

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ANDRÉ LUÍS THOMAS

**MODIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS E
ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE
SOJA (*Glycine max*) COM SISTEMAS RADICULARES
SOB DEFICIÊNCIA DE O₂**

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Biologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

2004

Data da defesa: 11/03/2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador) _____

Profa. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad _____

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama _____

Prof. Dr. José Ronaldo Magalhães _____

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato _____

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo _____

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro _____

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização do curso;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Professor Ladaslav Sodek pela orientação;

Aos colegas do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS que me substituíram durante a realização do doutorado;

À Professora Sandra M. Carmello Guerreiro pelo auxílio no estudo anatômico;

Ao Professor Jorge Vega pelo auxílio na microscopia e fotografia;

Às Professoras Cláudia Haddad, Marlene Schiavinato e Sandra M. Carmello Guerreiro pelas críticas e sugestões à tese;

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UNICAMP pela utilização de suas dependências e equipamentos para realização dos estudos anatômicos;

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP que colaboraram na realização do trabalho;

À minha família pelo incentivo durante todo período do curso.

ÍNDICE

BANCA EXAMINADORA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE	v
ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cultivo em solos de várzea no Rio Grande do Sul	1
1.2. Deficiência de O ₂ no solo e o desenvolvimento de aerênquima em plantas	2
1.3. Fixação simbiótica de N ₂ e alterações metabólicas em plantas com sistemas radiculares sob deficiência de O ₂	5
1.4. Influência da assimilação de nitrato (NO ₃ ⁻) e amônio (NH ₄ ⁺) sobre o desenvolvi- mento de plantas com sistemas radiculares sob deficiência de O ₂	10
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Material vegetal e condições de cultivo	18
3.1.1. Inundação dos sistemas radiculares das plantas de soja com solução nutri- tiva sem N	18
3.1.2. Inundação dos sistemas radiculares das plantas de soja com solução nutri- tiva com diferentes fontes de N	19
3.2. Métodos analíticos	20

3.2.1. Estudo anatômico dos órgãos submersos	20
3.2.2. Determinação do espaço poroso nos nódulos e raiz principal	22
3.2.3. Coleta da seiva do xilema	22
3.2.4. Separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva do xilema	23
3.2.5. Quantificação de ureídeos totais (URE) na seiva do xilema	24
3.2.6. Quantificação dos aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema	26
3.2.7. Dosagem de nitrato (NO_3^-) na solução nutritiva	26
3.2.8. Dosagem de amônio (NH_4^+) na solução nutritiva	27
3.2.9. Dosagem da concentração de O_2 e pH da solução nutritiva	27
3.2.10. Determinação da área foliar e matéria seca das plantas	27
3.2.11. Dosagem do teor de N na parte aérea das plantas	28
3.2.12. Dosagem do teor de clorofila nas folhas	28
3.3. Delineamentos experimentais e análises estatísticas	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Concentrações de O_2 na solução nutritiva dos experimentos	29
4.2. Modificações morfológicas e desenvolvimento de aerênquima em plantas de soja com sistemas radiculares sob deficiência de O_2	30
4.2.1. Na porção caulinar submersa e nas raízes adventícias	30
4.2.2. Na raiz principal e nas raízes laterais	35
4.2.3. Nos nódulos	35
4.2.4. Na planta	37

4.3. Composição de aminoácidos na seiva do xilema e fixação de N ₂ em plantas de soja com sistemas radiculares inundados com solução nutritiva sem N	37
4.3.1. Plantas com sistemas radiculares inundados a partir do estágio V6-7	38
4.3.2. Plantas com sistemas radiculares inundados a partir do florescimento	45
4.4. Composição de aminoácidos na seiva do xilema, fixação simbiótica de N ₂ e parâmetros de desenvolvimento nas plantas de soja com sistemas radiculares inundados com solução nutritiva com diferentes fontes de N	48
4.4.1. Composição de aminoácidos na seiva do xilema e fixação simbiótica de N ₂	49
4.4.2. Parâmetros de desenvolvimento nas plantas de soja	55
5. CONCLUSÕES	66
6. LITERATURA CITADA	67

ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
ALA	alanina
ALT	aminoácidos livres totais
AMP	monofosfato de adenosina
ARG	arginina
ASN	asparagina
ASP	ácido aspártico
ATP	trifosfato de adenosina
GABA	ácido gama-aminobutírico
GLN	glutamina
GLU	ácido glutâmico
GLY	glicina
HIS	histidina
HPLC	cromatografia de alta performance
ILE	isoleucina
LEU	leucina
LYS	lisina
MET	metionina
NAD ⁺	?-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	?-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NH ₄ ⁺	amônio

NH ₄ NO ₃	nitrato de amônio
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NR	redutase de NO ₃ ⁻
OPA	orto-ftaldialdeído
PHE	fenilalanina
PVDF	polivinilidenodifluoreto
R2	plantas no florescimento
SER	serina
THR	treonina
TYR	tirosina
URE	ureídeos (alantoína e ácido alantóico)
V6-7	plantas no estágio vegetativo, com 5-6 folhas trifolioladas desenvolvidas
VAL	valina

**Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max*)
com sistemas radiculares sob deficiência de O₂**

Plantas noduladas de soja foram cultivadas em vasos com vermiculita e nutridas com solução nutritiva sem N até o estágio V6-7, ocasião em que os sistemas radiculares foram inundados durante 21 dias com solução nutritiva sem N e com NO₃⁻, NH₄⁺ e NH₄NO₃ com os objetivos de: 1) caracterizar o desenvolvimento de aerênquima na planta de soja com sistema radicular submetido à deficiência de O₂, 2) verificar a capacidade do aerênquima reverter o processo de deficiência de O₂ no sistema radicular da planta de soja e restabelecer a fixação simbiótica de N₂ e 3) determinar o efeito da fonte de nitrogênio (N₂, NO₃⁻, NH₄⁺ e NH₄NO₃) sobre o desenvolvimento da planta de soja com sistema radicular sob deficiência de O₂. Os resultados demonstram que: 1) a planta de soja com sistema radicular inundado desenvolve aerênquima a partir do periciclo no segmento de caule submerso, na raiz principal e nas raízes laterais; nas raízes adventícias, que surgem no caule submerso, ocorrem aerênquima esquizógeno, lisígeno e a partir do periciclo; e nos nódulos a origem do aerênquima é o felogênio. 2) na planta de soja com sistema radicular inundado as interconexões de aerênquima nos órgãos submersos da planta fazem com que após duas semanas de inundação a planta reverta o processo de deficiência de O₂ no sistema radicular e recupere a fixação simbiótica de N₂. Entretanto, a planta tem seu desenvolvimento reduzido e apresenta-se clorótica, e 3) o suprimento de NO₃⁻ durante a inundação do sistema radicular da planta de soja faz com ela apresente desenvolvimento similar à planta com sistema radicular não inundado. Porém, a presença de NH₄⁺ durante a inundação reduz drasticamente o desenvolvimento da planta, mas a presença de NO₃⁻ na proporção de 1:1 na solução nutritiva praticamente elimina o efeito tóxico do NH₄⁺ à planta de soja com sistema radicular inundado.

**Morphological modifications and nitrogen assimilation in soybean plants (*Glycine max*)
with root systems under O₂ deficiency**

Nodulated soybean plants were cultivated in pots with vermiculite and fed with N-free nutrient solution until the stage V6-7, when the root systems were flooded for 21 days with N-free nutrient solution or nutrient solution containing NO₃⁻, NH₄⁺ and NH₄NO₃, with the following objectives: 1) characterize aerenchyma development in the soybean plant with the root system submitted to O₂ deficiency ; 2) verify the capacity of the aerenchyma to revert the process of O₂ deficiency in the root system of the soybean plant and to reestablish symbiotic N₂ fixation and 3) determine the effect of the source of nitrogen (N₂, NO₃⁻, NH₄⁺ and NH₄NO₃) on the development of the soybean plant with the root system under O₂ deficiency. The results demonstrate that: 1) the soybean plant with a flooded root system develops aerenchyma from the pericycle in the submerged stem segment, in the main root and in the lateral roots; in the adventitious roots, that appear on the submerged stem, schizogenous and lysigenous aerenchyma forms from the pericycle; while in the nodules the origin of the aerenchyma is the phellogen. 2) in the soybean plant with the root system flooded the aerenchyma becomes interconnected within the submerged organs of the plant such that after two weeks of flooding the plant reverts the process of O₂ deficiency in the root system and recovers symbiotic N₂ fixation. However, the development of the plant is reduced and becomes chlorotic , and 3) the supply of NO₃⁻ during the flooding of the root system of the soybean plant results in growth and development similar to that of the control plants whose root system was not flooded. However, the presence of NH₄⁺ during flooding reduces the development of the plant drastically, but the presence of NO₃⁻ in the nutrient solution in the proportion of 1:1 practically eliminates the toxic effect of NH₄⁺ to the soybean plant with a flooded root system.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cultivo em solos de várzea no Rio Grande do Sul

Os solos de várzea compreendem aqueles solos que apresentam uma característica comum, que é a formação em condições de hidromorfismo. A principal característica desses solos é a deficiente drenagem natural, normalmente motivada pelo relevo predominantemente plano, associado a um perfil cuja camada superficial é pouco profunda e a sub-superficial é praticamente impermeável (Pauletto *et al.*, 1998).

No RS os solos de várzea ocupam uma área de aproximadamente 5,5 milhões de hectares (Pauletto *et al.*, 1998) e, em torno de 3 milhões de hectares vêm sendo utilizados para o cultivo de arroz irrigado, dos quais anualmente utilizam-se aproximadamente 1 milhão de hectares. Quase todo o restante da área não cultivada (pousio) vem sendo sub-utilizada com pecuária de corte extensiva. Neste contexto, a soja surge como uma alternativa de cultivo às áreas de pousio, uma vez que utiliza praticamente a mesma infra-estrutura da lavoura de arroz (IRGA, 2001).

A rotação de culturas em solos de várzea é uma prática recomendada para aumentar o rendimento de grãos de arroz, quer pelo efeito direto de quebrar o ciclo de insetos pragas, moléstias e de plantas daninhas que prejudicam o desenvolvimento do arroz, ou pelo efeito indireto na melhoria das condições químicas e físicas do solo (IRGA, 2001). Entretanto, para que esse efeito ocorra, é necessário estudar espécies e/ou cultivares que se adaptem às condições de excesso de água no solo e que proporcionem retorno econômico ao produtor. Nesse contexto, enquadra-se a cultura da soja, que, embora introduzida e melhorada para áreas bem drenadas no Brasil, é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China

(Evans, 1996) e apresenta variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (VanToai *et al.*, 1994, Thomas *et al.*, 2000; Pires *et al.*, 2002)

1.2. Deficiência de O₂ no solo e o desenvolvimento de aerênquima em plantas

Em um solo com drenagem deficiente, quando ocorre inundação, os espaços porosos são preenchidos pela água. Para as plantas, o principal efeito imposto pela inundação é o impedimento das trocas gasosas entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo, visto que a resistência de difusão de muitos gases é aproximadamente 1000 vezes maior na água que no ar (Armstrong *et al.*, 1994). No caso do O₂, a velocidade de difusão na água é 100 vezes menor que no ar (Thomson & Greenway, 1991) e sua concentração no ar é 30 vezes maior que dissolvido na água, fazendo com que menos de 1 mm e não mais do que poucos centímetros da superfície de um solo inundado apresentem condições aeróbicas (Armstrong *et al.*, 1994). Entretanto, após 24 h de inundação, com temperatura ambiente superior a 20 °C, pode haver esgotamento total do O₂ do solo devido ao consumo por microrganismos, fauna e raízes (Armstrong *et al.*, 1994; Marschner, 1995; Drew *et al.*, 2000; Liesack *et al.*, 2000), ocasionando o acúmulo de gás carbônico, metano, etileno e gás sulfídrico (Costa, 1996; Liesack *et al.*, 2000).

A concentração do O₂ dissolvido na água a 20 °C, em equilíbrio com o ar é 277 μ M, só que se estima que o Km para as enzimas citocromo oxidase e alternativa oxidase presentes na mitocôndria isolada de raízes de soja é 0,14 e 1,7 μ M, respectivamente, enfatizando que ao nível da mitocôndria as exigências de O₂ são muito baixas. Esta grande diferença na concentração de O₂ é explicada pela alta resistência de difusão radial do O₂ nas células das raízes (Drew, 1997).

Há hipoxia quando a pressão parcial de O₂ limita a produção de ATP pela mitocôndria (Drew, 1997), sendo o metabolismo hipóxico caracterizado pela atividade simultânea da respiração limitada (metabolismo aeróbico) e algum grau de fermentação (metabolismo anaeróbico). Sob condições hipóxicas, o metabolismo de um órgão vegetal pode ser heterogêneo, visto que as camadas externas recebem mais O₂ que as camadas internas (Ricard *et al.*, 1994). A anoxia ocorre quando a produção de ATP pela fosforilação oxidativa é desprezível em relação ao gerado pela glicólise e fermentação (Drew, 1997).

O estresse ocasionado pela baixa concentração de O₂ no solo inundado faz com que plantas tolerantes ao excesso de umidade desenvolvam aerênquima, podendo ocorrer nas raízes, nódulos, rizomas, caule e folhas submersas (Pankhurst & Sprent, 1975; Kawase & Whitmoyer, 1980; Armstrong *et al.*, 1994; Loureiro *et al.*, 1995; Drew, 1997; Jackson & Armstrong, 1999; Drew *et al.*, 2000; Schussler & Longstreth, 2000; Gibberd *et al.*, 2001).

O aerênquima tem como principal característica a presença de grandes e numerosos espaços intercelulares ou lacunas, onde o ar se acumula. A formação de aerênquima à partir de células do parênquima fundamental pode se dar por separação das células (esquizógeno) ou por lise destas (lisígeno). O aerênquima pode reduzir substancialmente a resistência interna ao transporte de O₂, N₂ e vários metabólitos gasosos como CO₂ e etileno, especialmente entre a parte aérea e as raízes. O transporte de O₂ pelo aerênquima diminui o risco de asfixia da planta, quando ela está com o sistema radicular inundado ou completamente submersa e, ainda, promove a desintoxicação da rizosfera de substâncias formadas em solos reduzidos (como óxidos ferrosos e manganosos) devido a perda de O₂ pelas raízes (Jackson & Armstrong, 1999, Sousa *et al.*, 2000). O aerênquima reduz a demanda de O₂ por unidade de volume de tecido no qual ocorre, quando comparado com o parênquima aerífero, mas poroso (Armstrong *et al.*, 1994; Jackson & Armstrong, 1999).

O aerênquima pode ter origem meristemática ou não. A origem meristemática ocorre a partir de sucessivas divisões, induzidas pela hipoxia, de células meristemáticas originando um tecido parenquimático esponjoso (Justin & Armstrong, 1987). O aerênquima não meristemático pode ser formado por padrões específicos de separação e expansão diferencial entre células adultas (aerênquima esquizógeno) ou pela morte e dissolução de células adultas específicas (aerênquima lisígeno). Entretanto, os dois tipos podem ocorrer na mesma planta e o aerênquima esquizógeno pode preceder a ocorrência do aerênquima lisígeno no mesmo órgão (Justin & Armstrong, 1987; Armstrong *et al.*, 1994; Schussler & Longstreth, 1996; Jackson & Armstrong, 1999; Drew *et al.*, 2000).

Os mecanismos que controlam o desenvolvimento do aerênquima de origem meristemática e do aerênquima esquizógeno são desconhecidos (Justin & Armstrong, 1987; Armstrong *et al.*, 1994; Schussler & Longstreth, 1996; Drew *et al.*, 2000). O desenvolvimento do aerênquima lisígeno é induzido pela hipoxia que estimula a síntese de etileno, o qual ativa uma rota metabólica envolvendo fosfoinosítídeos e Ca^{+2} , onde também estão envolvidas enzimas como a celulase, proteases, lipases, DNAases e muitas outras (Drew *et al.*, 2000; Jones, 2001; Peng *et al.*, 2001). A fragmentação e condensação nuclear são as primeiras modificações observadas em células em lise. Segue-se a quebra do tonoplasto e outras organelas, além da ruptura da membrana plasmática. Depois da perda do citoplasma, as células danificadas formam o aerênquima lisígeno (Schussler & Longstreth, 2000).

A síntese de etileno pelos tecidos é fortemente promovida pela hipoxia, mas bloqueada pela anoxia devido ao requerimento de O_2 livre para a conversão de ACC (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico) para etileno, pela ACC oxidase (Armstrong *et al.*, 1994; Dey & Harbone, 1997; Drew, 1997; Jackson & Armstrong, 1999; Drew *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001).

A soja é uma espécie originária de área alagadiças do norte da China (Evans, 1996), apresentando variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (VanToai *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2000; Pires *et al.*, 2002), entretanto existem poucas informações morfológicas e anatômicas para aclimação da planta à inundação (Bacanamwo & Purcell, 1999a). Com a inundação, o segmento submerso do caule da planta de soja apresenta hipertrofia e formação de um tecido esponjoso na base do caule, com rompimento da epiderme (Pires *et al.*, 2002). Nesse segmento, ocorre o desenvolvimento de raízes adventícias que apresentam aerênquima lisígeno. Nas raízes laterais há o desenvolvimento de aerênquima no córtex, também ocorre o rompimento da epiderme (Bacanamwo & Purcell, 1999a; Pires *et al.*, 2002). Nos nódulos submetidos à baixa pressão parcial de O₂ ou inundação, por períodos prolongados, ocorre a hipertrofia de lenticelas com formação de aerênquima (Pankhurst & Sprent, 1975; Dakora & Atkins, 1989; Parson & Day, 1990).

