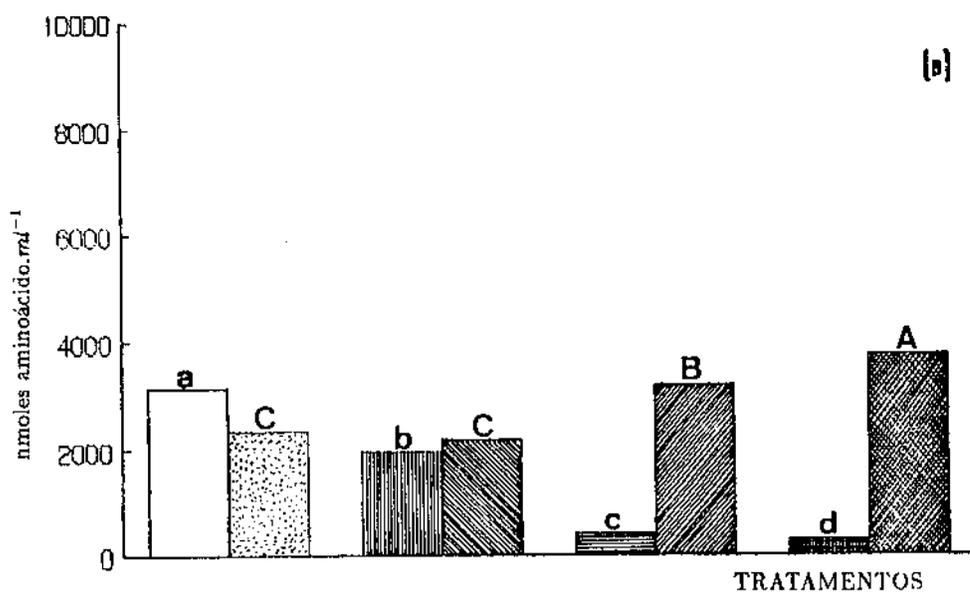
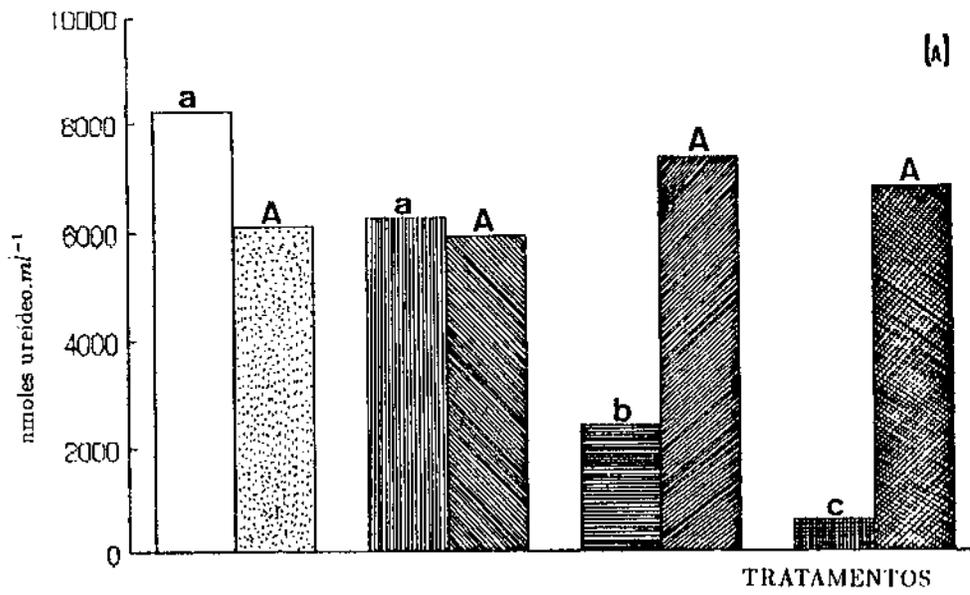


concordam com os resultados obtidos nas plantas cultivadas em vermiculita/hidropônica, onde o efeito do alumínio foi bem evidente somente na parte apical das raízes (Figura 15a).

Nas plantas em hidroponia, a adição de alumínio no estágio V_0 e V_2 afetou significativamente a produção de matéria seca quando comparadas com os controles (Figura 15b). Os resultados obtidos mostram que o alumínio provocou uma diminuição no número e peso seco dos nódulos, menor produção de matéria seca das raízes e parte aérea. Apesar de não haver diferença na análise estatística entre os dois tratamentos com alumínio, pode-se observar na figura que a produção de matéria seca pelas plantas que receberam alumínio no estágio V_0 foi menor (peso seco total = 1.57g) do que a produção de matéria seca das plantas que o receberam no estágio V_2 (peso seco total = 2.56), o que confirma as observações feitas anteriormente, de que o efeito do alumínio pode ser demonstrado quando este está presente desde os estádios iniciais do desenvolvimento da planta.

4.4.3 ANÁLISE DE UREÍDEOS E AMINOÁCIDOS TOTAIS

Os resultados dos experimentos I e II demonstraram o efeito do alumínio diminuindo o número e peso da matéria seca dos nódulos e a forte relação entre a redução dos nódulos e o conteúdo de solutos nitrogenados transportados pelo xilema destas plantas. A Figura 16 representa a análise do conteúdo total de aminoácidos e ureídeos encontrados na seiva do xilema das plantas cultivadas em solução hidropônica e das plantas cultivadas no sistema vermiculita/hidropônica, onde a parte basal do sistema radicular recebia solução nutritiva sem nitrogênio com pH6-7 (em vermiculita) e a parte apical recebia diferentes soluções nutritivas em hidropônica. Deste modo, as variações de temperaturas ocorridas durante o período experimental afetaram ambos os sistemas e, assim, os resultados podem



ser comparados igualmente. O conteúdo total de aminoácidos das plantas cultivadas em verniculita/hidropônica não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos diversos tratamentos (Figura 16a).