1.3. Fixação simbiótica de N₂ e alterações metabólicas em plantas com sistemas radiculares sob deficiência de O₂

A fixação de N₂ pelos rizóbios, em nódulos de leguminosas, é um processo que demanda alta quantidade de energia, requerendo ao menos 4 ATP/2e⁻ transferidos ao N₂. Essa energia é gerada mais eficientemente pela fosforilação oxidativa nos sítios de respiração do rizóbio. Paradoxalmente, entretanto, o oxigênio é um importante inibidor da atividade da nitrogenase (Dakora & Atkins, 1989), embora a enzima também necessite de baixas concentrações de O₂ comoceptor final de elétrons (Guash *et al.*, 2001). Isso fez com que as leguminosas desenvolvessem uma barreira à difusão de O₂ no nódulo, a fim de manter um ambiente microaeróbico (Serraj *et al.*, 1995; Minchin, 1997; Guash *et al.*, 2001).

As leguminosas são geralmente sensíveis às inundações e o alagamento do solo pode limitar seu crescimento, pois os nódulos precisam de O₂ para manter a respiração aeróbica necessária para suprir a grande quantidade de ATP indispensável à atividade da nitrogenase. Apesar de terem adaptações como a proteína condutora de O₂ (leghemoglobina) para otimizar o suprimento de O₂, a maioria das leguminosas terrestres não é suficientemente capaz de aumentar o fornecimento de O₂ para dentro de seus nódulos enquanto inundadas (Loureiro *et al.*, 1988). Entretanto, a fixação simbiótica de N₂ na soja pode se aclimatar à inundação e a recuperação da fixação coincide com a formação de aerênquima e raízes adventícias (Bacanamwo & Purcell, 1999a).

Em plantas de soja com fixação simbiótica de N₂ efetiva, os ureídeos (ácido alantóico e alantoína) constituem aproximadamente 80% do N transportado na seiva do xilema, sendo considerados produtos específicos da fixação (McClure & Israel, 1979, McClure *et al.*, 1980). Já, na composição (mol%) de aminoácidos na seiva do xilema predominam a ASN (? 50%) e a GLN (? 20%) (Puiatti & Sodek, 1999; Amarante, 2002). A ASN é formada via asparagina sintetase, a partir de ASP e GLN, com hidrólise simultânea de ATP em AMP. Neste caso, a GLN tem o papel de doador de N para formar o grupo amida (Lea & Fowden, 1975; Shi *et al.*, 1997; Amarante, 2002).

Os teores de URE e GLN na seiva do xilema são considerados indicadores da eficiência da fixação simbiótica de N₂ em soja e quando ocorre inundação, independentemente do período ser de 1h, 1 dia ou 4 dias, há uma redução de 93% no teor de URE e 91% no de GLN na seiva do xilema, quando comparados com os teores em plantas não inundadas (Amarante, 2002). A hipoxia inibe o acúmulo de biomassa e a fixação de N₂, entretanto a inibição da fixação ocorre mais cedo e é mais pronunciada que o acúmulo de biomassa (Bacanamwo & Purcell, 1999b).

No sistema radicular inundado, durante a diminuição da disponibilidade de O₂, a respiração aeróbica é substituída parcialmente pela glicólise e fermentação. Neste caso, a respiração mitocondrial é limitada pela falta de O₂ como acceptor final de elétrons. A fermentação corresponde a um período excepcional e transitório no metabolismo das raízes, onde a produção de ATP cai de 36 para 2 moles por mol de glicose metabolizada (Dennis *et al.*, 1993; Morard & Silvestre, 1996; Sousa & Sodek, 2002).

Na respiração anaeróbica, pela falta de O₂ como acceptor final de elétrons, ocorre o acúmulo de intermediários no ciclo de Krebs, diminuição da disponibilidade de NADPH e acúmulo de piruvato. A partir do piruvato são produzidos os principais produtos da fermentação em tecidos vegetais: etanol, lactato e alanina. Embora a atividade conjunta da glicólise e fermentação permitam apenas a síntese limitada de ATP, pela fosforilação ao nível de substrato, regenera-se NAD⁺ e remove-se o excesso de prótons (Dennis *et al.*, 1992; Armstrong *et al.*, 1994, Ricard *et al.*, 1994; Morard & Silvestre, 1996, Drew, 1997; Sousa & Sodek, 2002). A injúria e morte das raízes tem sido atribuída ao acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos durante a fermentação (principalmente etanol), diminuição no metabolismo energético e a falta de substratos para a respiração (Drew, 1997).

A regulação do pH citosólico é considerada o fator determinante da sobrevivência do tecido vegetal à deficiência de O₂. A acidificação do citosol tem sido atribuída ao ácido láctico. Entretanto, estudos cinéticos envolvendo mudanças na concentração de lactato, pH citosólico e nucleotídeos, depois da transferência para anoxia e com posterior reoxigenação, demonstram que o pH citosólico muda muito mais rapidamente que a concentração de lactato e a mudança está relacionada com o decréscimo de ATP. Isto sugere que o decréscimo de ATP é a principal causa da acidificação do citosol, que pode ocorrer pela inibição da bomba de

prótons, devido à baixa concentração de ATP e pela liberação de H^+ no citosol via hidrólise de ATP (Ricard *et al.*, 1994).

Em raízes de soja, cv. IAC-17, não noduladas, sob hipoxia, o destino principal do piruvato é a conversão a ALA, com baixa síntese de etanol e lactato (Sousa, 2001).. Porém não pode ser descartada a hipótese de que o etanol possa ser difundido ao meio externo. Por outro lado, essa pode ser uma característica da cultivar estudada, tendo em vista que certas cultivares de soja, sob hipoxia, não aumentam a atividade da enzima álcool desidrogenase, que converte acetaldeído em etanol (Kennedy *et al.*, 1992).

Com a deficiência de O_2 no sistema radicular ocorre uma modificação na composição de aminoácidos na seiva do xilema e da raiz. Os níveis de GLU, ASP e suas amidas diminuem e ocorre o acúmulo de ALA e GABA. A ALA e o GABA são sintetizados a partir do GLU que deve ser produzido constantemente em condições de hipoxia. O GLU pode derivar de: 1) processos proteolíticos, 2) reações de transaminação de outros aminoácidos, 3) reassimilação de NH_4^+ através do ciclo glutamina sintetase/glutamato sintase e 4) redução de nitrato (Reggiani *et al.*, 1988; Reggiani, 1999; Reggiani *et al.*, 2000).

A síntese de ALA pode ter como fonte de N a transaminação, indiretamente com ASP, via aspartato aminotransferase e, diretamente com GLU, através da alanina aminotransferase (Sousa & Sodek, 2002), tendo em vista que a alanina aminotransferase não aceita ASP como doador do grupo NH_2 (Sousa, 2001). Porém, pouco se sabe sobre a importância da formação de ALA sob hipoxia, visto que sua síntese a partir do piruvato não regenera NAD^+ (Sousa & Sodek, 2002), embora contribua à regulação do pH celular (Reggiani *et al.*, 1988).

A síntese do GABA ocorre pela α -descarboxilação do GLU, reação catalisada pela glutamato descarboxilase. A função do GABA, em condições de hipoxia, é regular o pH celular (Reggiani, 1999; Shelp *et al.*, 1999; Sousa & Sodek, 2002).

Em plantas de soja inoculadas, com sistema radicular sob hipoxia, ocorre na seiva do xilema o aumento na proporção de ALA e em menor extensão de GABA e SER. O aumento de ALA no xilema é resultado de alterações metabólicas, principalmente nas raízes e em menor proporção nos nódulos (Puiatti & Sodek, 1999; Amarante, 2002). Aparentemente, o ASP é a fonte de N para formação da ALA (Puiatti & Sodek, 1999).

O teor de ASP, em plantas de soja fixando N₂, diminui com a inundação (Amarante, 2002). Entretanto em hidroponia, com aeração contínua, ocorre aumento no teor de ASP e redução no teor de ASN (Puiatti & Sodek, 1999). Sendo que o transporte preferencial de ASP, às custas de ASN, ocorre em plantas de soja cuja assimilação de N é deficiente (Lima, 2002).

Com a inundação do sistema radicular de plantas de soja fixando N₂, diminui a quantidade de aminoácidos livres totais na seiva do xilema (Puiatti & Sodek, 1999).

As reservas de amido nas raízes são consideradas de fácil mobilização durante a inundação do solo e podem rapidamente prover os açúcares para o metabolismo anaeróbico (Perata *et al.*, 1992). A quantidade de amido nas raízes diminui marcadamente nos primeiros dias de inundação, aumentando os teores de glicose e frutose (Liao & Lin, 2001). Entretanto, o transporte de fotoassimilados às raízes diminui devido à redução da demanda de carboidratos destas ou pelo colapso do sistema de transporte de fotoassimilados, diminuindo a taxa fotossintética das folhas, que mesmo assim, acumulam amido (Hsu *et al.*, 1999).

A falta de O₂ no sistema radicular da planta de soja, além de inibir a fixação simbiótica, também inibe a absorção de N e outros minerais, inibindo o crescimento das raízes e a nodulação (Sallam & Scott, 1987). Então, o transporte de N e/ou minerais para a parte aérea pode ser inadequado, resultando em plantas raquíticas e cloróticas (Nathanson *et al.*, 1984). Além disso, ocorre a redução na taxa fotossintética das folhas, atribuída parcialmente à diminuição da condutância estomática (Oosterhuis *et al.*, 1990). A diminuição das taxas de

assimilação líquida e expansão foliar provocam a diminuição da taxa de crescimento da cultura de soja e, conseqüentemente, proporcionam menor rendimento de grãos (Linkemer *et al.*, 1998).

1.4. Influência da assimilação de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) sobre o desenvolvimento de plantas com sistemas radiculares sob deficiência de O_2

Em muitos solos aeróbicos, o NO_3^- e o NH_4^+ são as fontes predominantes de N disponíveis às plantas. Entretanto, as concentrações médias de NH_4^+ nos solos aeróbicos são 10-1000 vezes menores que as de NO_3^- e raramente excedem $50 \mu\text{M}$ (Marschner, 1995). A diferença na concentração do solo não necessariamente se reflete na razão de absorção de cada forma (Wirén *et al.*, 2000), visto que muitas espécies absorvem preferencialmente NH_4^+ , provavelmente em função de sua assimilação requerer menos energia que a do NO_3^- . Normalmente, a maioria das espécies apresenta melhor desenvolvimento quando supridas com NH_4^+ e NO_3^- . Entretanto, poucas espécies apresentam desenvolvimento satisfatório quando o NH_4^+ é a única ou a fonte predominante de N e muitas desenvolvem sintomas de toxidez quando crescem em níveis de NH_4^+ moderados para altos (Howitt & Udvardi, 2000; Wirén *et al.*, 2000, Britto *et al.*, 2001).

A absorção de NH_4^+ pelas raízes das plantas ocorre de forma passiva, por difusão através de canais, quando as concentrações externas de NH_4^+ são altas e de forma ativa, através de transportadores, quando as concentrações externas são baixas; já a absorção de NO_3^- ocorre somente de forma ativa, independentemente da concentração externa (Williams & Miller, 2001).

Muitas hipóteses têm sido formuladas para explicar a toxidez do NH_4^+ às plantas, mas nenhuma delas é considerada satisfatória (Wirén *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001):

a) A absorção de NH_4^+ pelas raízes está associada ao mecanismo de efluxo de H^+ à rizosfera e a liberação de H^+ também está associada com a incorporação de NH_4^+ em proteínas, sugerindo a acidificação da rizosfera e/ou distúrbio do pH intracelular, o que poderia explicar a toxidez do NH_4^+ . Entretanto, em muitos casos a toxidez é observada em meio com pH tamponado e espécies sensíveis à toxidez não demonstram distúrbio no pH citosólico induzido pelo NH_4^+ (Wirén *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001).

b) A limitação de carboidratos nas raízes também contribuiria para a toxidez, baseado no fato de que o NH_4^+ por si só não é translocado à parte aérea em muitas plantas e então, grande quantidade de esqueletos de carbono para assimilação de N precisariam ser providos às raízes, ocasionando a falta de esqueletos de carbono nas mesmas. Porém, em alguns casos, o suprimento externo de α -cetoglutarato, uma fonte chave de carbono para assimilação de N, alivia os sintomas de toxidez, mas em outros casos ele aumenta o metabolismo do NH_4^+ , sugerindo que outros fatores podem limitar a assimilação de NH_4^+ (Britto *et al.*, 2001).

c) A hipótese de que a toxidez de NH_4^+ promove o desacoplamento da fotofosforilação nos cloroplastos, muito citada na literatura, é incorreta, pois concentrações muito altas de NH_4^+ não afetam esse processo em cloroplastos intactos (Britto *et al.*, 2001).

d) A diminuição de cátions essenciais como K^+ , Mg^{+2} e Ca^{+2} no tecido de plantas submetidas a períodos prolongados de nutrição com NH_4^+ pode contribuir para a toxidez devido ao desbalanço nutricional (Britto *et al.*, 2001).

e) Mais recentemente foi proposta uma ciclagem fútil de NH_4^+ , via transmembrana das células da raiz, para explicar a hipótese de toxidez celular por NH_4^+ às plantas (Britto *et al.*, 2001). Em espécies sensíveis a toxidez de NH_4^+ , submetidas a altas concentrações externas de NH_4^+ , ocorre uma hiperpolarização negativa do potencial da membrana plasmática das células das raízes, ocasionando uma disfunção na regulação da entrada de NH_4^+ , que leva ao acúmulo

excessivo de NH_4^+ no citosol. Para minimizar o efeito do excesso de NH_4^+ , ocorre um efluxo ativo (com gasto de ATP) de mais de 80% do NH_4^+ que entrou nas células através da membrana plasmática das células das raízes. Este ciclo fútil aumenta em 40% a respiração das raízes, é independente da atividade da glutamina sintetase e de outros processos relacionados ao metabolismo do N e é acompanhado por uma diminuição no desenvolvimento das plantas (Britto *et al.*, 2001). Entretanto, o alto custo energético do efluxo de NH_4^+ através da membrana plasmática está superestimado e o consumo da energia requerida para ativar o efluxo pode aumentar os sintomas de toxidez, ou seja, diminuir o desenvolvimento da planta (Kronzucker *et al.*, 2001).

Por outro lado, o crescimento limitado de plantas, não fixadoras de N_2 , que recebem exclusivamente NH_4^+ como fonte de N pode estar relacionado à ausência de NO_3^- . O NO_3^- não é somente um importante osmoregulador, mas também um íon essencial para translocação de cátions no xilema e um sinalizador que induz a expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de N, metabolismo de ácidos orgânicos e síntese de amido (Wirén *et al.*, 2000; Forde, 2002).

Quando os sistemas radiculares de muitas espécies de plantas são expostos ao suprimento de NO_3^- localizado, eles respondem com aumento da taxa de proliferação de raízes laterais, especialmente na zona rica em NO_3^- . O sinal para aumentar a atividade meristemática das raízes laterais aparenta vir do íon NO_3^- e não de um metabólito proveniente da assimilação de NO_3^- (Forde, 2002).

As mudanças na fonte de N podem modificar o balanço hormonal na seiva do xilema, afetando o crescimento da parte aérea. Ao modificar a nutrição das plantas supridas com NH_4NO_3 para NH_4^+ , as folhas novas formadas são menores e com menor número de células. Essas mudanças coincidem com um forte declínio na concentração de citocinina na seiva do

xilema (Wirén *et al.*, 2000; Forde, 2002). A nutrição exclusiva com NH_4^+ aumenta a concentração de ácido abscísico na seiva do xilema, hormônio esse que contribui potencialmente ao crescimento fenotípico raquítico (Wirén *et al.*, 2000).

Em soja não nodulada, o aminoácido ASN predomina como forma de transporte de N no xilema (McClure & Israel, 1979). Para a biossíntese de ASN é necessário ASP, sintetizado via ação da aspartato aminotransferase, que produz ASP a partir de GLU e oxalacetato. O ASP é em seguida aminado em ASN, via asparagina sintetase, em reação de transaminação usando o N na forma de amida da GLN. Portanto, a ASN constitui-se num dos produtos primários da assimilação de NO_3^- , pois a asparagina sintetase atua em seqüência ao sistema glutamina sintetase/glutamato sintase (Lea & Ireland, 1999).

Em solos inundados ocorre o acúmulo de NH_4^+ , pois a ausência de O_2 interrompe a mineralização do N na forma amoniacal. O NO_3^- é o primeiro composto oxidado do solo a ser utilizado pelos microrganismos anaeróbicos (Kronzucker, *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2000). Entretanto, em espécies tolerantes à hipoxia, que desenvolvem aerênquima interligando a parte aérea com as raízes, há uma pequena interface na rizosfera oxidada onde predomina NO_3^- , mesmo em solos inundados (Liesack *et al.*, 2000).

A redução de NO_3^- a NH_4^+ consome quatro NAD(P)H (8 elétrons) e oito prótons por ciclo de reação, que é muito mais eficiente na regeneração de NAD^+ e no consumo de prótons que outras reações de fermentação conhecidas, incluindo a produção de etanol. Se suficientemente ativo, o metabolismo anaeróbico do NO_3^- pode facilitar a produção de energia e aliviar a acidez citoplasmática (Salsac *et al.*, 1987; Fan *et al.*, 1997). Essa hipótese só é importante para espécies onde a redução de NO_3^- predomina nas raízes (ex.: milho e cevada) e não em soja onde a maior parte do NO_3^- é reduzido na parte aérea (Touraine *et al.*, 1988; Bacanamwo & Purcell, 1999b). Porém os aproximadamente 30% do NO_3^- reduzidos nas

raízes da soja contribuem significativamente ao metabolismo da planta (Crafts-Brandner & Harper, 1982). Entretanto, a redução de NO_3^- sob deficiência de O_2 tem pouco suporte como hipótese de caminho alternativo à demanda de elétrons, exceto em arroz onde ocorre a diminuição da produção de etanol (Sousa & Sodek, 2002).

A redutase de NO_3^- (NR) tem maior atividade em tecidos vegetais sob anoxia do que em bem aerados, mas a razão para isso é desconhecida. A ativação da NR pela condição de anoxia é mediada pela defosforilação da enzima (Glaab & Kaiser, 1993; Botrel *et al.*, 1996) e provavelmente sinalizada pela acidificação citosólica (Botrel *et al.*, 1996). Juntamente com a ativação da NR, a anoxia leva a um grande acúmulo de nitrito e à sua excreção pelas raízes (Lee, 1979). Surpreendentemente, em tecidos foliares sob anoxia, a redução de NO_3^- e o acúmulo de nitrito são muito menores do que se poderia esperar para a alta atividade da NR determinada no extrato. Isto indica que nas raízes, assim como nas folhas, as taxas de redução de NO_3^- não são somente ditadas pelo estado de ativação da NR, mas também por outros fatores como a disponibilidade de substrato. Se a grande produção de nitrito por tecidos anóxicos tem um propósito fisiológico ainda não se sabe. A produção de ácido nítrico fraco e sua excreção na forma não dissociada pode ajudar a estabilizar o pH citosólico. Entretanto estudos preliminares não evidenciam isso. Alternativamente, a redução de NO_3^- pode diminuir a taxa de fermentação etanólica ou láctica. O ácido láctico, especialmente, pode ser tóxico visto que ele não é tão facilmente excretado como o etanol e o ácido nítrico (Kaiser & Huber, 2001). Entretanto, a diminuição da taxa de fermentação etanólica devida à redução de NO_3^- , por enquanto, só está comprovada em arroz (Sousa & Sodek, 2002).

A redutase de NO_3^- , além de catalisar a transferência de dois elétrons do NAD(P)H para NO_3^- para produzir nitrito, pode canalizar a transferência de um elétron do NAD(P)H para o nitrito para produzir óxido nítrico (NO). Este composto pode estar envolvido na sinalização

molecular do controle do crescimento, diferenciação e senescência em plantas, além das respostas à interação planta-patógeno (Kaiser *et al.*, 2002). Durante a hipoxia, o etileno está envolvido na indução “tardia” (24-28 h após o início da hipoxia) da álcool desidrogenase, mas algum sinalizador é o precursor da indução (Peng *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que óxido nítrico pode agir como um sinalizador em condições de anoxia (Magalhães *et al.*, 2002).

Em raízes de plantas de soja, não noduladas, cultivadas em hipoxia com suprimento de NO_3^- , quando comparadas com plantas em normoxia, há um aumento nos teores de aminoácidos totais, sacarose, açúcares solúveis totais, ALA, lactato e etanol, e redução no teor de NO_3^- . No exsudado do xilema aumentam os teores dos aminoácidos ALA, GABA e SER e de aminoácidos totais, enquanto os teores de NO_3^- e ASN diminuem. No exsudado do floema diminuem os teores de açúcares solúveis totais, sacarose e aminoácidos livres totais (Sousa, 2001).

O estresse pela inundação provoca, em plantas de soja, o aumento no desenvolvimento de raízes adventícias, aumento na razão raízes/parte aérea e decréscimo na área foliar. Sob inundação, o suprimento de NO_3^- diminui em 55% o desenvolvimento de aerênquima na base do caule em relação a plantas de soja fixando N_2 (Bacanamwo & Purcell, 1999a).

Plantas de soja, com sistema radicular sob hipoxia, quando dependentes da fixação de N_2 , têm maior decréscimo no N total que na biomassa, já quando dependentes da absorção de NO_3^- são menos afetadas pela hipoxia que plantas de soja dependentes da fixação de N_2 . A biomassa e o N total de plantas em hipoxia, supridas com NO_3^- , diminuem somente 12% e 21%, respectivamente, quando comparadas com plantas em normoxia fixando N_2 . Sob hipoxia, a atividade da nitrogenase diminui 89%, enquanto a absorção de NO_3^- diminui somente 9%. Portanto, o suprimento de NO_3^- para plantas de soja sob hipoxia minimiza os

efeitos do estresse provocado pela falta de O₂ no sistema radicular (Bacanawo & Purcell, 1999b).

Em condições anaeróbicas há uma síntese preferencial de ALA sobre outros aminoácidos durante a assimilação de NH₄⁺. Esta estratégia permite à célula manter o fluxo de carbono para síntese de alanina com produção líquida de ATP e NADH, no balanço da glicólise, exatamente para suprir a demanda de assimilação de NH₄⁺. Como resultado, a síntese de ALA permite manter a assimilação de NH₄⁺ em anaerobiose, enquanto mantém os balanços de energia e redox. Nessas condições, as células mantêm alguma atividade oxidativa no ciclo de Krebs para suprir 2-oxoglutarato para produção de GLU (Vanlerberghe & Turpin, 1990; Vanlerberghe *et al.*, 1991).

Em coleótilos de arroz em anaerobiose o acúmulo de etanol, GABA e, especialmente, ALA é maior com suprimento de NH₄⁺ do que NO₃⁻. Os níveis de GLN e ASN são substancialmente maiores com NH₄⁺, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas (Fan *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

Caracterizar o desenvolvimento de aerênquima na planta de soja com sistema radicular submetido à deficiência de O_2 .

Verificar a capacidade do aerênquima reverter o processo de deficiência de O_2 no sistema radicular da planta de soja e restabelecer a fixação simbiótica de N_2 .

Determinar o efeito da fonte de nitrogênio (N_2 , NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3) sobre o desenvolvimento da planta de soja com sistema radicular sob deficiência de O_2 .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de soja (*Glycine max*), cv. FT-Abyara, inoculadas na semente com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe SEMIA 5019, foram cultivadas de setembro a março em casa-de-vegetação sob condições naturais de temperatura, onde a média das temperaturas máximas do ar foi de 38 °C e das mínimas de 19 °C. O fotoperíodo foi de 18 h, da semente até as plantas apresentarem duas folhas trifolioladas desenvolvidas (Costa & Marchezan, 1982), a fim de evitar o florescimento precoce, com posterior cultivo em fotoperíodo natural. A partir desse estágio de desenvolvimento as plantas foram tutoradas.

A cv. FT-Abyara foi selecionada em ensaios preliminares por apresentar melhor adaptação à inundação do sistema radicular e às condições de cultivo entre 8 genótipos testados (FT-Abyara, FT-Saray, BR-4, V1, V4, V5, V9 e V11).

3.1.1. Inundação dos sistemas radiculares das plantas de soja com solução nutritiva sem N

Dois plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 2 L, tendo vermiculita como substrato e nutridas duas vezes por semana com 200 mL de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) sem N até o estágio V6-7 (plantas no estágio vegetativo com 5 ou 6 folhas trifolioladas desenvolvidas, de acordo com Costa & Marchezan, 1982) ou até R2 (plantas no florescimento, com 10 a 12 folhas trifolioladas desenvolvidas). Nesses estágios, os vasos com plantas foram colocados dentro de vasos de 3 L não furados e inundou-se os sistemas radiculares das plantas com solução nutritiva sem N a 1/3 de sua concentração, a fim de evitar danos ao sistema radicular. Manteve-se uma lâmina de solução nutritiva de 2-3 cm acima do

nível da vermiculita, com complementação diária da solução, proporcionando um volume de 1,8 L por vaso inundado.

A inundação dos sistemas radiculares das plantas a partir do estágio V6-7 durou 21 dias, com avaliações em dias alternados. Para as plantas em R2 a inundação foi de 10 dias, com avaliações diárias durante 7 dias e no 10º dia.

Testemunhas sem inundação também foram cultivadas, sendo nutridas duas vezes por semana com 200 mL/vaso da solução nutritiva sem N até o estágio V6-7 ou até R2, a partir daí aumentou-se a frequência para três vezes por semana, a fim de fornecer uma nutrição mais próxima das plantas com sistemas radiculares inundados, pois essas tinham permanentemente disponível 1,8 L de solução nutritiva 1/3 (600 mL de solução não diluída).

Irrigações, quando necessárias, foram feitas com água de torneira. Durante o cultivo das plantas sem inundação dos sistemas radiculares não foram utilizados pratos sob os vasos para evitar o excesso de umidade.

Foram utilizadas três repetições, cada uma composta por duas plantas/vaso, por estágio e data de avaliação.

3.1.2. Inundação dos sistemas radiculares das plantas de soja com solução nutritiva com diferentes fontes de N

Plantas de soja foram cultivadas até o estágio V6-7, ocasião na qual tiveram os sistemas radiculares inundados com solução nutritiva sem N a 1/3 de sua concentração e com adição de 5 mM de N na forma de NO_3^- , NH_4^+ ou NH_4NO_3 . A dose de 5 mM foi adotada por equivaler ao N disponível em 1/3 da concentração da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com N. A fonte de NO_3^- foi o KNO_3 e a de NH_4^+ foi o $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

O período de inundação foi de 21 dias, com avaliações diárias durante os 5 primeiros, 14° e 21° dias de inundação.

A implementação dos tratamentos (plantas com sistemas radiculares inundados e testemunhas não inundadas) e condução do experimento foram iguais ao descrito no item 3.1.1., com adição das fontes de N na solução nutritiva para inundação dos sistemas radiculares das plantas.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Estudo anatômico dos órgãos submersos

Plantas de soja foram cultivadas até o estágio V6-7, ocasião em que tiveram os sistemas radiculares inundados com solução nutritiva sem N a 1/3 de sua concentração pelo período de 21 dias, conforme o item 3.1.1.

Segmentos das plantas com sistemas radiculares inundados e de testemunhas foram coletados após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 e 21 dias, com 3 repetições por tratamento. Foram coletados segmentos de 1 cm a) nas plantas do tratamento inundado: do caule submerso, da transição caule submerso e não submerso, da raiz principal (do 4° ao 5° cm abaixo do nível do substrato), da raiz lateral (situada entre 1 e 2 cm de profundidade e a 1 cm de distância da raiz principal), da raiz adventícia (com mais de 1 cm de comprimento) do caule submerso, e b) nas plantas testemunhas do caule, raiz principal e raiz lateral. Em ambos os tratamentos foram coletados nódulos (situados entre 1 e 3 cm de profundidade). As três repetições de cada tratamento foram colocadas no mesmo frasco de vidro.

A fixação do material vegetal foi feita com formalina neutra tamponada (100 mL de formol; 4,0 g de fosfato monossódico hidratado; 6,5 g de fosfato de sódio bibásico anidro; completando o volume de 1 L com água destilada). A desidratação foi feita na seqüência de

álcool etílico de 30%, 50% e 70%, por 12 h em cada concentração. Tanto na fixação, como na desidratação utilizou-se 50 mL de cada solução em frascos de vidro com 5,0 cm de diâmetro e 7,5 cm de altura.

Os segmentos foram cortados a fim de ter no máximo 3 mm de altura, largura e profundidade, para os procedimentos de infiltração em resina plástica, seguindo o protocolo descrito por Gerrits (1991), detalhado a seguir.

Na pré-infiltração utilizou-se a mistura em igual proporção de álcool etílico 99,5° mais solução de infiltração (resina líquida Leica historesin, marca Jung, mais pó ativador, na proporção de 50 mL para 0,5 g, respectivamente), permanecendo o material nessa solução por 12 h em temperatura ambiente. Na infiltração utilizou-se apenas a solução de infiltração, permanecendo o material por 12 h sob refrigeração de 5 °C. Tanto na pré-infiltração como na infiltração utilizou-se 4 mL de cada solução em frascos de vidro com 2,5 cm de diâmetro e 5,0 cm de altura.

A polimerização foi feita com solução de infiltração mais endurecedor, na proporção de 15 mL para 1 mL, respectivamente, com distribuição da solução em moldes de polietileno com 10 células com capacidade individual de 1,5 mL, com posterior colocação e orientação das 3 repetições dos segmentos de material vegetal de cada tratamento e data de coleta na mesma célula. Os moldes permaneceram em capela, em temperatura ambiente por 1 h, com posterior transferência para estufa à 40 °C por 12 h.

Os blocos de historesina polimerizada foram colados com adesivo plástico sobre blocos de madeira, a fim de serem cortados em micrótomo da América Optical, modelo 820, na espessura de 12 µm.

Os cortes foram montados sobre lâminas de vidro (2,5 cm x 7,5 cm) aquecidas a 65°C, com posterior coloração por 3 minutos em azul de toluidina na concentração de 0,05%

em tampão acetato de sódio anidro 0,1 M e pH 4,7 e lavagem em água corrente por 5 minutos (O'Brien *et al.*, 1964). Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, os cortes foram observados em microscópio ótico Olympus, modelo BX40 e fotografados por meio do sistema automático fotomicrográfico acoplado a ele.

As fotografias dos segmentos da planta foram feitas em lupa Olympus, modelo SZX9, utilizando o sistema automático fotomicrográfico acoplado.

3.2.2. Determinação do espaço poroso nos nódulos e raiz principal

O espaço poroso (aerênquima) nos nódulos e raiz principal foi determinado de acordo com Jensen *et al.* (1969). Os nódulos foram coletados em raízes situadas até 3 cm de profundidade, pois abaixo de 5 cm de profundidade os nódulos praticamente não desenvolveram aerênquima. Utilizou-se o segmento de 8 cm mais superficial da raiz principal em função de ter-se observado em ensaios preliminares o desenvolvimento rápido (visível a olho nu em 2 dias de inundação) de aerênquima nessa região, semelhante ao que ocorreu no caule submerso de plantas com sistemas radiculares inundados.

3.2.3. Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada entre 11 h e 13 h. Seguiu-se a metodologia de McClure & Israel (1979), sendo o caule seccionado, com lâmina de barbear, logo abaixo do nó cotiledonar das plantas. O corte foi lavado com água deionizada e enxuto com papel absorvente. Em seguida, o exsudado foi coletado com auxílio de microcapilares de vidro e transferido para tubos tipo eppendorf que permaneceram em banho de gelo. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer para análises posteriores.

3.2.4. Separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva do xilema

A separação e análise da composição de aminoácidos livres na seiva do xilema foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivação com orto-ftaldialdeído (OPA), conforme Jarret *et al.* (1986).

O aparelho de HPLC utilizado era constituído de duas bombas, A e B, da marca LKB, modelo 2150, controladas por um gerador de gradiente da marca LKB, modelo 2152.

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes tampão fosfato (= "A") na bomba A [(CH₃COONa.3H₂O + Na₂HPO₄.7H₂O) pH 7,25 a 50 mM, 20 mL de tetrahydrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final completado com água] e metanol 65% (= "B") específico para HPLC na bomba B. Ambos os tampões foram deaerados, sendo o tampão "A" filtrado a vácuo, em filtro Millipore, com membrana PVDF, com 0,45 µm de diâmetro.

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se 50 mg de OPA em 1 mL de metanol específico para HPLC com posterior mistura em 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (2,4 g de ácido bórico em 90 mL de H₂O, pH ajustado com NaOH 2 N) e filtrando com filtro Millipore, através de membrana PVDF, com 0,45 µm de diâmetro. Para derivação, 5 µL de mercaptoetanol foram adicionados a 625 µL da mistura.

As amostras de seiva do xilema foram centrifugadas a 14.000 g por 2 min, para posterior derivação com a mistura OPA-borato + mercaptoetanol.

Uma alíquota de 10 µL de amostra ou padrão foi misturada com 70 µL do reagente OPA-borato + mercaptoetanol em eppendorf, agitando-se. Após 2 min de reação, tempo suficiente para formar os derivados aminoácidos-OPA, uma alíquota de 10 µL da mistura da amostra ou padrão com OPA-borato + mercaptoetanol foi injetada no HPLC. Iniciou-se a eluição da mistura em gradiente dos dois tampões, "A" e "B", através da coluna

cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm, da SUPELCO INC.), com fluxo de 0,8 mL/min, em um gradiente de: 20-28% de “B” entre 0 e 5 min, 28-58% de “B” entre 6 e 35 min, 58-75% de “B” entre 36 e 40min, 75-95% de “B” entre 41 e 56 min e, 95-100% de “B” entre 57 e 61 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica os derivados aminoácidos-OPA foram detectados pelo monitor de fluorescência Shimadzu, modelo RF-530, ajustado com λ de excitação de 265 nm e λ de emissão de 480 nm. O registro da área e do tempo de retenção de cada derivado foi feito pelo integrador da marca LKB, modelo 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS-18, com 15 aminoácidos protéicos (ASP, GLU, SER, HIS, GLY, THR, ARG, ALA, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS), aos quais foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos à concentração de 250 nmol/mL (Figura 1). Quando foi detectado no cromatograma o pico de algum aminoácido não identificado no padrão utilizado, sua concentração foi determinada pela média das áreas dos picos integrados conhecidos, anterior e posterior a ele.

3.2.5. Quantificação de ureídeos totais (URE) na seiva do xilema

A determinação de URE na seiva do xilema foi feita de acordo com Vogels & Van Der Drift (1970), que estima os teores de ureídeos a partir de leituras de absorvância a 535 nm, tomando-se como base uma curva padrão de alantoína com quantidades variando entre 0 e 75 nmol.