Porém, quando se compara estes resultados com aqueles mostrados na Figura 13 pode-se observar que enquanto o controle pH6-7 continha 1.196,80 nmoles.ml⁻¹, agora houve um aumento de aminoácidos com um resultado de 6.127,15 nmoles.ml⁻¹. Este aumento no conteúdo de aminoácidos foi encontrado em todos os tratamentos, e poderia significar que a seiva estava mais concentrada. Da mesma forma o conteúdo de ureídeos foi mais alto, tendo sido encontrado 8.255,67 nmoles.ml⁻¹ no exsudato deste controle. Apesar disto, a relação ureídeo/aminoácido caiu muito; controle pH 6-7 = 1.34; controle pH 4.0 = 1.05; 10 ppm de Al⁺³ em V₃ = 0.32 e 10 ppm de Al⁺³ em V₁ = 0.08; enquanto que nos experimentos anteriores os controles apresentavam sempre uma relação ureídeo/aminoácido maior que 2.0. Durante o desenvolvimento deste experimento, as plantas sofreram os efeitos de variação da temperatura ocorridas na região. Deste modo, houve redução do número de nódulos e pelo que pode-se observar, redução da fixação de N₂.

SCHWEITZER e HARPER (1980), analisando o efeito de luz, escuro e temperatura sobre a atividade dos nódulos de soja, através da redução de acetileno, constataram que a redução de temperatura na rizosfera provocava uma considerável redução da atividade dos nódulos. Este efeito também foi observado quando a parte aérea era submetida a baixas temperaturas. O efeito do alumínio adicionado à parte apical do sistema radicular em dois estádios diferentes do desenvolvimento das plantas de soja foi bem evidente. Enquanto nos controles o conteúdo de ureídeos foi ligeiramente maior que 50%, no tratamento em que o alumínio foi adicionado no estádio V₃ somente 24% do conteúdo da seiva do xilema constituía-se de ureídeo e no tratamento onde o alumínio foi adicionado no estádio V₀, foi encontrado somente 8% de ureídeo. Os resultados obtidos com as plantas cultivadas

em solução nutritiva (Figura 16b) foram estatisticamente semelhantes àqueles obtidos anteriormente (Figura 10), porém a relação ureídeo/aminoácido foi bastante alterada. Esta relação no controle pH 6-7 foi de 1.35; no controle pH 4.0 foi 0.90 e os maiores efeitos foram notados nos tratamentos com alumínio, onde a relação encontrada foi de 0.12 no tratamento em V_2 e de 0.08 em V_0 . Estes resultados nos tratamentos com alumínio parecem confirmar as afirmativas de MATSUMOTO et al. (1977a), que observaram em plantas de soja não nodulantes a produção de pequena quantidade de ureídeo. No tratamento com alumínio em V_0 não foi produzido nenhum nódulo e foi encontrado cerca de 8% de ureídeo na seiva do xilema, enquanto que no tratamento onde o alumínio foi adicionado no estágio V_2 foram encontrados em média 05 nódulos por planta, produzindo 11% de ureídeos. Estes resultados parecem concordar com a idéia de que houve uma somatória de efeitos durante esta fase experimental (efeito do alumínio e efeito da temperatura). Estudos anteriores descrevem os efeitos imediatos de baixas temperaturas na raiz, sobre a atividade da nitrogenase (DUKE et al., 1979; LAYSELL et al., 1984), o desenvolvimento dos nódulos (FYSON e SPRENT, 1982), a fotossíntese (HARDING e SHEEHY, 1980), o fracionamento da matéria seca (POLLOCK et al., 1983) ou o transporte de nitrogênio (THOMAS e SPRENT, 1984). WALSH e LAYZELL, (1986), trabalhando com plantas de soja inoculadas e submetidas a baixas temperaturas observaram uma diminuição da taxa líquida de fixação de N_2 . Como resposta, a planta retinha nitrogênio nos tecidos das raízes noduladas e diminuía o fracionamento de N para os tecidos jovens do caule, deste modo induzindo a remobilização de N das folhas mais velhas e reduzindo o desenvolvimento da área foliar. A taxa de fotossíntese líquida em relação a uma área específica não foi afetada durante o período estudado pelos autores, entretanto a respiração do caule e raízes noduladas diminuiu. Estes trabalhos podem ajudar a explicar o pequeno número de nódulos observados nos tratamentos com alumínio, menor produção de matéria seca e menor produção de ureídeos. Do mesmo modo, o aumento na concentração

de aminoácidos encontrados na seiva do xilema (Figura 16b), poderia ser explicado através da remobilização de N das partes mais velhas e aumento do catabolismo de macromoléculas contendo nitrogênio. Assim, a ação do alumínio foi melhor evidenciada aqui. Tanto no cultivo em vermiculita/hidropônica quanto no cultivo em hidropônica, a adição deste íon nos estádios iniciais do desenvolvimento das plantas parece ter provocado inibição da nodulação e inibição da fixação de N_2 . Como consequência, pode ter havido menor distribuição de N para as partes mais jovens o que provocaria uma redistribuição de solutos nitrogenados das partes mais velhas. Como o alumínio parece induzir uma inibição da síntese de proteínas, estes solutos estariam em constante circulação pelo corpo da planta.

4.4.4 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS EM HPLC

O fato de vários pesquisadores ao trabalharem com plantas de soja, noduladas ou tratadas com sais de NO_3^- ou de NH_4^+ , analisarem o conteúdo da seiva do xilema, tanto para ureídeos como para aminoácidos e a constatação de que a presença destes sais afetam tanto a relação ureídeos/aminoácidos, quanto a razão ASN/GLN transportados (STREETER, 1972; McCLURE e ISRAEL, 1979; PATE et al.,1980), levou-nos a concluir este trabalho examinando o conteúdo de aminoácidos transportados na seiva do xilema, de plantas de soja inoculadas e submetidas ao tratamento com alumínio.

STREETER (1972), trabalhando com plantas de soja noduladas, em condições de campo, encontrou a asparagina (ASN) como o aminoácido predominante no exsudato de todas as amostras coletadas. McCLURE e ISRAEL (1979), analisando a distribuição de compostos nitrogenados na

seiva do xilema, de plantas de soja noduladas, cultivadas em solução nutritiva sem nitrogênio e plantas de soja não noduladas, cultivadas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de KNO_3 , também encontrou a ASN como o aminoácido predominante, presente na seiva do xilema. Todavia, a concentração de ASN foi diferente nos diferentes tratamentos. Enquanto nas plantas inoculadas ASN correspondia a 53% do total de N-aminoácidos, para as plantas não inoculadas e tratadas com KNO_3 , os autores encontraram 73% de ASN.

A análise do conteúdo de aminoácido do exsudato do xilema das plantas de soja cultivadas em vermiculita/hidropônica obtidos através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), mostra claramente que ASN foi o aminoácido predominante em todos os tratamentos (Tabela 2), seguido de glutamina (GLN) e de ácido aspártico (ASP). Porém, analisando a razão ASN/GLN em cada tratamento constata-se que, nos tratamentos com alumínio, esta razão aumentou muito (Tabela 3). Estes resultados estão em concordância com aqueles encontrados por PATE et al. (1980) em plantas de soja dependentes da fixação biológica de nitrogênio e plantas de soja supridas com NO_3^- .

Os autores sugerem que a composição da seiva do xilema pode ser usada para avaliar a efetividade da fixação biológica de N_2 em plantas noduladas. Eles relatam que em plantas de soja não noduladas a porcentagem de N orgânico como ureídeos, presente na seiva, diminuiu cerca de 50%, enquanto que a razão ASN/GLN aumentou bastante. Os autores descrevem a hipótese sugerida em trabalhos anteriores de que o grupo amida da glutamina é o produto inicial da assimilação da amônia após a fixação biológica do N_2 ou redução de NO_3^- , e que este N serve diretamente na síntese de glutamato e na síntese do grupo amida da ASN pela reação de transamidação com aspartato. A formação de ureídeo, baseada na biossíntese de purina, requer dois átomos de N amida, ou como GLN, ou como ASN e um átomo de N do aspartato, para formar 3 ou 4 átomos de N do eídeo. Isto sugere que uma menor produção de ASN deveria ser esperada se os ureídeos estivessem

Tabela 2 - Composição de aminoácidos do exsudato do xilema.¹

Aminoácidos %	Controle pH 6-7	Controle pH 4.0	10ppm Al^{+3} V_3	10ppm Al^{+3} V_1
ASN	39.76	38.52	48.21	48.84
GLN	21.76	23.05	14.76	11.67
ASP	11.02	11.53	11.15	9.90
PRO	2.15	1.97	3.47	3.26
SER	8.87	8.43	6.33	7.42
ILE-LEU	1.61	1.96	2.07	2.10
MET	3.22	3.80	0.67	0.84
VAL	0.54	0.63	1.51	1.63
PHE	1.27	1.55	0.83	0.95
ALA	1.75	1.33	2.11	1.69
ARG-THR	3.83	3.65	4.07	4.27
GLU	2.42	1.69	2.11	2.25
OUTROS	1.80	1.90	2.70	5.18

Tabela 3 - Razão ASN/GLN e concentração de ureídeos na seiva do xilema

Tratamento	ASN/GLN	% Ureídeo
Controle pH 6-7	1.82	57.80
Controle pH 4.0	1.67	51.50
10ppm Al^{+3} em V_3	3.26	24.74
10ppm Al^{+3} em V_1	4.18	8.21

¹Os dados foram obtidos da média de 4 amostras de exsudato, de plantas crescidas em vermiculita/hidropônica no estágio R_5 .

sendo sintetizados. Assim, a síntese de ureídeos poderia ser prevista como competitiva com a formação de ASN. Entretanto, os autores levantam dúvidas sobre esta hipótese e sugerem que as diferenças observadas na composição da seiva poderiam ter outras possíveis explicações, como por exemplo: os nódulos poderiam simplesmente ter baixa atividade de asparagina sintetase ou poderiam existir diferenças básicas na disponibilidade de 4C em oposição aos 5C dos cetoácidos nos nódulos e raízes, ou ainda, os nódulos e raízes poderiam ter um comportamento diferente nas taxas relativas pelas quais as duas amidas (ASN e GLN) são transportadas pelo xilema. Assim, ASN está geralmente presente em concentrações mais altas do que GLN e a composição da seiva do xilema não muda muito com a forma de nitrogênio assimilado (por exemplo: N_2 , NO_3^- , NH_4^+ , uréia). Em contraste, as leguminosas produtoras de ureídeos, examinadas por eles, mostraram concentrações diferentes de compostos nitrogenados no xilema quando eram exclusivamente simbióticas ou quando assimilavam nitrato. Uma alta proporção de N-ureídeo e alto nível de GLN para ASN (razão ASN/GLN geralmente menor ou igual a 1) foi encontrado nas plantas dependentes da fixação de nitrogênio. Uma redução na produção de N-ureídeo e alto nível de ASN para GLN foi típico de plantas que assimilaram NO_3^- .

Estas constatações concordam com os resultados apresentados na Tabela 3, onde pode-se observar a baixa porcentagem de ureídeo produzido nas plantas que receberam alumínio no estágio V_1 e o aumento da razão ASN/GLN, enquanto que nos controles a porcentagem de ureídeo é de cerca de 50% e a razão ASN/GLN é menor que 2.0. Foi também observado uma ligeira redução de metionina (MET), e um pequeno aumento de prolina (PRO) e valina (VAL) nos tratamentos com alumínio. Os resultados obtidos na análise cromatográfica do exsudato do xilema coletado das plantas de soja noduladas, cultivadas em hidroponia e submetidas ao estresse de alumínio, estão representados na Tabela 4. Aqui, também, a ASN é o aminoácido transportado em maior quantidade em todos os tratamentos.

Tabela 4 - Composição de aminoácidos do exsudato do xilema²

Aminoácidos %	Controle pH 6-7	Controle pH 4.0	10ppm Al^{+3} V_2	10ppm Al^{+3} V_0
ASN	32.10	30.84	34.77	38.24
GLN	19.99	23.16	8.75	8.28
ASP	7.28	5.47	7.45	7.80
PRO	4.98	4.64	8.76	8.81
SER	7.50	7.38	9.30	9.45
ILE-LEU	5.16	4.75	5.82	5.92
MET	4.98	5.26	3.65	1.95
VAL	4.98	3.94	5.70	5.95
PHE	3.59	5.72	2.35	0.83
ALA	3.14	2.49	3.98	4.00
ARG-THR	2.29	2.36	3.58	3.77
GLU	2.01	1.94	3.79	3.83
OUTROS	2.00	2.05	2.10	1.17

Tabela 5 - Razão ASN/GLN e concentração de ureídeos na seiva do xilema

Tratamento	ASN/GLN	% Ureídeo
Controle pH 6-7	1.60	57.55
Controle pH 4.0	1.33	47.53
10ppm de Al^{+3} em V_2	3.97	11.47
10ppm de Al^{+3} em V_0	4.61	7.69

²Os dados foram obtidos da média de 4 amostras de exsudato, de plantas plantas crescidas em solução nutritiva no estádio R_5 .