Utilizou-se entre 5 e 20 μ L de seiva, quantidade variável de acordo com o tratamento e data de avaliação, completando o volume até 750 μ L com água, em tubos de ensaio. Após adicionar 250 μ L de NaOH 0,5 N, os tubos foram agitados, tampados com esferas de vidro e

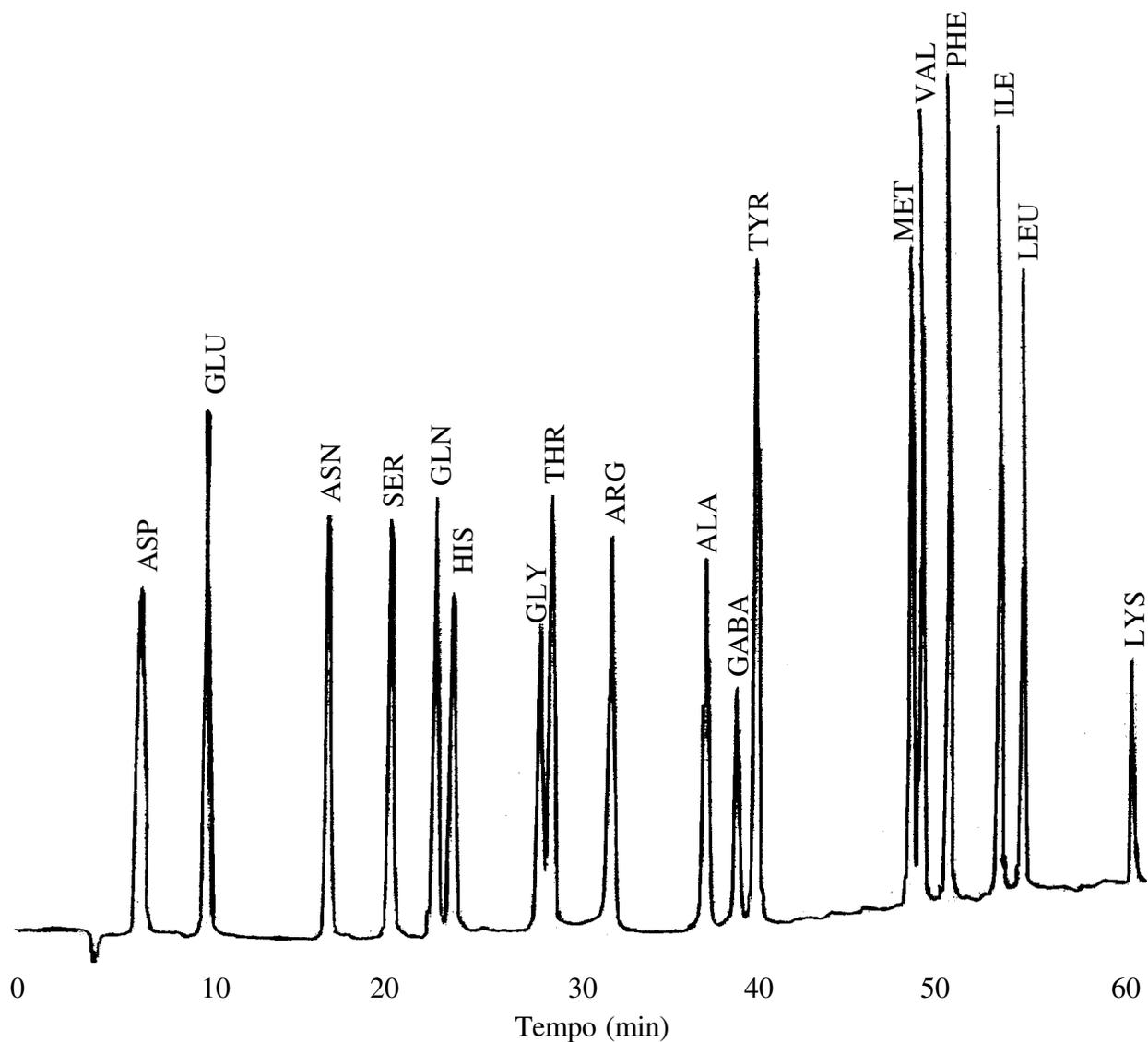


Figura 1. Perfis de eluição de derivados OPA-aminoácidos do padrão Sigma AAS-18, enriquecido com ASN, GLN e GABA, em coluna cromatográfica Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 4,6 mm x 250 mm) por HPLC. Taxa de fluxo: 0,8 mL/min, λ de excitação: 250 nm, λ de emissão: 480 nm, tampão A: Na₂HPO₄ 50 mM e pH 7,25, tampão B: metanol 65%, gradiente: 20 a 100% de B em 61 min.

colocados em banho-maria a 100 °C durante 8 min, com a finalidade de fazer a hidrólise alcalina da alantoína em alantoato. Após o resfriamento foram acrescentados 250 µL de HCl 0,65 N, os tubos foram agitados, tampados com esferas de vidro e colocados em banho-maria a 100 °C durante 4 min, com a finalidade de fazer a hidrólise ácida do alantoato em glioxilato e uréia. Após o resfriamento, os tubos receberam 250 µL de tampão fosfato (NaHPO₄ + KH₂PO₄) 0,4 M, pH 7,0 e 250 µL de fenil-hidrazina a 0,33%. Foram agitados e mantidos em repouso por 5 min, com a finalidade de formar o ácido glioxílico fenil hidrazona. Posteriormente, os tubos foram resfriados a 0 °C, em banho de gelo, por 5 min. Em seguida adicionou-se 1,25 mL de HCl concentrado e gelado (0°C) e 250 µL de ferricianeto de potássio [K₃Fe (CN)₆] a 1,65%. Os tubos foram agitados e deixados à temperatura ambiente durante 15 min, para posterior leitura de absorbância a 535 nm. Nessa etapa o ácido glioxílico fenil hidrazona é transformado em 1,5-difenilformazam, de cor vermelha, equivalente à presença de ureídeos totais na amostra.

3.2.6. Quantificação dos aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema

A quantidade de ALT na seiva do xilema de cada amostra foi determinada pelo somatório das áreas de todos os picos integrados detectados no cromatograma, conforme descrito no item 3.2.4.

3.2.7. Dosagem de nitrato (NO₃⁻) na solução nutritiva

A quantificação de NO₃⁻ na solução nutritiva foi realizada conforme método de Cataldo *et al.* (1975). Em tubos de ensaio, foram pipetados 100 µL de água (branco), amostras e padrões (tendo como fonte KNO₃), completando o volume até 100 µL com H₂O e 400 µL do

reagente salicílico (ácido salicílico 5% p/v em H_2SO_4 concentrado) e os tubos foram agitados. Após 20 min à temperatura ambiente, foram adicionados 9,5 mL de NaOH 2 N. Os tubos esfriaram à temperatura ambiente, foram agitados e foi feita a leitura da absorbância a 410 nm dos padrões e amostras contra o branco.

3.2.8. Dosagem de amônio (NH_4^+) na solução nutritiva

A quantificação de NH_4^+ na solução nutritiva foi realizada conforme método de Mitchell (1972), modificada por Felker (1977). Em tubos de ensaio, foram pipetados 500 μL de água (branco), amostras e padrões (tendo como fonte NH_4Cl) completando o volume até 500 μL com H_2O . Adicionou-se 2,5 mL da solução A (5 g de fenol + 25 mg de nitroprussiato de sódio em 500 ml de H_2O). A seguir acrescentou-se 2,5 mL da solução B (15 g de NaOH + 0,31 g de dicloroisocianurato de sódio em 500 ml de H_2O), agitou-se os tubos e após 30 min foi feita a leitura da absorbância a 630 nm dos padrões e amostras contra o branco.

3.2.9. Dosagem da concentração de O_2 e pH da solução nutritiva

Os teores de O_2 na solução nutritiva foram medidos em medidor portátil de tensão de O_2 da marca JENWAY, modelo 9071. O pH das soluções nutritivas foi determinado em pHmetro da marca Micronal, modelo B474.

3.2.10. Determinação da área foliar e matéria seca das plantas

A área foliar foi determinada utilizando-se o medidor de área da marca LI-COR, modelo LI-3100.

A matéria seca das plantas foi determinada em balança analítica, após as mesmas permanecerem em estufa ventilada, na temperatura de 60 °C, até massa constante. A temperatura de 60 °C foi utilizada para evitar perdas, por volatilização, de N do tecido vegetal.

3.2.11. Dosagem do teor de N na parte aérea das plantas

O teor de N na parte aérea das plantas foi determinado pela técnica de Kjeldahl de acordo com Tedesco *et al.* (1995).

3.2.12. Dosagem do teor de clorofila nas folhas

O teor de clorofila foi determinado em discos foliares retirados do último trifólio totalmente expandido (folha adulta), tendo como referência a base da planta. Utilizou-se como solução extratora dimetilsulfóxido (DMSO), com base em Hiscox & Israelstam (1979).

3.3. Delineamentos experimentais e análises estatísticas

Os tratamentos dos ensaios realizados foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições, onde cada vaso com duas plantas compôs a unidade experimental. Aos dados quantitativos obtidos, foi aplicada a análise de variância e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (D.M.S.) ou pelo teste de Duncan na probabilidade (P) = 0,05, utilizando-se o programa computacional SANEST (Sistema de Análise Estatística).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Concentrações de O₂ na solução nutritiva dos experimentos

As concentrações de O₂ na solução nutritiva dos vasos, nos experimentos com plantas com sistemas radiculares inundados a partir de V6-7, foram de aproximadamente 6,7 mg de O₂/L de solução na ocasião da inundação, com posterior diminuição para 0,9 a 0,4 mg de O₂/L de solução a partir de um dia até 21 dias de inundação (Figura 2). Essa variação diária, em cada experimento, ocorreu em função da oscilação diária da temperatura.

O padrão da curva de disponibilidade de O₂ na solução nutritiva (Figura 2) demonstra uma diminuição brusca no teor de O₂ após um dia de inundação, caracterizando a situação de

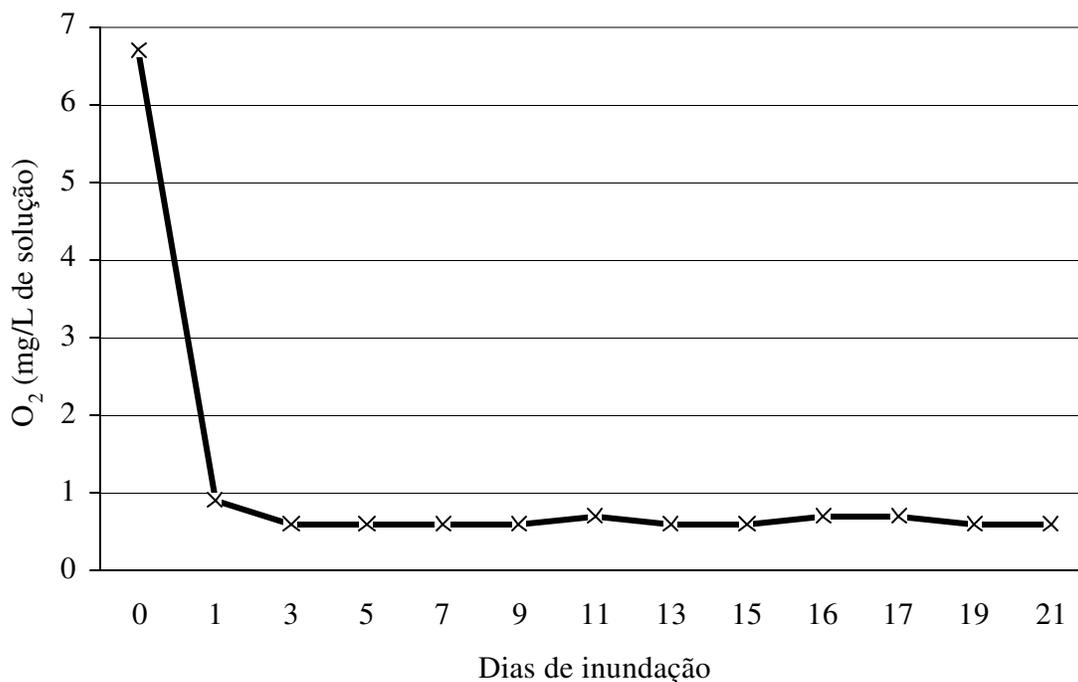


Figura 2. Concentração média de O₂ na solução nutritiva dos vasos cultivados com soja com sistemas radiculares inundados, durante 21 dias, a partir do estágio V6-7.

hipoxia nos sistemas radiculares das plantas durante os 21 dias de inundação. Os resultados se aproximam dos encontrados por Sousa (2001) cultivando soja num sistema de hidroponia, sem borbulhamento e com óleo mineral em suspensão na solução nutritiva dos vasos.

Durante os 21 dias que duraram os experimentos com hipoxia, com plantas de soja, foram acompanhadas as modificações morfológicas ocorridas nos segmentos dos órgãos submersos e os níveis de aminoácidos transportados na seiva do xilema.

4.2. Modificações morfológicas e desenvolvimento de aerênquima em plantas de soja com sistemas radiculares sob deficiência de O₂

O estudo das modificações morfológicas e desenvolvimento de aerênquima nas plantas de soja com sistemas radiculares inundados, iniciou-se quando elas se encontravam no estágio vegetativo com 5-6 folhas trifolioladas desenvolvidas (V6-7) e terminou 21 dias após, quando as plantas estavam com 10-12 folhas trifolioladas desenvolvidas e no florescimento.

4.2.1. Na porção caulinar submersa e nas raízes adventícias

Após um dia de inundação ocorreu a hipertrofia de lenticelas no segmento do caule submerso. No segundo dia a hipertrofia das lenticelas aumentou, começaram a surgir raízes adventícias (Figura 3C) e a epiderme do caule submerso começou a se romper (Figura 4A) devido ao desenvolvimento de aerênquima, produzido a partir de divisões de células do periciclo (Figuras 4B e C). No terceiro dia já existiam raízes adventícias com 2 a 5 mm de comprimento. A partir do 4° ou 5° dia acentuou-se o desenvolvimento do aerênquima no caule submerso e na transição caule-raiz principal da planta (Figura 3E e F, respectivamente), bem como já existiam várias raízes adventícias com mais de 1 cm de comprimento (Figura 5A). Do

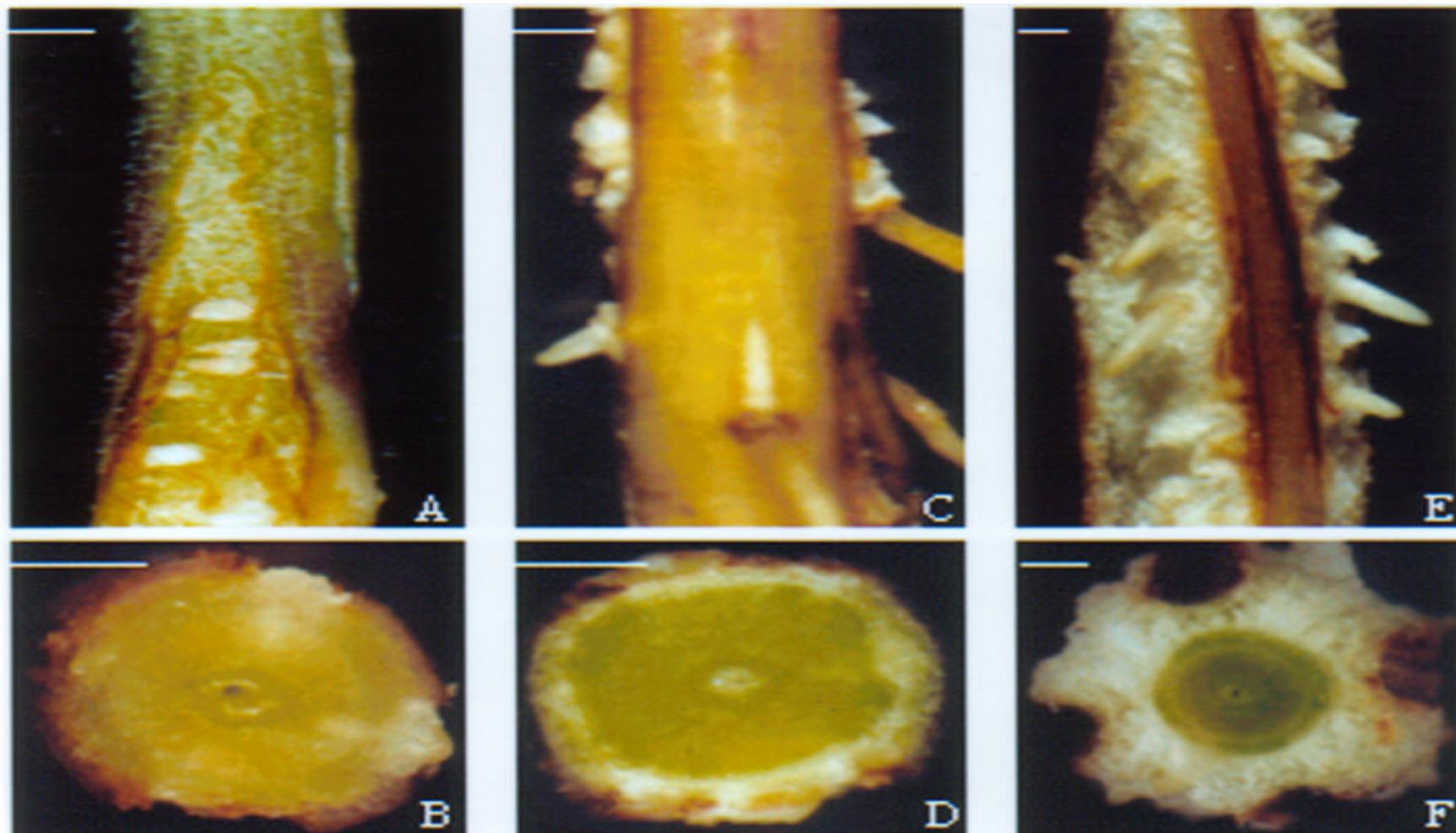


Figura 3. Transição do caule com a raiz principal de uma planta de soja não inundada (A), inundada por 2 dias (C) e inundada por 5 dias (E). Corte transversal do caule de uma planta de soja não inundada (B), inundada por 2 dias (D) e inundada por 5 dias (F) Barras = 1mm.