Entretanto, a taxa ASN/GLN foi muito mais alta nas plantas que receberam 10 ppm de alumínio do que no controle pH 4.0 e no controle pH 6-7. A porcentagem de ureídeos encontrados na seiva do xilema diminuiu muito à medida que o alumínio foi adicionado mais cedo, todavia a relação ASN/GLN foi maior do que 3 nos tratamentos com alumínio (Tabela 5). Quando estes resultados são comparados com aqueles apresentados na Tabela 3, resultantes das análises realizadas com as plantas cujas raízes só recebiam alumínio na porção apical, observa-se que o efeito do alumínio é mais evidente nas plantas cultivadas em hidropônica. Nas plantas que receberam este elemento quando os nódulos já haviam iniciado seu desenvolvimento (10 ppm de Al^{+3} em V_2 e V_3), a nodulação foi pequena, em ambos os sistemas de cultivo, porém foi muito menor nas plantas em hidropônica e aí ocorreu também menor produção de ureídeos e maior razão ASN/GLN. Nas plantas que receberam alumínio no momento da inoculação, a porcentagem de ureídeo produzido e a razão ASN/GLN são semelhantes, em ambos os sistemas de cultivo, mesmo com a presença de nódulos no cultivo em vermiculita/hidropônica e ausência deles no cultivo em hidropônica.

Estes resultados são bem semelhantes àqueles encontrados por McCLURE e ISRAEL (1979) em plantas de soja não inoculadas recebendo nitrogênio combinado, onde as formas predominantes de nitrogênio transportado foram aminoácidos e nitrato, e com plantas de soja noduladas, os ureídeos foram o maior agente de transporte de nitrogênio do xilema. Estes resultados também confirmam a sugestão anterior de que o alumínio afeta diretamente a atividade nodular. SCHUBERT (1981), comparando a atividade de enzimas da biossíntese de purinas observou que, no estágio inicial do desenvolvimento de plantas de soja, um rápido declínio na concentração de aminoácidos no exsudato do xilema assinala o início da fixação ativa do nitrogênio e um aumento linear na massa do nódulo. Entretanto, nos tratamentos com alumínio deste estudo, o número de nódulos foi sempre muito pequeno, mostrando que o alumínio afeta o desenvolvimento dos nódulos já for-

mados (caso dos tratamentos em V_2 e V_3), bem como inibe a formação dos nódulos ou talvez a infecção do *Bradyrhizobium japonicum* (caso dos tratamentos em V_0 e V_1).

Baseados nas medidas "in vitro" do requerimento de ATP para a redução de N_2 pela nitrogenase e estudo com plantas inteiras do efeito da alteração da fotossíntese sobre as taxas de fixação de nitrogênio, vários trabalhos têm sugerido que a disponibilidade de carbono reduzido fotossinteticamente, é o maior fator limitante da fixação biológica do nitrogênio (HARDY e HAVELKA, 1977). Esta descrição dos efeitos da fotossíntese sobre a fixação biológica de nitrogênio parece estar em concordância com os resultados apresentados aqui, pois em todos os experimentos pôde-se observar a pequena produção de matéria seca pelas folhas, nos tratamentos com alumínio. Este efeito foi mais acentuado nas plantas cultivadas em solução nutritiva, onde o alumínio agia diretamente em todo o sistema radicular, e mais suave nas plantas cultivadas em vermiculita/hidropônica.

Conforme discutido na revisão da literatura, a diminuição da nodulação e funcionamento dos nódulos provocada pela presença do alumínio induziu a deficiência de nitrogênio e limitou o crescimento da planta. Por outro lado, a diminuição do crescimento da planta provocado pela presença do alumínio limitou a nodulação e a fixação do N_2 . Seguindo as sugestões de MUNNS et al. (1981), os resultados parecem concordar com a primeira afirmativa, onde a diminuição da nodulação, constatada pela contagem dos nódulos e sua produção de matéria seca, e o baixo funcionamento dos nódulos, observada através da análise do teor de ureídeos e aminoácidos e da razão ASN/GLN transportados, apontam para a deficiência de nitrogênio, o que pode ter provocado o menor crescimento das plantas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através deste trabalho permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

- O alumínio inibe o processo de nodulação em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa), exercendo seu efeito tanto sobre o estabelecimento dos nódulos como sobre seu crescimento;
- A inibição do estabelecimento dos nódulos é uma função mais do pH baixo do que do alumínio "per si", enquanto que a inibição do crescimento dos nódulos é devido principalmente ao alumínio e não ao pH baixo;
- O efeito do alumínio sobre a nodulação ocorre em concentrações baixas (até 2 ppm) e não é muito intensificado por concentrações maiores (5 ou 10 ppm), enquanto que os efeitos deste íon sobre o crescimento e/ou desenvolvimento da planta inteira são aumentados em função da concentração;
- Independente do seu efeito sobre a nodulação, o alumínio inibe a produção de ureídeos, o que indica uma inibição do processo de fixação do nitrogênio. Um aumento na razão ASN/GLN, constatado através da análise de aminoácidos transportados pelo xilema, também confirma esta afirmativa;

- O alumínio exerce estes efeitos sobre a nodulação e sobre a atividade do nódulo mesmo quando aplicado de forma indireta, ou seja, na região mais profunda do sistema radicular, distante dos sítios de nodulação. Entretanto, os efeitos são mais pronunciados quando o íon é aplicado diretamente na região dos nódulos;
- Os dados obtidos aqui, permitem sugerir que a correção dos solos ácidos, com alto teor de alumínio, apenas na camada superficial (camada arável) não é suficiente para eliminar os efeitos prejudiciais deste íon, sobre a nodulação e sobre o fracasso de fixação de N_2 , em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa).

6 RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito indireto do alumínio, simulando calagem superficial de solos ácidos, sobre a fixação biológica do nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa), este trabalho foi desenvolvido em duas etapas.

A primeira foi conduzida objetivando-se avaliar o efeito direto do alumínio sobre a capacidade da planta em fixar o nitrogênio. Inicialmente as plantas foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e cultivadas em solução nutritiva sem nitrogênio, pH 4.0, baixa concentração de fósforo e com níveis de 2, 5 e 10 ppm de alumínio. Um controle pH 4.0 foi utilizado a fim de se obter melhores esclarecimentos do efeito da acidez do meio sobre a fixação biológica do nitrogênio.

Os resultados parecem indicar que a redução do estabelecimento dos nódulos está mais na dependência da acidez do meio do que em função da presença do alumínio, enquanto que a redução do crescimento dos nódulos foi um efeito direto da presença do íon em questão. Se, por um lado, os efeitos do alumínio sobre o processo de nodulação não foram linearmente correlacionados, por outro lado, observou-se que o crescimento e/ou desenvolvimento da planta como um todo, foram dependentes da concentração do íon no meio de cultura.

Para esclarecer o efeito do alumínio aplicado em diferentes estádios do desenvolvimento das plantas de soja, um experimento foi conduzido sendo o alumínio (10 ppm) adicionado à solução nutritiva no estádio V_0 junto com o inóculo, visando verificar seu efeito sobre o estabelecimento dos nódulos; no estádio V_2 com a fina-

lidade de verificar seu efeito sobre o crescimento dos nódulos e no estágio R_4 , ou seja, após o crescimento dos nódulos para verificar seu efeito sobre a nitrogenase. Os resultados obtidos mostram que o efeito do alumínio sobre a nodulação é maior quando o íon está presente logo nas fases iniciais do desenvolvimento da planta. Independente do seu efeito sobre a nodulação o alumínio induziu uma redução dos teores de ureídeos bem como um aumento da relação de ASN/GLN presentes na seiva do xilema, sugerindo um efeito inibitório no processo de fixação simbiótica do N_2 .

A segunda etapa foi designada para investigar o efeito do alumínio presente somente na parte apical do sistema radicular. Para isto, utilizou-se um sistema que possibilitou a aplicação do íon apenas na parte mais profunda das raízes (em hidropônica). O alumínio inibiu tanto a nodulação quanto a atividade dos nódulos. Estes dados permitem sugerir que a correção dos solos ácidos, com alto grau de alumínio, apenas na camada superficial (camada arável) não é suficiente para sobrepujar os efeitos prejudiciais deste íon, principalmente sobre o processo de nodulação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S. e EVANS, H. J. 1960. Cobalt: A micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions. *Soil Sci.*, 90:205-10.
- ALAM, S. M. e ADAMS, W. A. 1980. Effects of aluminum upon the growth and nutrient composition of oats. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 23:130-5.
- ALBRECHT, W. A. e DAVIS, F. L. 1929. Relation of calcium to nodulation of soybeans in acid e neutral soils. *Soil Sci.*, 28:261-74.
- ALVA, A. K., EDWARD, D. G., ASHER, C. J. e BLAMEY, F. P. C. 1986a. Effects of phosphorus/aluminum molar ratio and calcium concentration on plant response to aluminum toxicity. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50:133-7.
- ALVA, A. K., EDWARD, D. G., ASHER, C. J. e BLAMEY, F. P. C. 1986b. Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50:959-62.
- ALVA, A. K., EDWARD, D. G., ASHER, C. J. e SUTHIPRADIT, S. 1987. Effects of acid soil infertility factors on growth and nodulation of soybean. *Agron. J.*, 79:302-6.

- ANDREW, C. S. e VANDEN BERG, P. J. 1973. The influence of aluminum on phosphate sorption by whole plants and excised roots of some pasture legumes. *Aust. J. Agric. Res.*, 24:341-51.
- ATKINS, C. A., RAINBIRD, R. e PATE, J. S. 1980. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N_2 -fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. J.). *Z. Pflanzenphysiol.*, 97:249-60.
- AWAD, A. S., EDWARDS, D. G. e MULHAIN, P. J. 1976. Effect of pH and phosphate on soluble soil aluminum and in growth and composition of kikuyu grass. *Plant Soil*, 45:531-42.
- BENNET, R. J., BREEN, C. M. e FEY, M. V. 1985a. Aluminum uptake sites in the primary root of *Zea mays* L. S. *Afr. J. Plant Soil*, 2:1-7.
- BENNET, R. J., BREEN, C. M. e FEY, M. V. 1985b. The primary site of aluminum injury in the root of *Zea mays* L. S. *Afr. J. Plant Soil*, 2:8-17.
- BRUCE, R. C., WARRELL, L. A., EDWARDS, D. G. e BELL, L. C. 1988. Effects of aluminum and calcium in the soil solution of acid soil on root elongation of *Glycine max* cv. Forrest. *Aust. J. Agric. Res.*, 38:319-38.
- CALBO, A. G. 1978. Efeito do alumínio sobre a absorção, o transporte e a distribuição de alguns elementos minerais em dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Viçosa. Tese (Mestrado). 43 p., Universidade Federal de Viçosa.
- CAMPBELL, T. A., NUERNBERG, N. J. e FOY, C. D. 1989. Differential responses of alfafa cultivars to aluminum stress. *J. Plant Nutr.*, 12(3):291-305.