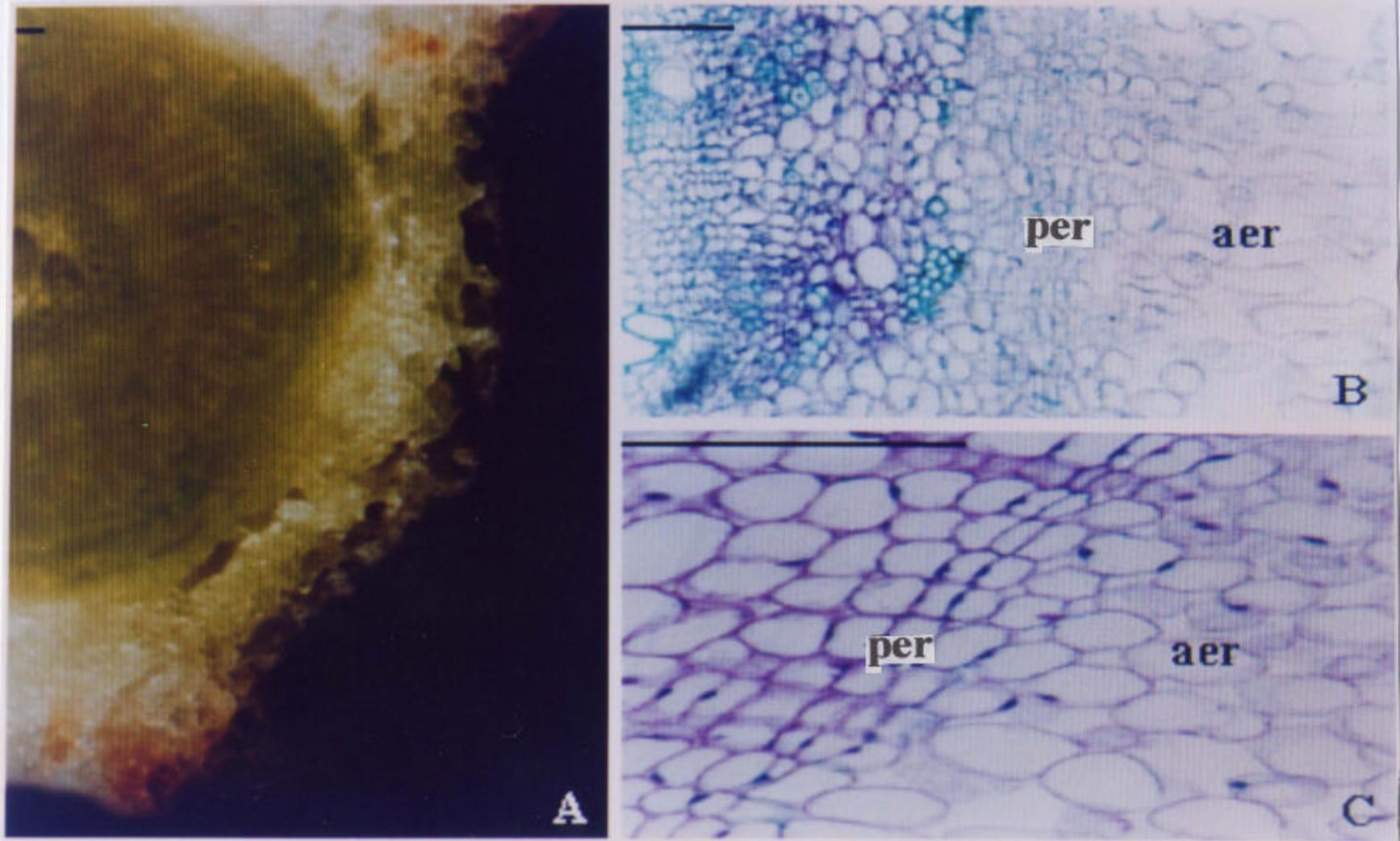


Figura 4. A) Desenvolvimento de aerênquima no caule submerso de uma planta de soja inundada; B e C) Corte transversal do caule submerso mostrando o desenvolvimento de aerênquima (aer) a partir do periciclo (per). Barras = 100 μm .

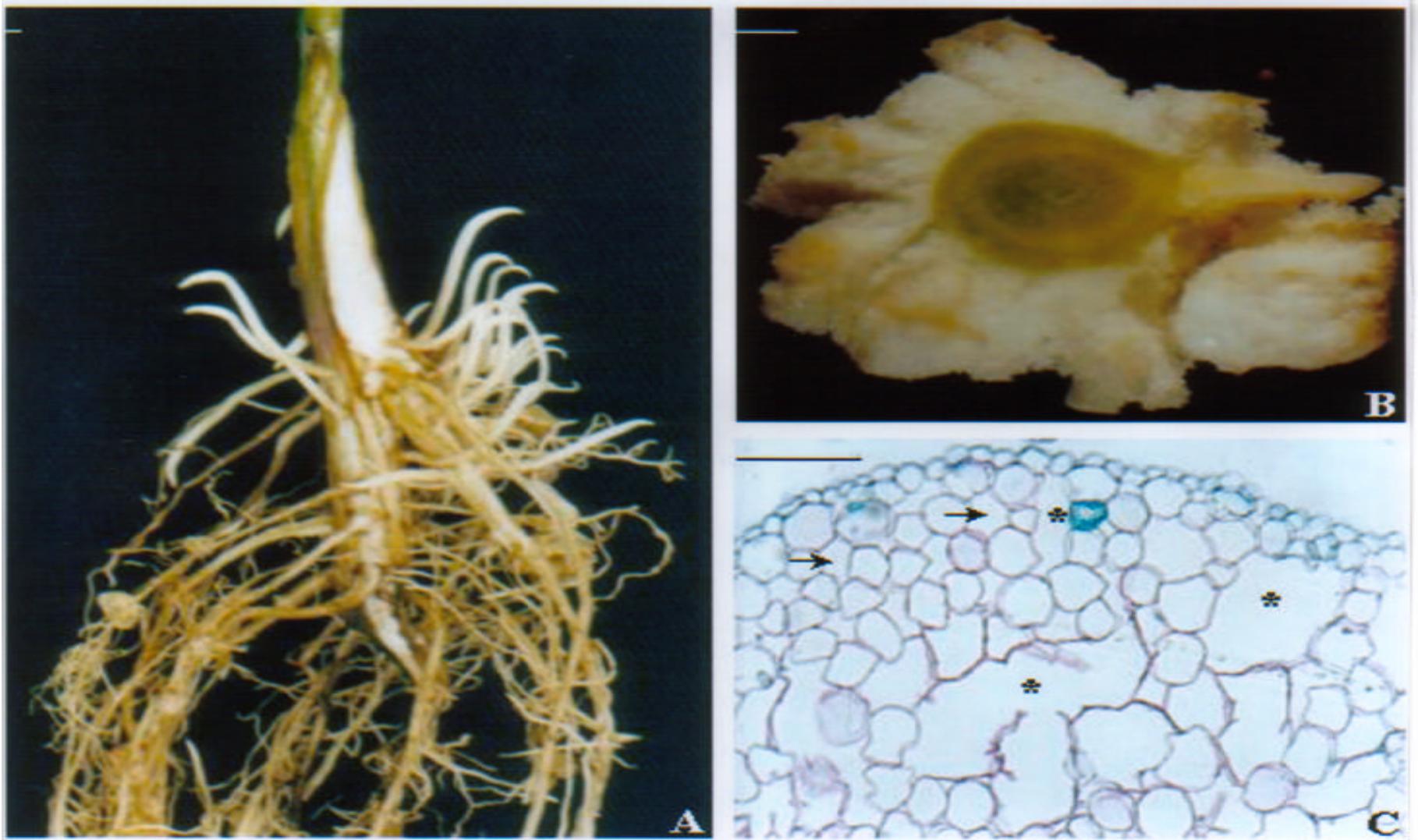


Figura 5. A) Planta de soja inundada por 5 dias; B) Desenvolvimento da raiz adventícia a partir do caule submerso por 14 dias; C) Corte transversal da raiz adventícia mostrando a presença de aerênquima esquizógeno (→) e lisígeno (*). Barras: A e B = 1mm e C = 100 µm.

7° para o 14° (Figura 5B) e 21° dia (dados não mostrados) de inundação praticamente não houve alteração no volume de aerênquima na seção transversal do caule submerso, já o volume de raízes adventícias aumentou.

As raízes adventícias (Figura 5B) do caule submerso apresentaram aerênquima esquizógeno e lisígeno no córtex (Figura 5C). Com o prolongamento da inundação aumentou a formação de aerênquima lisígeno e no 14° e no 21° dias de inundação observou-se o desenvolvimento de aerênquima a partir de divisões de células do periciclo. O aerênquima produzido a partir do periciclo deslocou a endoderme e o córtex em direção à parte mais externa da raiz, rompendo a epiderme e eliminando esses tecidos. Após 14 dias de inundação observou-se a presença de raízes laterais nas raízes adventícias (dados não mostrados).

Nas plantas não inundadas observou-se a presença de primórdios de raízes adventícias na região de transição caule-raiz principal (Figura 3A e B) devido à grande capacidade da vermiculita reter umidade (2 L da vermiculita utilizada absorveram 400 mL de H₂O).

Os resultados obtidos para o desenvolvimento de aerênquima no caule submerso, surgimento de raízes adventícias com aerênquima vão de encontro com a bibliografia existente (Bacanamwo & Purcell, 1999; Pires *et al.*, 2002), além do que esclarecem algumas dúvidas e acrescentam informações mais detalhadas sobre o assunto. No caule submerso o tecido esponjoso referido por Pires *et al.* (2002) é aerênquima produzido a partir de células do periciclo. Nas raízes adventícias além de aerênquima lisígeno (Bacanamwo & Purcell, 1999; Pires *et al.*, 2002) ocorre a formação de aerênquima esquizógeno e aerênquima produzido a partir de células do periciclo, quando o período de inundação foi igual ou superior a 14 dias.

4.2.2. Na raiz principal e nas raízes laterais

O desenvolvimento de aerênquima nos primeiros 8 cm da raiz principal (Figura 5A) foi pequeno até o 4º dia de inundação, a partir daí ele aumentou rapidamente. O aerênquima teve origem à partir de divisões de células do periciclo.

Nas raízes laterais observou-se o surgimento de aerênquima a partir do 5º ou 6º dia de inundação, tendo como origem divisões de células do periciclo (Figura 6B).

No 14º dia de inundação, observou-se que, tanto nos primeiros 8 cm da raiz principal como nas raízes laterais situadas entre 2 e 3 cm de profundidade, o aerênquima produzido a partir do periciclo deslocou a endoderme e o córtex em direção à parte mais externa da raiz, rompeu a epiderme e eliminou esses tecidos.

O desenvolvimento de aerênquima na raiz principal e raízes laterais não ocorre no córtex conforme descrito por Bacanamwo & Purcell (1999) e Pires *et al.* (2002), mas sim em substituição ao córtex, tendo em vista que o aerênquima é produzido a partir de células do periciclo.

4.2.3. Nos nódulos

O desenvolvimento de aerênquima nos nódulos, situados nos primeiros 3 cm de profundidade, foi rápido com a inundação, atingindo em torno de 1,8 % do volume do nódulo após 1 dia de inundação e não se alterando mais. O aerênquima teve origem em divisões de células do felogênio (Figura 6C), apresentando uma conexão entre o aerênquima do nódulo e o aerênquima da raiz lateral a que ele está ligado (Figura 6A).

Os nódulos da soja suportaram a inundação até 21 dias, respaldando os trabalhos de Pankhurst & Sprent (1975), Dakora & Atkins (1989) e Parson & Day (1990) e isso deve-se

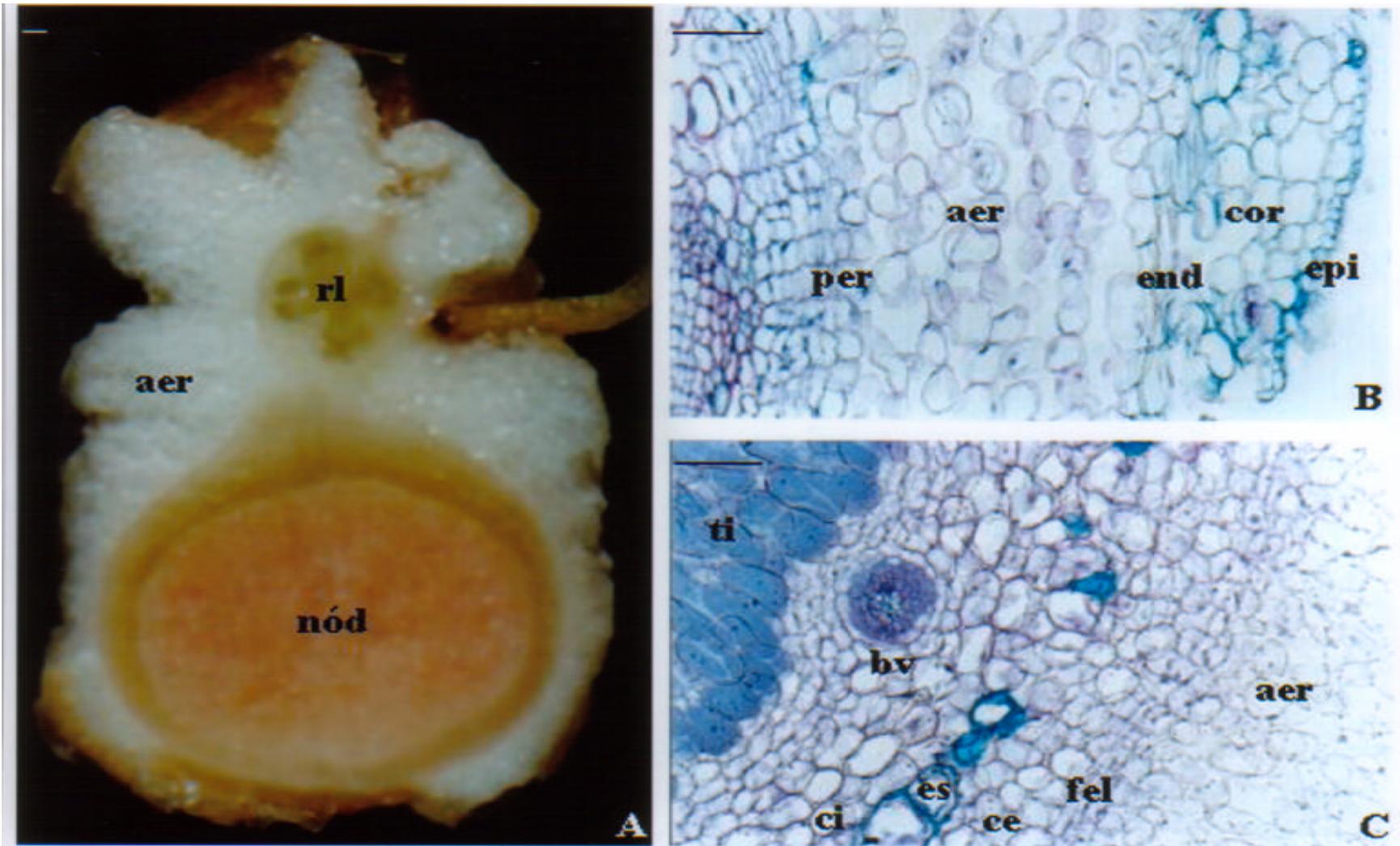


Figura 6. A) Aerênquima (aer) na raiz lateral (rl) e nódulo (nód) de uma planta de soja inundada por 21 dias; B) Desenvolvimento de aerênquima a partir do periciclo (per) na raiz lateral; C) Desenvolvimento de aerênquima a partir do felôgeno (fel) no nódulo. Abreviaturas – end: endoderme, cor: córtex, epi: epiderme, ti: tecido infectado, bv: bainha vascular, ci: córtex interno, es: esclereídeos, ce: córtex externo. Barras = 100 μ m.

ao desenvolvimento de aerênquima a partir de células do felogênio. Entretanto, nos nódulos situados abaixo de 7-8 cm de profundidade praticamente não houve desenvolvimento de aerênquima.

Mesmo nos nódulos de plantas não inundadas ocorreu o desenvolvimento de aerênquima a partir da hipertrofia de lenticelas. A hipertrofia das lenticelas ocorreu devido a divisões de células do felogênio.

4.2.4. Na planta

Na planta de soja com sistema radicular inundado ocorreu uma interconexão de aerênquima no segmento do caule submerso e a raiz principal, a raiz principal e as raízes laterais mais superficiais (até 5 cm de profundidade) e as raízes laterais mais superficiais e os nódulos, a partir do 5º dia de inundação. Além do que, no segmento do caule submerso ocorreu o desenvolvimento de raízes adventícias (a partir do 2º dia de inundação) com aerênquima esquizógeno e lisígeno (desde o 2º dia de desenvolvimento da raiz adventícia) e a partir do periciclo (após 2 semanas de inundação). Isso demonstra a capacidade da planta de soja tolerar o excesso de umidade no solo (VanToai *et al.*, 1994; Bacanamwo & Purcell, 1999a; Thomas *et al.*, 2000; Pires *et al.*, 2002).

4.3. Composição de aminoácidos na seiva do xilema e fixação de N₂ em plantas de soja com sistemas radiculares inundados com solução nutritiva sem N

Para verificar o efeito da inundação sobre a composição de aminoácidos na seiva do xilema e fixação de N₂ foram feitos dois experimentos: 1) com as plantas de soja no estágio vegetativo com 5-6 folhas trifolioladas desenvolvidas (V6-7), submetidas a período de inundação de 21 dias, após o qual as plantas encontravam-se com 9-10 folhas trifolioladas

desenvolvidas; 2) com as plantas de soja no florescimento (R2), apresentando 12 folhas trifolioladas desenvolvidas, período de inundação de 10 dias, após o qual as plantas atingiram o estágio de formação de legume.

Foram utilizados dois estádios de desenvolvimento das plantas com o objetivo de verificar o efeito do acúmulo de matéria seca e, conseqüentemente, de reservas na planta sobre a capacidade das mesmas reverterem o processo de hipoxia no sistema radicular.

4.3.1. Plantas com sistemas radiculares inundados a partir do estágio V6-7

A composição de aminoácidos na seiva do xilema das plantas com sistemas radiculares inundados no estágio V6-7 estão na Figura 7 e Tabela 1. Os aminoácidos que apresentaram maior proporção e variação foram a ALA, ASN, ASP, GLN, SER e GABA e a variação durante os 21 dias de inundação foi destacada na Figura 7. Na Tabela 1 estão representados os dados para todos aminoácidos, apenas para os dias 5, 13 e 21, junto com o teor de aminoácidos totais, ureídeos e clorofila das folhas.