- CARVALHO, M. M. de., EDWARDS, D. G., ASHER, C. J. e ANDREW, C. S. 1981. Aluminum toxicity, nodulation, and growth of *Stylosanthes* species. *Agron. J.*, 73:261-5.
- CARVALHO, M. M. de., EDWARDS, D. G., ASHER, C. J. e ANDREW, C. S. 1982. Effects of aluminum on nodulation of two *Stylosanthes* species grown in nutrient solution. *Plant Soil*, 64:141-52.
- CAMBRAIA, J. 1989. Mecanismos de tolerância à toxidez de alumínio em plantas. *Anais da II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal*. Piracicaba, ESALQ. pp.85-92.
- CAMBRAIA, J. e CALBO, A. G. 1980. Efeito do alumínio sobre a absorção e sobre o transporte de fósforo em dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.). *R. Ceres*, 27(154):615-25.
- CLARKSON, D. T. 1966. Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. *Plant Physiol.*, 41:165-72.
- DUKE, H. S., SCHRADER, E. L., HENSON, A. C., SERVAITES, C. J. VOGELZANG, D. R. e PENDLETON, W. J. 1979. Low root temperature effects on soybean nitrogen metabolism and photosynthesis. *Plant Physiol.*, 63:956-62.
- EDWARDS, J. H. e HORTON, B. D. 1977. Aluminum induced calcium deficiency in peach seedlings. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 102:459-61.

- EINARSSON, S., JOSEFSSON, B. e LAGERKVIST, S. 1983. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.*, 282:609-18.
- EPSTEIN, E. 1969. Mineral metabolism of halophytes. In: I. H. Rorison ed.. *Ecological aspects of the mineral nutrition of plants*. Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburg. pp.381-97.
- FEHR, W. R., CAVINESS, C. E., BURMOOD, D. T. e PENNINGTON, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.*, 11:929-31.
- FOY, C. D. 1974. Effects of aluminum on plant growth. In: E.W.Carson ed.. *The plant root and its environment*. University Press of Virginia. pp.601-42.
- FOY, C. D. 1976. Differential aluminum and manganese tolerances of plant species and varieties in acid soils. *Ciênc. Cult.*, 28(2):150-5.
- FOY, C. D. 1982a. Effect of nutrient deficiencies and toxicities in plants: Acid soil toxicity. In: C. D. Foy. *The physiology of plant adaptation to mineral stress*. Iowa State J. Res., 57 (4):355-91.
- FOY, C. D. 1982b. Effects of soil acidity on plants. Invitational contribution to an EPA "Acidic Deposition Critical Assessment Document" being prepared under cooperative agreement between EPA and North Carolina State Univ., Raleigh, N.C. In: C. D. Foy. *The physiology of plant adaptation to mineral stress*. Iowa State J. Res., 57 (4):355-91.

- FOY, C. D. 1983. The physiology of plant adaptation to mineral stress. *Iowa State J. Res.*, 57 (4):355-91.
- FOY, C. D. e FLEMING, A. L. 1978. The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils. In: G. A. Jung, ed.. *Crop tolerance to suboptimal land conditions. Am. Soc. Agron. Spec. Publ.*, 32:301-28.
- FOY, C. D., CHANEY, R. L. e WHITE, M. C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29:511-66.
- FRANCO, A. A. e MUNNS, D. N. 1982. Nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. *Plant Soil*, 66:149-60.
- FRED, E. B., WILSON, P. W. e WISS, O. 1938. Light intensity and the nitrogen hunger period in the Manchu soybean. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24:46-52.
- FREIRE, J. R. J. 1976. Comportamento da soja e do seu rhizobio ao Al e Mn nos solos do Rio Grande do Sul. *Ciênc. Cult.*, 28 (2):169-70.
- FUJIHARA, S. e YAMAGUCHI, M. 1978. Effects of allopurinol [4-hydroxy pyrazolo (3,4-d) pyrimidine] on the metabolism of allantoin in soybean plant. *Plant Physiol.*, 62:134-8.
- FUJIHARA, S., YAMAMOTO, K. e YAMAGUCHI, M. 1977. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Physiol.*, 48:233-42.

- FYSON, A. e SPRENT, I. J. 1982. The development of primary root nodules in *Vicia faba* L. grown at two temperatures. *Ann. Bot.*, 50:681-92.
- GOMEZ-LEPE, B. E., LEE-STADELMAN, O. Y., PATTA, J. A. e STADELMAN, E. J. 1979. Effects of actylguanidine on cell permeability and other protoplasmic properties of *Allium cepa* epidermal cells. *Plant Physiol.*, 64:131-8.
- GOODLAND, R. 1971. Oligomorfismo e alumínio no cerrado. In: Ferri, M. G. (coord.). *III Simpósio sobre o Cerrado*. Editora Edgard Blucher Ltda-Editora da Universidade de São Paulo. pp.44-60.
- HARDING, C. S. e SHEEHY, E. J. 1980. Influence of shoot and root temperature on leaf growth, photosynthesis and nitrogen fixation of lucerne. *Ann. Bot.*, 45:229-33.
- HARDY, R. W. F. e HAVELKA, U. D. 1977. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In: Nutman, P. S., ed.. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge Univ. Press. London. pp. 421-39.
- HELIAR, K. R. 1978. Effects of aluminum and manganese toxicity on legume growth. In: Andrew, C. S. e Kamprath, E. J., eds.. *Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils*. Melbourne. Australia. pp.207-31.
- HERRIDGE, D. F. 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plants tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, 70:1-6.

- HERRIDGE, D. F., ATKINS, C. A., PATE, J. S. e RAINBIRD, R. M. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Physiol.*, 62:495-8.
- HOAGLAND, D. R. e ARNON, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circ.*, 347.
- HUETT, D. A. e MENARY, R. C. 1983. Effect of aluminum of growth and nutrient uptake of cabbage, lettuce, and kikuyu grass in nutrient solution. *Aust. J. Agric. Res.*, 31:749-61.
- IMSANDE, J. 1986. Nitrate-Ammonium ratio required for pH homeostasis in hydroponically grown soybean. *J. Exp. Bot.*, 37:341-7.
- IMSANDE, J. 1988. Interrelationship between plant developmental stage, plant growth rate, nitrate utilization and nitrogen fixation in hydroponically grown soybean. *J. Exp. Bot.*, 39(203):775-85.
- IMSANDE, J. e RALSTON, E. J. 1981. Hidroponic growth and the nondestructive assay for dinitrogen fixation. *Plant Physiol.*, 68:1380-4.
- JAMES, H., COURT, M. N., MacLEOD, D. A. e PARSONS, J. W. 1978. Soil factors and mycorrhizal factors activity on basaltic soils in Western Scotland. *Forestry*, 51:105-19.
- JONES, R. S., PATTERSON, R. P. e ROPER, C. D. Jr. 1981. The influence of temperature and nitrate on vegetative growth and nitrogen accumulation by nodulated soybeans. *Plant Soil*, 63:333-44.

- KEYSER, H. H. e MUNNS, D. N. 1979a. Effects of calcium, manganese and aluminum on growth of rhizobia in acid media. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43:500-3.
- KEYSER, H. H. e MUNNS, D. N. 1979b. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43:519-23.
- KHANNA-CHOPRA, R., KOUNDAL, K. R. e SINHA, S. K. 1984. A simple technique of studying water deficit effects on nitrogen fixation in nodules without influencing the whole plant. *Plant Physiol.*, 76:254-6.
- KLOTZ, F. e HORST, W. J. 1988. Genotypic differences in aluminium tolerance of soybean (*Glycine max* L.) as affected by ammonium and nitrate-nitrogen nutrition. *J. Plant Physiol.*, 132:702-7.
- KRIZEK, D. T. e FOY, C. D. 1988. Mineral element concentration of two barley cultivars in relation to water deficit and aluminum toxicity. *J. Plant Nutr.*, 11(4):369-86.
- LARKIN, P. J. 1987. Calmodulin levels are not responsible for aluminum tolerance in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, 14:377-85.
- LAYZELL, B. D., ROCHMAN, P. e CANVIN, T. D. 1984. Low root temperatures and nitrogenase activity in soybean. *Can. J. Bot.*, 62:965-71
- LEE, E. H. e FOY, C. D. 1986. Aluminum tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high-performance liquid chromatography. *J. Plant Nutr.*, 9(12):1481-98.

- MARCUS-WYNER, L. e RAINS, D. W. 1982. Simultaneous measurement of NH_4^+ absorption and N_2 fixation by *Glycine max* L.. Response to temperature, pH, and external nitrogen concentration. *Plant Physiol.*, 69:460-4.
- MATSUMOTO, H., MORITA, S. e HIRASAWA, E. 1979. Localization of absorbed aluminum in plant tissues and its toxicity studies in the inhibition of pea root elongation. In: Kudrev, T., Stoyanov, I. e Georgieva, V., eds.. *Mineral nutrition of plants*. Vol.1. Proc. 1st. Int. Symp. on Plant Nutrition, Bulg. Acad. Sci., Institute Physiol. Sofia. Bulgaria. pp.171-94.
- MATSUMOTO, T., YAMAMOTO, Y. e YATAZAWA, M. 1976. Role of root nodules in the nitrogen nutrition of soybeans. II. Fluctuation in allantoin concentration of the bleeding sap. *J. Sci. Soil Manure Jpn.*, 47:463-9.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977a. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulation soybean plants. *Plant Cell Physiol.*, 18: 353-9.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977b. Incorporation of $^{15}N_2$ into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}N_2$. *Plant Physiol.*, 18:459-62.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1977c. Effects of exogenous nitrogen compounds on the concentration of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant Cell Physiol.*, 18:613-24.

- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M. e YAMAMOTO, Y. 1978. Allantoin metabolism in soybean plants as influenced by grafts, a delayed inoculation with *Rhizobium* and a late supply nitrogen compounds. *Plant Cell Physiol.*, 19:1161-8.
- MATTHEWS, D. J. e HAYES, P. 1982. Effect of root zone temperature on early growth, nodulation, and nitrogen fixation in soya beans. *J. agric. Sci., Camb.* 98:371-6.
- McCLURE, P. R. e ISRAEL, D. W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.*, 64:411-6.
- McCLURE, P. R., ISRAEL, D. W. e VOLK, R. J. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N_2 fixation in soybeans. *Plant Physiol.*, 66:720-5.
- MENGEL, D. B. e KAMPRATH, E. J. 1978. Effect of soil pH and liming on growth and nodulation of soybeans in histosols. *Agron. J.*, 70:959-63.
- MOSQUIM, P. R. 1978. Influência do alumínio sobre o crescimento e o metabolismo em plantas de *Stylosanthes humilis* H.B.K. Tese (Mestrado). Viçosa. 29p. Universidade Federal de Viçosa.
- MUNNS, D. N. 1979. Soil acidity and nodulation. In: C. S. Andrew e E. J. Kamprath, ed. *Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soil*. CSIRO Melbourne. pp. 247-64.
- MUNNS, D. N., HOHENBERG, J. S., RIGHETTI, T. L. e LAUTER, D. J. 1981. Soil acidity tolerance of symbiotic and nitrogen-fertilized soybeans. *Agron. J.*, 73:407-10.

- MURPHY, H. E., EDWARDS, D. G. e ASHER, C. J. 1984. Effects of aluminum on nodulation and early growth of four tropical pasture legumes. *Aust. J. Agric. Res.*, 35:663-73.
- MUZILLI, O., SANTOS, D., PALHANO, J. B., MANETTI Fº, J., LANTMAN, A. F., GARCIA, A. e CATANEO, A. 1978. Tolerância de cultivares de soja e de trigo à acidez do solo. *R. bras. Ci. Solo*, 2:34-40.
- NAIDOO, G., STEWARD, J. McD. e LEWIS, R. J. 1978. Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. *Agron. J.*, 70:489-92.
- NASHOLM, T., SANDBERG, G. e ERICSSON, A. 1987. Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl-chloroformate derivatives. *J. chromatogr.*, 396:225-36.
- NOBLE, A. D. e SUMMER, M. E. 1988. Calcium and Al interactions and soybean growth in nutrient solutions. *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.*, 19(7-12):1119-31.
- OGATA, S., FUJITA, K. e MORISHIMA, K. 1986. Effect of Al concentration in culture solution on the growth and N₂-fixation of some tropical pasture legume. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 32 (1):27-35.
- OLIVEIRA, L. E. M. 1979. Crescimento e comportamento nutricional de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) submetidos a níveis de alumínio. Viçosa. Tese (Mestrado) 29p. Universidade Federal de Viçosa.