O teor de ALA, um indicador de anaerobiose (Puiatti & Sodek, 1999; Reggiani *et al.*, 2000; Sousa & Sodek, 2002), aumentou bruscamente no 1º dia de inundação (Figura 7), atingindo 37% da composição dos os aminoácidos, diminuiu no 3º dia e se manteve em torno de 15% até o 11º dia, ocasião em que sofreu nova queda e do 15º dia de inundação em diante atingiu valores inferiores a 2%. O teor de ASP apresentou comportamento oposto à ALA, diminuiu bruscamente no 1º dia, de 23% para 3%, manteve-se baixo até o 7º dia e começou a crescer lentamente até o 13º, quando aumentou rapidamente, atingindo 42% no 21º dia de inundação. Isso pode ser explicado porque o ASP é a fonte de N para formação de ALA em plantas de soja sob deficiência de O₂ no sistema radicular (Puiatti & Sodek, 1999).

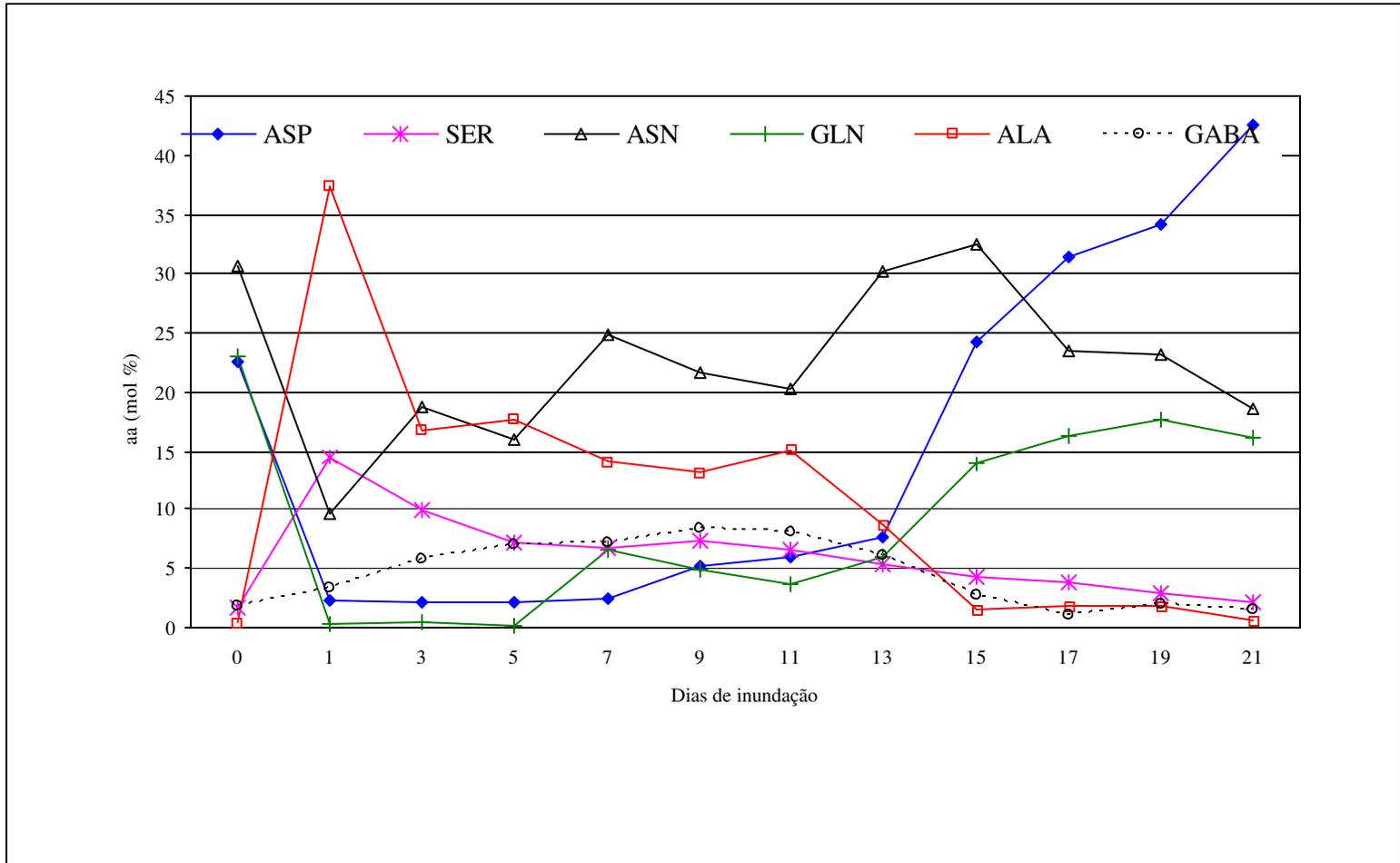


Figura 7. Composição dos principais aminoácidos (aa) na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados, durante 21 dias, com solução nutritiva sem N, a partir do estágio V6-7.

Tabela 1. Composição de aminoácidos, teores de aminoácidos livres totais (ALT), ureídeos (URE) na seiva do xilema e clorofila (Clorof.) nas folhas de plantas de soja com sistemas radiculares não inundados (NI) e inundados (I), durante 21 dias com solução nutritiva sem N, a partir do estágio V6-7.

Amino- ácidos	7 dias		13 dias		21 dias	
	NI	I	NI	I	NI	I
 mol%					
ASP	17,98	2,37	5,79	7,62	12,27	42,56
GLU	2,87	1,79	0,83	3,19	3,98	3,85
ASN	34,73	24,86	49,99	30,17	49,18	18,54
SER	1,64	6,75	1,02	5,30	0,52	2,13
GLN	20,17	6,61	22,77	5,99	20,63	16,19
HIS	4,15	1,95	3,50	2,05	2,16	1,69
GLY	0,16	1,05	2,45	1,11	3,50	0,41
THR	4,83	6,12	2,74	5,01	0,47	2,23
ARG	1,87	1,70	1,55	1,09	0,42	0,87
ALA	0,45	14,04	0,21	8,65	0,48	0,65
GABA	2,24	7,15	1,03	6,15	1,73	1,55
TYR	0,42	1,98	0,31	1,13	0,26	0,23
MET	0,12	0,83	0,35	1,91	0,29	0,52
VAL	2,63	5,25	2,19	4,28	1,45	2,69
PHE	0,75	1,41	0,77	1,19	0,40	0,65
ILE	0,98	2,45	0,82	2,89	0,55	0,46
LEU	0,82	2,58	0,68	1,94	0,37	0,50
LYS	2,80	4,35	2,52	2,63	1,33	2,69
n.i. ^{1/}	0,40	6,75	0,47	7,70	0,00	1,57
 ? mol/mL					
ALT	1,6 a ^{2/}	1,0 b	2,8 a	1,5 b	1,6 a	0,5 b
URE	4,1 a	0,7 b	4,0 a	1,3 b	3,9 a	2,9 a
 ? g/cm ²					
Clorof.	36,9 a	21,8 b	38,4 a	15,1 b	47,6 a	14,0 b

^{1/} n.i. = não identificados.

^{2/} Médias seguidas de letras distintas na linha, dentro de cada período, diferem entre si pelo teste da D.M.S. (P ? 0,05).

Entretanto, esses resultados sugerem que a planta de soja saiu de uma condição de hipoxia para normoxia, mesmo sob inundação, provavelmente em função sua capacidade de desenvolver aerênquima nos órgãos submersos, conforme foi visto no item 4.2. A elevação do teor de ASP está associada ao cultivo de soja nodulada em hidroponia com aeração (Puiatti & Sodek, 1999), enquanto o teor de ASP diminui com a inundação (Amarante, 2002).

O teor de GLN, um indicador da eficiência da fixação simbiótica em soja (Amarante, 2002), diminuiu bruscamente no 1º dia de inundação (Figura 7), caiu de 22% para quase 0%, e manteve-se próximo a esse valor até o 5º dia, ocasião em que começou a aumentar e se manteve próximo a 5% até o 13º dia, quando começou a crescer e atingiu valores entre 15 e 17%, valores esses próximos aos 20% de plantas não inundadas (Tabela 1). Também ficou evidenciada a relação entre os teores de GLN e ureídeos, outro indicador da fixação de N₂ na seiva do xilema da soja (Amarante, 2002), que apresentaram um coeficiente de correlação (r) de 0,90 (Figura 8). Isso enfatiza que a fixação de N₂ na soja pode se aclimatar à inundação e a recuperação da fixação coincide com a formação de aerênquima e raízes adventícias (Bacanamwo & Purcell, 1999a).

O teor de ASN diminuiu acentuadamente após o primeiro dia de inundação (Figura 7), passando de 30% para 10%, quando começou a se recuperar lentamente, com alguma variação, até atingir o mesmo nível pré-inundação no 13º e 15º dias de inundação, ocasião em que voltou a diminuir. Até o 15º as oscilações no teor de ASN apresentaram uma relação inversa com ALA, porém a queda de ASN no final do experimento parece estar relacionada com o aumento de ASP. Tendo em vista que tanto a ASN (Lea & Fowden, 1975; Shi *et al.*, 1997) como a ALA (Puiatti & Sodek, 1999; Sousa, 2001) são produzidas a partir do ASP, estas variações podem ser explicadas pela utilização competitiva de ASP na síntese desses dois aminoácidos. Desta forma, na fase inicial, ocorre um aumento brusco na transformação de

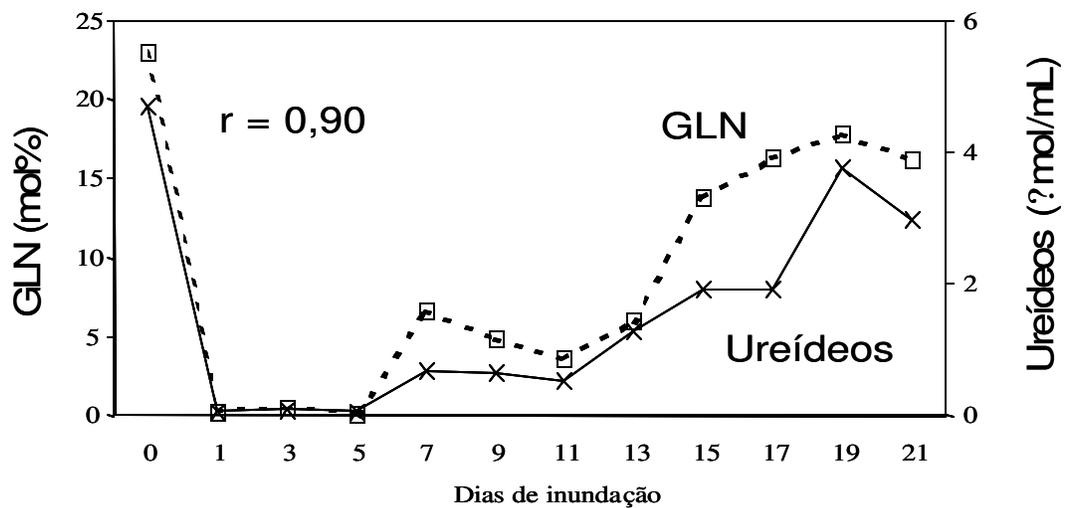


Figura 8. Concentrações de glutamina (GLN) e ureídeos na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados, durante 21 dias com solução nutritiva sem N, a partir do estágio V6-7.

ASP em ALA, o que prejudica a síntese de ASN. Em seguida, estabelecida a condição de hipoxia, a utilização de ASP na síntese de ASN e ALA fica estabilizada, pelo menos até o 11º dia. A partir do 11º dia de inundação as plantas, por meio de adaptações morfológicas, conseguiram reverter o processo de deficiência de O₂ no sistema radicular, momento em que ocorreu um aumento acentuado nos teores de ASP e GLN e uma diminuição nos teores de ASN e ALA. Neste momento, a transformação de ASP em ALA diminuiu rapidamente, de forma que sobra ASP para a síntese de ASN, porém acima da capacidade para formar ASN, o que leva ao aumento de ASP também. Na fase final (após o 15º dia), caracterizada a volta à normoxia em função do teor baixíssimo de ALA, a ligeira queda na ASN associada ao aumento ainda maior de ASP, aparentemente seria um reflexo de um excedente maior de ASP

em relação à capacidade de síntese de ASN. A predominância de ASP na seiva do xilema foi também encontrada em soja nodulada cultivada em hidroponia com aeração (Lima, 2002), situação paralela à inundação com formação de aerênquima. Entretanto, Lima (2002) atribui a queda de ASN e aumento de ASP, em plantas de soja noduladas submetidas à hidroponia com aeração, à uma queda na atividade da asparagina sintetase (enzima responsável pela transformação de ASP em ASN) no nódulo, provocada pelo impedimento da fixação de N_2 . Aparentemente, a aeração do sistema de hidroponia foi suficiente para evitar a hipoxia do sistema radicular, mas não do nódulo, com conseqüências prejudiciais à fixação de N_2 . Tal interpretação não parece adequada para o sistema de inundação com formação de aerênquima, pois os dados (GLN e ureídeos) sugerem a recuperação quase total dos nódulos em termos de fixação de N_2 . Neste caso, o suprimento dos nódulos com O_2 via aerênquima parece ser próximo do ideal. Uma possível explicação para esta discrepância está numa possível recuperação apenas parcial da atividade da asparagina sintetase no nódulo. De fato, a recuperação da fixação de N_2 no sistema estudado por Lima (2002), onde as plantas voltaram do sistema hidropônico para vermiculita (disponibilidade plena de O_2) foi muito mais rápida em termos de fixação de N_2 (recuperação de GLN no xilema) do que para a atividade da asparagina sintetase. Deve ser lembrado também que no sistema estudado por Lima (2002) a recuperação do estresse envolveu apenas o nódulo, enquanto que no sistema aqui estudado envolveu não só o nódulo como também a recuperação do sistema radicular da hipoxia. Portanto, isso leva a crer que o transporte preferencial de ASN ou ASP, na seiva do xilema de plantas de soja inundadas, dependentes da fixação simbiótica de N_2 , está relacionado com a disponibilidade de O_2 e, conseqüentemente, energia para síntese e interconversão de aminoácidos no sistema radicular.

Os aminoácidos SER e GABA (Figura 7) ocorreram em pequena proporção na seiva do xilema, o teor de SER aumentou no 1º dia, atingindo 15%, e começou a decrescer até o 21º dia de inundação, quando representou 2% da composição da seiva do xilema. Já o teor de GABA aumentou lentamente durante os primeiros 5 dias de inundação, atingindo 8% no 9º dia e a partir daí começou a decrescer, principalmente após o 13º dia de inundação, quando as plantas de soja conseguiram reverter o processo de deficiência de O₂ no sistema radicular. Resultados semelhantes foram encontrados por Puiatti & Sodek (1999) e Amarante (2002) para períodos de inundação de até 5 dias. A síntese de GABA ocorre pela α -descarboxilação do GLU (Reggiani, 1999; Shelp *et al.*, 1999).

As principais interconversões entre os aminoácidos livres em raízes deficientes em O₂ já foram esclarecidas através de estudos metabólicos e enzimáticos, sendo atribuídas ao ajuste do metabolismo para regular o pH celular (Sousa, 2001; Sousa & Sodek, 2002). Os resultados obtidos na seiva do xilema das plantas de soja fixando N₂ (Figura 7), com sistemas radiculares sob inundação, confirmam isso.

Os demais aminoácidos estudados (GLU, HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS) apresentaram pouca variação na seiva do xilema durante os 21 dias de inundação do sistema radicular (Tabela 1) e portanto não serão abordados na discussão.

A quantidade de aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema diminuiu drasticamente com a inundação, atingindo valores próximos a 50% do valor da testemunha não inundada após 7 e 13 dias de inundação, e 30% após 21 dias (Tabela 1), o que pode refletir numa deficiência de N para o desenvolvimento das plantas.

Mesmo sob condição de inundação do sistema radicular as plantas de soja continuaram a se desenvolver e após 21 dias de tratamento produziram entre 4 e 5 folhas trifolioladas novas. Entretanto, essas folhas apresentaram teores de clorofila menores que as plantas não

inundadas a partir de uma semana de inundação (Tabela 1), demonstrando uma deficiência de nitrogênio.

Observando e analisando em conjunto as modificações morfológicas e fisiológicas que ocorreram nas plantas de soja noduladas, com sistemas radiculares inundados, pode-se afirmar que, após 2 semanas as plantas reverteram os sintomas provenientes do processo de deficiência de O_2 no sistema radicular e recuperaram a fixação simbiótica de N_2 . Entretanto, as plantas sobreviveram ao período de 21 dias de inundação, embora tenham tido seu desenvolvimento reduzido e tenham se apresentado cloróticas, quando comparadas com plantas não inundadas. Os resultados relativos ao desenvolvimento das plantas são semelhantes aos encontrados por Nathanson *et al.* (1984), Sallam & Scott (1987), Oosterhuis *et al.* (1990) e Bacanamwo & Purcell (1999a). Maiores detalhes, envolvendo parâmetros de desenvolvimento, são abordados no item 4.4.

4.3.2. Plantas com sistemas radiculares inundados a partir do florescimento

Esse experimento foi conduzido com o objetivo de verificar a influência da inundação dos sistemas radiculares em plantas de soja com desenvolvimento mais avançado, sobre a composição dos aminoácidos na seiva do xilema e a fixação de N_2 . Por ocasião do início da inundação as plantas no florescimento (R2) apresentavam 12 folhas trifolioladas desenvolvidas em relação às 5-6 folhas das plantas no estágio vegetativo V6-7, portanto apresentavam maior acúmulo de matéria seca e reservas nos órgãos das plantas.

O teor de O_2 na solução nutritiva, aerênquima nos nódulos e raiz principal, teores de ALA e GLN, quantidade de ureídeos e aminoácidos livres totais na seiva do xilema das plantas de soja com sistemas radiculares inundados a partir do florescimento, são apresentados na Tabela 2. Avaliou-se o percentual de aerênquima nos 8 cm da raiz principal, a partir do colo

Tabela 2. Teores de O₂ na solução nutritiva, aerênquima nos nódulos e raiz principal, teores de alanina e glutamina, quantidade de ureídeos e aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados, durante 10 dias com solução nutritiva sem N, a partir do florescimento.

Dias de Inundação	O ₂ na solução (mg/L)	Aerênquima (%)		mol% na seiva		? mol/mL de seiva	
		Nódulos	Raiz ^{1/}	Alanina	Glutamina	Ureídeos	ALT
0	6,6	0,4 b ^{2/}	0,3 c	0,4	13,7	4,2 a	2,1 a
1	0,9	1,9 a	1,6 c	34,0	0,6	0,2 b	1,2 bc
2	0,7	1,9 a	2,5 c	--	--	--	--
3	0,6	1,9 a	2,6 c	17,7	0,2	0,2 b	0,8 c
4	0,8	1,7 ab	4,7 c	--	--	--	--
5	0,6	1,8 a	13,4 b	12,8	0,8	0,2 b	0,7 c
6	0,6	1,8 a	17,3 b	--	--	--	--
7	0,6	2,1 a	22,0 a	3,9	6,2	1,4 b	1,1 bc
10	0,7	1,7 ab	21,7 a	6,2	12,8	3,9 a	1,6 ab

^{1/} 8 cm da raiz principal a partir do colo da planta.

^{2/} Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P ? 0,05).

da planta, tendo em vista que em experimentos preliminares foi observado que esse segmento da planta apresentava desenvolvimento rápido e intenso de aerênquima, além de menor variação que nas outras regiões estudadas da planta. O experimento foi conduzido sob temperaturas mais amenas (média das temperaturas máximas de 32 °C) do que o experimento com inundação no estágio V6-7 (média das temperaturas máximas de 38 °C).

O teor de O₂ na solução nutritiva (Tabela 2) diminuiu rapidamente após 1 dia de inundação, passando de 6,6 mg de O₂/L de solução para 0,9 mg de O₂/L e manteve-se em torno de 0,7 mg de O₂/L durante o experimento, evidenciando a deficiência de O₂ no sistema radicular das plantas inundadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa (2001).

O percentual de aerênquima nos nódulos (Tabela 2) aumentou de 0,4% nas plantas não inundadas para 1,9% a partir do 1º dia de inundação e manteve-se próximo a esse valor durante todo o experimento. Já, o percentual de aerênquima na raiz principal aumentou gradativamente, passando de 4,7% no 4º dia de inundação para 13,4% no 5º e 22% no 7º dia de inundação.

Os teores de ureídeos e GLN (Tabela 2), indicadores da fixação de N₂, na seiva do xilema estão relacionados com o percentual de aerênquima na raiz principal. A partir do 7º dia de inundação, quando o aerênquima atingiu 22% na raiz principal, começou a recuperação da fixação de N₂ que se igualou à condição de pré-inundação após o 10º dia de inundação.

Os teores de ALA, aminoácido indicador de anaerobiose, e aminoácidos livres totais (Tabela 2) na seiva do xilema também estão relacionados com o percentual de aerênquima na raiz principal. O teor de ALA diminuiu com o aumento do aerênquima, entretanto não atingiu o mesmo valor da condição de pré-inundação após o 10º dia de inundação. Já o teor de aminoácidos livres totais começou a se recuperar com o desenvolvimento do aerênquima e atingiu o mesmo teor da condição de pré-inundação após o 10º dia de inundação.

Os resultados demonstram que no 10º dia de inundação as plantas de soja com sistemas radiculares inundados a partir do florescimento reverteram o processo de deficiência de O_2 e recuperaram a fixação simbiótica de N_2 . A recuperação mais rápida das plantas inundadas a partir do florescimento, quando comparadas às inundadas no estágio V6-7, pode ter ocorrido em função da maior quantidade de reservas de amido nas raízes para manter a glicólise e o metabolismo durante o estresse, tendo em vista que essas reservas são consideradas de fácil mobilização durante a inundação (Drew, 1977; Perata *et al.*, 1992). Além do que, a quantidade de amido nas raízes diminui marcadamente nos primeiros dias de inundação, aumentando os teores de glicose e frutose (Liao & Lin, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2001) trabalhando com plantas de soja, não inoculadas e inundadas com solução nutritiva acrescida de NO_3^- .

4.4. Composição de aminoácidos na seiva do xilema, fixação simbiótica de N_2 e parâmetros de desenvolvimento nas plantas de soja com sistemas radiculares inundados com solução nutritiva com diferentes fontes de N

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da inundação dos sistemas radiculares de plantas de soja, a partir do estágio V6-7, com solução nutritiva com diferentes fontes de N (sem N e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3) sobre a composição de aminoácidos na seiva do xilema, fixação de N_2 e parâmetros de desenvolvimento das plantas (estatura, área foliar, matéria seca e N total). A inundação sem N foi feita de forma semelhante à do experimento descrito no item 4.3.1. As avaliações na seiva do xilema foram feitas nos primeiros 5 dias de inundação, período em que se manifestaram as adaptações metabólicas ao estresse (Figuras 7 e 8) e no 14º e 21º dias de inundação, para verificar o efeito prolongado dos tratamentos, quando ocorre a reversão do processo de deficiência de O_2 no

sistema radicular e recuperação da fixação de N_2 em função das modificações morfológicas (desenvolvimento de aerênquima e raízes adventícias).

4.4.1. Composição de aminoácidos na seiva do xilema e fixação simbiótica de N_2

A composição dos principais aminoácidos (ALA, ASP, ASN, GLN, GABA e SER) na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados durante 21 dias, com solução nutritiva com NH_4^+ , NO_3^- , NH_4NO_3 e sem N é apresentada na Figura 9.

Independentemente da fonte de N, a ALA foi o aminoácido que ocorreu em maior proporção na seiva do xilema nos 3 primeiros dias de inundação do sistema radicular (Figura 9). Entretanto, quando a fonte de N foi NH_4^+ ou NH_4NO_3 esse período aumentou para 5 dias e o teor de ALA ficou entre 55-70% para inundação com solução contendo NH_4^+ e entre 40-50% para solução com NH_4NO_3 , além do que o teor se manteve mais elevado no 14º dia de inundação nesses tratamentos quando comparados à inundação com solução contendo NO_3^- como fonte de N e SN. Como o teor de ALA no xilema é reflexo da sua formação na raiz (Sousa & Sodek, 2003). Fica demonstrado que o aumento na síntese de ALA na raiz em condições de deficiência de O_2 no sistema radicular é estimulado pela disponibilidade de NO_3^- e principalmente NH_4^+ no meio externo. Esta estratégia permite à célula manter um fluxo maior de carbono para síntese de alanina com produção maior de ATP e NADH, no balanço da glicólise, exatamente para suprir a demanda desses cofatores na assimilação de NH_4^+ . Como resultado, a síntese de ALA permite manter a assimilação de NH_4^+ em anaerobiose, enquanto mantém os balanços de energia e redox. Nessas condições, as células mantêm

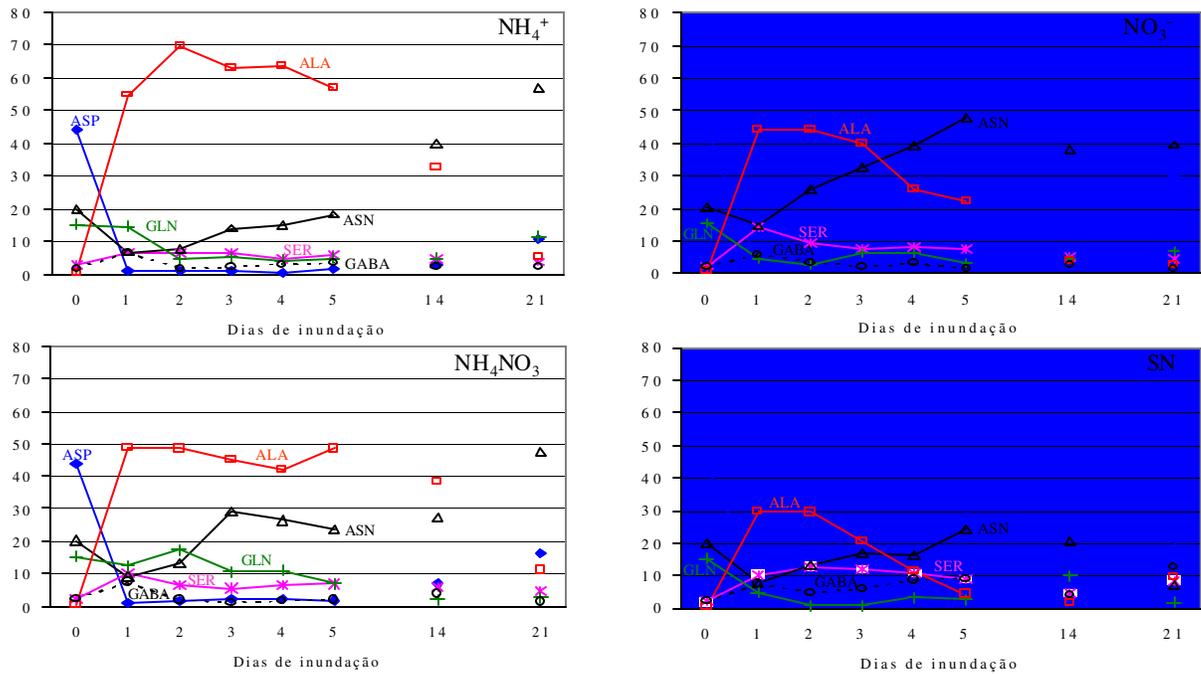


Figura 9. Composi o dos principais aminoácidos (aa) na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados durante 21 dias com soluço nutritiva com NH_4^+ , NO_3^- , NH_4NO_3 e sem N (SN), a partir do est dio V6-7.

alguma atividade oxidativa no ciclo de Krebs para suprir 2-oxoglutarato para produção de GLU (Vanlerberghe & Turpin, 1990; Vanlerberghe *et al.*, 1991). Mesmo quando a inundação foi com solução contendo NO_3^- , a ALA atingiu 43% da composição da seiva do xilema e 30% quando dependente da fixação simbiótica de N_2 (sem N mineral). Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Puiatti & Sodek (1999), Sousa (2001) e Amarante (2002). Entretanto, convém salientar que como a fixação de N_2 é inibida nos primeiros 5 dias de inundação, o N para síntese de ALA provavelmente vem de outros aminoácidos das raízes e/ou de aminoácidos via floema. Apesar da importância da síntese de ALA durante a hipoxia das plantas de soja, pouco é conhecido sobre seu papel metabólico, visto que sua síntese a partir do piruvato não regenera NAD^+ . Porém o fato de não causar toxidez à célula e contribuir na regulação do pH celular já lhe confere importantes propriedades na tolerância à hipoxia (Reggiani *et al.*, 1988; Sousa & Sodek, 2002). A diminuição acentuada do teor de ALA na seiva do xilema em todos tratamentos, do 5° ao 14° dia de inundação e desse para o 21° dia, reforçam a hipótese de que a planta de soja consegue reverter o processo de deficiência de O_2 no sistema radicular por meio de modificações morfológicas (aerênquima e raízes adventícias).

O teor de ASN na seiva do xilema também foi fortemente influenciado pela fonte de N durante a inundação do sistema radicular. A inundação com solução contendo NO_3^- , além de proporcionar um aumento menor no teor de ALA na seiva do xilema quando comparada com aquela contendo NH_4^+ , fez com que o teor de ASN diminuísse muito pouco após 1 dia de inundação (de 20 para 15%), com aumento progressivo até o 5° dia de inundação, quando atingiu 48% (Figura 9), proporção essa similar à encontrada em plantas de soja com fixação simbiótica efetiva de N_2 (Puiatti & Sodek, 1999; Amarante, 2002); sendo que a ASN constitui um dos produtos primários da assimilação de NO_3^- , pois a asparagina sintetase atua em seqüência ao sistema glutamina sintetase/glutamato sintase (Lima, 2002). De modo geral,

observa-se uma relação inversa entre ALA e ASN ou ALA e ASN+ASP, o que vem de encontro à hipótese de que o ASP (ou ASN via ASP) é precursor da ALA (Sousa e Sodek, 2003). A inundação com solução contendo NH_4NO_3 apresentou valores intermediários de ASN em relação aos demais tratamentos. Já, nos tratamentos com NH_4^+ como fonte de N e sem N (dependente da fixação simbiótica de N_2), o teor de ASN diminuiu de 20 para 10% após 1 dia de inundação, com recuperação progressiva até atingir novamente 20% no 5º dia de inundação. Em todos os tratamentos o teor de ASN foi próximo ou aumentou do 5º para o 14º dia de inundação, e do 14º para o 21º dia de inundação, exceto no tratamento sem N, onde houve uma redução. Os resultados demonstram que mesmo em hipoxia o suprimento de NO_3^- nos 5 dias de inundação e as modificações morfológicas (aerênquima e raízes adventícias) após 14 dias de inundação, nos demais tratamentos, favoreceram a síntese de ASN. Fica descartada a hipótese proposta por Liesack *et al.*, (2000) de que devido à presença de aerênquima interligando os sistemas aéreo e radicular de espécies tolerantes à hipoxia, haveria uma pequena interface na rizosfera onde predomina NO_3^- , mesmo em solos alagados onde predomina NH_4^+ , tendo em vista que não se encontrou NO_3^- na seiva do xilema (dados não mostrados) das plantas de soja com sistemas radiculares inundados com NH_4^+ . Isso evidencia que a síntese de ASN está relacionada com a disponibilidade de O_2 para o metabolismo do sistema radicular das plantas de soja sob hipoxia.

Os teores de ASP, GABA e SER foram baixos e apresentaram comportamento similar em todos os tratamentos (Figura 9). Já, o teor de GLN (Figura 9) diminuiu pouco nos primeiros 4 dias de inundação com NH_4NO_3 , passando de 16% para 10%. Entretanto sua origem não é a fixação simbiótica, tendo em vista que o teor de ureídeos (Tabela 3) na seiva do xilema foi baixo nesse período. Provavelmente, a presença de NH_4^+ no meio provoca

Tabela 3. Ureídeos na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5 dias, com solução nutritiva sem N (SN) e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7, e em plantas com sistemas radiculares não inundados (NI).

Tratamentos	Dia(s)				
	1	2	3	4	5
 ? mol/mL				
NI	3,0 a ^{1/}	3,1 a	2,3 a	1,9 a	2,3 a
SN	0,1 b	0,1 b	0,1 b	0,6 b	0,6 b
NO_3^-	0,1 b	0,1 b	0,2 b	0,2 c	0,1 c
NH_4^+	0,1 b	0,1 b	0,1 b	0,1 c	0,1 c
NH_4NO_3	0,1 b	0,1 b	0,1 b	0,1 c	0,1 c

^{1/} Médias com letras distintas na coluna difere m entre si pelo teste de Duncan (P ? 0,05).

a assimilação em GLN pela glutamina sintetase (mecanismo para evitar acúmulo de NH_4^+ na célula) e, por motivo desconhecido, a eficiência para transferir este N da GLN à ALA seja menor quando o NO_3^- também está presente.

Os teores de ureídeos na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5 dias com solução nutritiva sem N e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 e plantas não inundadas são apresentados na Tabela 3. Os teores de ureídeos na seiva do xilema caíram para valores mínimos nos 3 primeiros dias de inundação, independentemente da fonte de N. No 4° e 5° dias já começou a recuperação da fixação simbiótica de N_2 nas plantas inundadas sem N,

enquanto os tratamentos com N suprimiram a fixação simbiótica, provavelmente devido ao efeito interativo da inundação com o efeito inibitório do N sobre a atividade do nódulo.

Os teores de aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5 dias com solução nutritiva sem N e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 e plantas não inundadas são apresentados na Tabela 4. Os teores de ALT na seiva do xilema foram maiores nos 5 primeiros dias de inundação nas plantas com sistemas radiculares inundados com solução contendo NH_4^+ . Nas plantas com sistemas radiculares inundados com NO_3NH_4 e NO_3^- os teores de ALT foram similares na maioria dos dias de inundação. Já nas plantas com sistemas radiculares inundados com solução contendo NO_3^- os teores de ALT foram superiores na maioria dos dias de inundação aos teores das plantas com sistemas radiculares inundados com solução sem N e plantas não inundadas. Entre esses últimos tratamentos não houve diferença nos teores de ALT nos 5 dias de inundação. Os resultados demonstram a maior quantidade de ALT na seiva do xilema das plantas com sistemas radiculares inundados com NH_4^+ e isso provavelmente aconteceu porque a absorção de NH_4^+ pelas raízes das plantas ocorre de forma passiva, difusão através de canais, para altas concentrações externas de NH_4^+ e de forma ativa, através de transportadores, para baixas concentrações externas (Williams & Miller, 2001). Já, a absorção de NO_3^- ocorre somente de forma ativa sendo mais afetada pela baixa disponibilidade de energia em condições de deficiência de O_2 no sistema radicular inundado. Além do que, a assimilação de NH_4^+ ocorre nas raízes, via glutamina sintetase, cujo Km para NH_4^+ é muito baixo (Lea & Ireland, 1999). Por outro lado, a assimilação de NO_3^- pode ocorrer tanto nas raízes como na parte aérea (Williams & Miller, 2001) e na soja cerca de 30% do NO_3^- é assimilado nas raízes (Crafts-Brandner & Harper, 1982). Isso justifica a maior quantidade de ALT encontrada na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados com solução nutritiva com

Tabela 4 Aminoácidos livres totais na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5 dias com solução nutritiva sem N (SN) e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7, e em plantas com sistemas radiculares não inundados (NI).