- OLMOS, J. I. L. e CAMARGO, M. N. 1976. Ocorrência de alumínio tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. *Ciênc. Cult.*, 28(2):171-80.
- OHYAMA, T. K. e KAMAZAWA, K. 1979. Incorporation of ^{15}N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to $^{15}\text{N}_2$ gas. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24:525-33.
- PATE, J. S. 1973. Uptake assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5:109-19.
- PATE, J. S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solute. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31:313-40.
- PATE, J. S., ATKINS, C. A., WHITE, S. T., RAINBIRD, R. M. e WOO, K. C. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.*, 65:961-5.
- PATE, J. S., SHARKEY, P. J. e ATKINS, C. A. 1977. Nutrition of a developing legume fruit. Functional economy in term of carbon, nitrogen, water. *Plant Physiol.*, 59:506-10.
- PATTERSON, T. G. e LaRUE, T. A. 1983a. N_2 fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans: Environmental effects and source-sink manipulations. *Crop Sci.*, 23:819-24.
- PATTERSON, T. G. e LaRUE, T. A. 1983b. N_2 fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans: ureides as an index of fixation. *Crop Sci.*, 23:825-31.

- PEAT, J. R., MINCHIN, F. R., JEFFCOAT, B. e SUMMERFIELD, R. J. 1981. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soya bean. *Ann. Bot.*, 48:177-82.
- POLLOCK, J.C., LLOYD, J. E., STODDART, L. J. e THOMAS, H. 1983. Growth, photosynthesis and assimilate partitioning in *Lolium temulentum* exposed to chilling temperatures. *Physiol. Plant.*, 59:259-62.
- RALSTON, E. J. e IMSANDE, J. 1983. Nodulation of hydroponically grown soybean plants and inhibition of nodule development by nitrate. *J. Exp. Bot.*, 34(147):1371-8.
- RAVEN, J. A. e SMITH, F. A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.*, 76:415-31.
- RORISON, I. H. 1958. The effect of aluminium on legume nutrition. In: E. C. Hallsworth, ed. *Nutrition of the legumes*. Butterworth,s. London. pp.43-58.
- SANTANA, M. B. e BRAGA, J. M. 1977. Aluminum-phosphorus interactions in acidic soils in Southern Bahia. *Revista Ceres*, 24:200-11.
- SANTORO, L. G., SOARES, T. E. e MAGALHÃES, A. C. 1984. Effect of aluminum on nitrate reduction in *Zea mays* L. *Phyton*, 44(1):75-80.
- SARTAIN, J. B. e KAMPRATH, E. J. 1975. Effect of liming a highly Al-saturated soil on the top and root growth and soybean nodulation. *Agron. J.*, 67:507-10.

- SARTAIN, J. B. e KAMPRATH, E. J. 1977. Effect of soil Al saturation on nutrient concentration of soybean tops, roots, and nodules. *Agron. J.*, 69:843-5.
- SAWAZAKI, H. E. 1986. Efeito de fonte externa de nitrogênio no transporte de compostos nitrogenados em plantas de soja *Glycine max (L.) Merrill cultivar Santa Rosa*. Tese (Mestrado). Campinas. 124p. Universidade Estadual de Campinas.
- SCHUBERT, K. R. 1981. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*. 1. Comparison of activities with N_2 fixation and composition of xylem exudate during nodule development. *Plant Physiol.*, 68:1115-22
- SCHUBERT, K. R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 97:539-79.
- SCHWEITZER, L. E. e HARPER, J. E. 1980. Effect of light, dark, and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybeans. *Plant Physiol.*, 65:51-6.
- SIEGEL, N. e HAUG, A. 1983. Calmodulin-dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminum toxicity in plants. *Physiol. Plant.*, 59:285-91.
- SILVA, M. A. P. 1981. A translocação de fotoassimilados e a fixação de dinitrogênio em plantas de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. submetidas a diferentes níveis de alumínio. Viçosa. Tese (Mestrado). 39p. Universidade Federal de Viçosa.

- SIMPSON, J. R., PINKERTON, A. e LAZDOVOKIS, J. 1977. Effects of subsoil calcium on the root growth of some lucerne genotypes (*Mendicago sativa* L.). *Aust. J. Agr. Res.*, 29:629-38.
- SLOGER, C., BEZDICEK, D., MILBERG, R. e BOONKERD, N. 1976. In: P. S. Nutman., ed. *Fixation in Plants*. Cambridge University Press, London. 584p.
- SNEDECOR, G. W. 1965. *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*. The Iowa State College Press, Ames, Iowa, U.S.A. 534p.
- STREETER, J. G. 1972. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. I. Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.*, 64:311-4.
- STREETER, J. G. 1979. Allantoin and allantoinic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.*, 63:478-80.
- SUHAYDA, C. G. e HAUG, A. 1986. Organic acid reduce aluminum toxicity in maize root membranes. *Physiol. Plant.*, 68:189-95.
- SUTHIPRADIT, S. e ALVA, A. K. 1986. Aluminum and pH limitations for germination and radicle growth of soybean. *J. Plant Nutr.*, 9(1):67-73.
- THAWORUWONG, N. e VAN DIEST, A. 1974. Influence of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. *Plant Soil*, 41:141-59.

- THOMAS, J. R. e SPRENT, I. J. 1984. The effects of temperature on vegetative and early reproductive growth of cold-tolerant and cold-sensitive line of *Phaseolus vulgaris* L. 1. Nodulation, growth and partitioning of dry matter, carbon and nitrogen. *Ann. Bot.* 53:578-88.
- TOLLEY-HENRY, L. e RAPER Jr., C. D. 1986. Utilization of ammonium as a nitrogen source. Effects of ambient acidity on growth and nitrogen accumulation by soybean. *Plant Physiol.*, 82:54-60.
- VIERSTRA, R. e HAUG, A. 1978. The effect of Al^{+3} on the physical properties of membrane lipids in *Thermoplasma acidophilum*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 84:138-43.
- VOGELS, D. G. e VAN DER DRIFT, C. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.*, 33:143-57.
- WAGATSUMA, T. e YAMASAKU, K. 1985. Relationship between differential aluminum tolerance and plant-induced pH change of medium among barley cultivars. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 31(4):521-35.
- WALSH, K. B. e LAYZELL, D. B. 1986. Carbon and nitrogen assimilation and partitioning in soybeans exposed to low root temperatures. *Plant Physiol.* 80:249-55.
- YEMM, E. M. e COCKING, E. C. 1955. Estimation of amino acids by ninhidrin. *Analyst*, 80:209-13.