Trata- mentos	Dia(s)				
	1	2	3	4	5
 ? mol/mL				
NI	1,4 c ^{1/}	1,6 c	0,9 c	1,2 c	1,2 c
SN	1,4 c	1,4 c	1,0 c	0,9 c	0,6 c
NO_3^-	1,9 c	3,2 bc	5,5 b	2,9 b	3,8 b
NH_4^+	6,6 a	7,6 a	7,8 a	5,4 a	6,1 a
NH_4NO_3	4,2 b	4,6 b	6,9 ab	4,8 a	4,7 b

^{1/} Médias com letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P ? 0,05)

NH_4^+ , em comparação com as plantas cujos sistemas radiculares foram inundados com solução nutritiva com NO_3^- .

Mais discussão envolvendo os efeitos das fontes de N sobre a quantidade de ALT e ureídeos na seiva do xilema, incluindo os períodos de 14 e 21 dias de inundação, será abordada no item 4.4.2.

4.4.2. Parâmetros de desenvolvimento nas plantas de soja

As avalia es a seguir foram uma consequência do estudo da composi o de aminoácidos na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados com

soluções contendo diferentes fontes de N em ensaios preliminares, tendo em vista que nas plantas com sistemas radiculares inundados com solução nutritiva com NH_4^+ foram observados maiores teores de ALT na seiva do xilema, porém menor desenvolvimento das plantas a partir do 5º dia de inundação, quando comparadas com plantas cujos sistemas radiculares foram inundados com solução nutritiva com NO_3^- .

A estatura e a área foliar de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5, 14 e 21 dias com solução nutritiva sem N e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7, e de plantas com sistemas radiculares não inundados são apresentadas na Tabela 5.

A estatura das plantas (Tabela 5) com sistemas radiculares inundados com solução contendo NO_3^- não diferiu da estatura das plantas com sistemas radiculares não inundados, aos 5, 14 e 21 dias de inundação, sendo superior aos demais tratamentos inundados com adição de N mineral. Já, a estatura das plantas com sistemas radiculares inundados com solução contendo NH_4^+ foi a menor entre todos os tratamentos e mesmo a presença de NH_4^+ na mistura NH_4NO_3 foi suficiente para reduzir a estatura das plantas, quando comparadas com as plantas com sistemas radiculares não inundados ou inundados com NO_3^- . O suprimento de NH_4^+ durante 21 dias de inundação do sistema radicular reduziu a estatura das plantas, em relação ao controle não inundado, da mesma forma que a ausência de N mineral durante a inundação. A presença de NO_3^- na solução nutritiva durante a inundação dos sistemas radiculares das plantas fez com que a área foliar (Tabela 5) das plantas equivalesse à das plantas com sistemas radiculares não inundados, aos 5, 14 e 21 dias de inundação. As inundações dos sistemas radiculares com soluções com NH_4^+ e sem N proporcionaram as menores áreas foliares das plantas nos 3 períodos de inundação. Já, a inundação dos sistemas radiculares com solução contendo NH_4NO_3 afetou menos a área foliar das plantas após 21 dias de inundação que a inundação com solução contendo NH_4^+ .

Tabela 5. Estatura e área foliar na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5, 14 e 21 dias com solução nutritiva sem N (SN) e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7 e em plantas com sistemas radiculares não inundados (NI).

Tratamentos	Estatura (cm)			Área foliar ($\text{cm}^2/\text{planta}$)		
	5 dias	14 dias	21 dias	5 dias	14 dias	21 dias
NI	62,0 ab ^{1/}	77,3 a	96,6 a	1334 a	2199 a	3220 a
SN	65,0 a	77,0 a	81,0 c	1132 b	1642 bc	1581 c
NO_3^-	63,0 a	77,3 a	92,6 a	1307 a	2012 ab	3001 a
NH_4^+	55,3 c	66,6 b	77,3 c	1219 ab	1458 c	1689 c
NH_4NO_3	57,0 bc	68,6 b	87,0 b	1198 b	1640 bc	2504 b

^{1/} Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ($P \leq 0,05$).

A matéria seca da parte aérea, das raízes e total das plantas é apresentada na Tabela 6.

A matéria seca total (Tabela 6) das plantas não diferiu entre os tratamentos após 5 dias de inundação, entretanto, a partir do 14º dia as plantas com sistemas radiculares inundados com solução com NH_4^+ apresentaram menor matéria seca, sendo que esse efeito se acentuou mais no 21º dia de inundação. A inundação com solução contendo NH_4^+ restringiu o desenvolvimento das raízes antes (14º dia de inundação) que da parte aérea (21º dia de inundação). O acúmulo de matéria seca nas plantas com sistemas radiculares inundados sem suprimento de N mineral foi similar ao das plantas com inundação com solução contendo NH_4^+ (Tabela 6). A presença de NO_3^- na solução nutritiva, sozinho ou na mistura

Tabela 6. Matéria seca (MS) na parte aérea, raízes e total de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5, 14 e 21 dias com solução nutritiva sem N (SN) e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7, e em plantas não inundadas (NI).

Trata- mentos	MS na Parte Aérea (g/planta)			MS nas Raízes (g/planta)			MS Total (g/planta)		
	5 dias	14 dias	21 dias	5 dias	14 dias	21 dias	5 dias	14 dias	21 dias
NI	5,1 b ^{1/}	10,9 a	14,9 a	1,0 a	2,8 a	3,4 a	6,1 a	13,7 a	18,3 a
SN	5,3 ab	10,1 a	10,4 b	0,8 a	1,7 b	1,3 b	6,1 a	11,8 ab	11,7 b
NO_3^-	6,1 a	11,4 a	15,4 a	0,9 a	2,6 a	4,2 a	7,0 a	14,0 a	19,6 a
NH_4^+	5,6 ab	9,4 a	9,8 b	0,9 a	1,2 b	1,7 b	6,4 a	10,6 b	11,5 b
NH_4NO_3	5,3 ab	9,9 a	13,6 a	0,9 a	1,6 b	4,6 a	6,2 a	11,5 ab	18,2 a

^{1/} Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P ? 0,05).

NH_4NO_3 , durante a inundação dos sistemas radiculares das plantas, foi benéfica em termos de acúmulo de matéria seca das plantas, visto que estas também não diferiram das plantas com sistemas radiculares não inundados, aos 14 e 21 dias de inundação. A presença de NO_3^- sozinho na solução de inundação estimulou o desenvolvimento radicular das plantas no 14° e 21° dias de inundação, enquanto na mistura NH_4NO_3 o efeito foi observado no 21° dia de inundação (Tabela 6).

Os teores de aminoácidos livres totais e ureídeos na seiva do xilema são apresentados na Tabela 7.

Os teores de aminoácidos livres totais (ALT) na seiva do xilema das plantas com sistemas radiculares inundados com solução com NH_4^+ foram muito maiores que nos demais tratamentos no 5°, 14° e 21° dias de inundação. A inundação com solução com NO_3^- proporcionou teores de ALT entre 8 e 9 vezes menores que a inundação com solução com NH_4^+ no 14° e 21° dias de inundação, entretanto os teores não diferiram dos encontrados nas plantas cujos sistemas radiculares não estavam inundados (Tabela 7).

Os teores de ureídeos (Tabela 7) na seiva do xilema foram fortemente reduzidos pelos tratamentos inundados, independentemente do período de inundação. Até o 5° dia da inundação dos sistemas radiculares das plantas de soja com solução nutritiva com fontes de N mineral a queda dos ureídeos foi acentuada (refletindo numa maior inibição da fixação simbiótica de N_2). Já, a partir do 14° dia de inundação não houve diferença no teor de ureídeos entre as plantas inundadas com solução com NO_3^- e com NH_4^+ , sendo que esses tratamentos atingiram de 70-80% do teor de ureídeos na seiva do xilema das plantas com sistemas radiculares não inundados. As plantas com sistemas radiculares inundados sem N mineral

Tabela 7. Aminoácidos livres (ALT) e ureídeos na seiva do xilema de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5, 14 e 21 dias com solução nutritiva sem N (SN) e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7, e em plantas com sistemas radiculares não inundados (NI).

Tratamentos	ALT (? mol/mL)			Ureídeos (? mol/mL)		
	5 dias	14 dias	21 dias	5 dias	14 dias	21 dias
NI	1,2 c ^{1/}	1,3 c	0,7 b	2,3 a	2,7 a	3,0 a
SN	0,6 c	1,1 c	0,9 b	0,6 b	1,2 c	1,2 c
NO_3^-	3,8 b	1,4 c	2,2 b	0,1 c	2,0 b	2,3 b
NH_4^+	6,1 a	11,5 a	21,9 a	0,1 c	2,1 b	2,8 ab
NH_4NO_3	4,7 b	6,3 b	1,9 b	0,1 c	2,1 b	2,6 ab

^{1/} Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P ? 0,05).

atingiram 26% do teor de ureídeos das plantas não inundadas no 5° dia de inundação, 44% no 14° dia e 40% no 21° dia.

A quantidade total e percentual de N na parte aérea das plantas de soja é apresentadas na Tabela 8.

A quantidade de N total na parte aérea das plantas com sistemas radiculares inundados foi menor que nas plantas não inundadas em todos períodos de avaliação, reflexo da baixa atividade de fixação de N_2 nesta condição. Não houve diferença entre os tratamentos inundados com soluções com diferentes fontes de N no 5° e 14° dia de inundação. Entretanto,

Tabela 8. Quantidade total e percentual de N na parte aérea de plantas de soja com sistemas radiculares inundados por 5, 14 e 21 dias com solução nutritiva sem N (SN) e com NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3 , a partir do estágio V6-7, e em plantas não inundadas (NI).

Tratamentos	N na parte aérea (mg/planta)			%N na parte aérea		
	5 dias	14 dias	21 dias	5 dias	14 dias	21 dias
NI	149 a	296 a	453 a	2,9 a	2,7 a	3,0 a
SN	88 c	124 c	122 d	1,6 d	1,2 c	1,2 c
NO_3^-	132 ab	225 b	356 b	2,2 bc	2,0 b	2,3 b
NH_4^+	135 ab	200 b	277 c	2,4 b	2,1 b	2,8 ab
NH_4NO_3	124 b	204 b	351 b	2,3 bc	2,1 b	2,6 ab

^{1/} Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P ? 0,05).

no 21º dia de inundação, os tratamentos com NH_4NO_3 e NO_3^- foram superiores ao tratamento com NH_4^+ e essa diferença ocorreu pela menor produção de matéria seca na parte aérea (Tabela 6) do tratamento com NH_4^+ , tendo em vista que não ocorreu diferença no teor de N no tecido (Tabela 8). A inundação dos sistemas radiculares das plantas sem suplementação de N mineral diminuiu drasticamente a quantidade de N na parte aérea das plantas. Isso ocorreu tanto pela menor produção de matéria seca na parte aérea (Tabela 6) como pelo menor teor de N no tecido (Tabela 8).

O pH das soluções nutritivas com diferentes fontes de N não foi um fator determinante para as diferenças entre os tratamentos. Foi de aproximadamente 6,8 na solução sem N, 6,8 na solução com NH_4NO_3 , 7,2 na solução com NO_3^- e 6,4 na solução com NH_4^+ ,

independentemente do período de inundação ter sido de 5, 14 ou 21 dias. Isso demonstra que o NH_4^+ não acidificou o pH da solução e mesmo assim houve efeito tóxico. Observações semelhantes são citadas por Wirén *et al.* (2000) e Britto *et al.* (2001).

Não houve acúmulo de NO_3^- e/ou NH_4^+ nas soluções nutritivas dos vasos, mesmo com complementação diária das soluções com 5 mM de N e, após 21 dias de inundação, encontrou-se de 1,5 a 2,0 mM de NO_3^- no tratamento inundado com solução com NO_3^- , 1,5 mM de NH_4^+ no tratamento inundado com solução com NH_4^+ , ? 1 mM de NH_4^+ e 1,5 mM de NO_3^- no tratamento inundado com solução com NH_4NO_3 .

A presença de NH_4^+ na mistura NH_4NO_3 , na inundação dos sistemas radiculares das plantas de soja, não diminuiu a matéria seca total (Tabela 6) das plantas após 5, 14 ou 21 dias de inundação, mas reduziu a estatura e a área foliar (Tabela 5) nos três períodos de avaliação, em relação aos tratamentos não inundado e inundado com NO_3^- . Isso demonstra que a inundação, mesmo na presença de NO_3^- , o NH_4^+ afeta o desenvolvimento das plantas de soja. Dessa forma fica excluída a hipótese proposta por Wirén *et al.* (2000) de que a toxidez do NH_4^+ estaria relacionada à ausência do NO_3^- devido ao fato desse íon ser essencial para a translocação de cátions no xilema e um sinalizador que induz a expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de N, metabolismo de ácidos orgânicos e síntese de amido.

A inundação com solução com NH_4^+ aumentou a quantidade de aminoácidos livres totais na seiva do xilema aos 5, 14 e 21 dias de inundação (Tabela 7). Isso deve ter acontecido porque a absorção de NH_4^+ pelas raízes das plantas ocorre de forma passiva e a de NO_3^- de forma ativa (Williams & Miller, 2001), conforme já foi salientado no item 4.4.1. Além do que, a assimilação de NH_4^+ ocorre nas raízes, via glutamina sintetase. De fato, plantas de soja não inoculadas, nutridas com NH_4^+ , também apresentam elevados teores de aminoácidos livres no xilema com a presença marcante de GLN (Sodek, dados não publicados), produto da

assimilação de NH_4^+ . Nas plantas inundadas estudadas aqui, o teor de GLN na seiva do xilema (Figura 9) não foi muito elevado no tratamento com NH_4^+ . Isto pode ser explicado pela utilização do N da GLN (formada a partir da assimilação de NH_4^+) na síntese de ALA. Desta forma, o N da GLN é transferido para GLU, pela enzima glutamato sintase e em seguida de GLU para ALA pela enzima alanina aminotransferase.

Por outro lado, o elevado teor de aminoácidos (Tabela 7) translocados para a parte aérea no tratamento com NH_4^+ não trouxe nenhum benefício aparente e pode estar relacionado com sua menor utilização pela planta, tendo em vista que ocorreu uma restrição no desenvolvimento das mesmas (Tabelas 5 e 6). De acordo com Wirén *et al.* (2000) e Forde (2002), a nutrição exclusiva com NH_4^+ diminui o tamanho das folhas novas, que apresentam poucas células. Essas mudanças coincidem com uma forte diminuição de citocinina na seiva do xilema. Também ocorre aumento na concentração de ácido abscísico na seiva do xilema, hormônio esse que contribui potencialmente com o crescimento fenotípico raquítico. Entretanto, apesar de haver o efeito tóxico da presença de NH_4^+ ao desenvolvimento das plantas sob hipoxia ou não, muitas hipóteses têm sido formuladas para explicar esse efeito, mas nenhuma é considerada satisfatória (Wirén *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001).

À medida que o período de inundação se prolongou para 14 e 21 dias não houve diferença entre o tratamento inundado com NO_3^- e o não inundado para estatura, área foliar (Tabela 5), matéria seca total e matéria seca das raízes (Tabela 6), demonstrando que a presença de NO_3^- aliviou os efeitos da deficiência de O_2 no sistema radicular das plantas de soja. Tais resultados vem de encontro com os da literatura, pois é conhecido que a presença de NO_3^- no meio aumenta a tolerância do sistema radicular à inundação (Malavolta, 1954; Trought & Drew, 1981; Prioul & Guyot, 1985, Bacanamwo & Purcell 1999a,b). Entretanto, a

quantidade total de N na parte aérea (Tabela 8) foi maior nas plantas com sistemas radiculares não inundados do que inundados com soluções com NO_3^- e com NH_4NO_3 .

O efeito da inundação dos sistemas radiculares das plantas exclusivamente com solução com NO_3^- são evidentes nos resultados obtidos, porém pouco sabe-se sobre os mecanismos fisiológicos envolvendo o NO_3^- para aliviar a hipoxia no sistema radicular das plantas.

A redução de NO_3^- a NH_4^+ consome quatro NAD(P)H (8 elétrons) e oito prótons por ciclo de reação, que é muito mais eficiente na regeneração de NAD^+ e no consumo de prótons que outras reações de fermentação conhecidas, incluindo a produção de etanol. Se suficientemente ativo, o metabolismo anaeróbico do NO_3^- pode facilitar a produção de energia e aliviar a acidez citoplasmática (Salsac *et al.*, 1987; Fan *et al.*, 1997). Entretanto, os dados da literatura dão pouco apoio a esta hipótese de que a redução de NO_3^- possa funcionar como um dreno alternativo para elétrons, exceto para plantas de arroz. Em plantas de arroz, o NO_3^- reduziu a produção de etanol (Fan *et al.*, 1987), exatamente o esperado pela hipótese. Porém, em raízes destacadas de outros cereais (Lee, 1978; Reggiani *et al.*, 1985) mais etanol foi produzido em condições anaeróbicas na presença de NO_3^- .

A atividade da redutase de nitrato (NR) aumenta em tecidos vegetais sob deficiência de O_2 , levando a um grande acúmulo de nitrito (NO_2^-) e sua excreção pelas raízes (Lee, 1979). Entretanto, a finalidade fisiológica do acúmulo de NO_2^- é desconhecida. A produção de ácido nítrico fraco e sua excreção quando não dissociado, pode ajudar a estabilizar o pH citosólico. Alternativamente, a redução de NO_3^- pode diminuir a taxa de fermentação etanólica ou láctica. O ácido láctico, especialmente, pode ser tóxico visto que ele não é tão facilmente excretado como o etanol e o ácido nítrico (Kaiser & Huber, 2001). Entretanto, a diminuição da taxa de

fermentação etanólica devido a redução de NO_3^- , por enquanto, só está comprovada em arroz (Sousa & Sodek, 2002).

A redutase de NO_3^- pode catalisar a transferência de um elétron do NAD(P)H para o nitrito para produzir óxido nítrico (NO). Composto esse que pode estar envolvido na sinalização molecular do controle do crescimento, diferenciação e senescência em plantas (Kaiser *et al.*, 2002). Durante a hipoxia, o etileno está envolvido na indução “tardia” (24-28 h após o início da hipoxia) da álcool desidrogenase, mas algum sinalizador é o precursor da indução (Peng *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que óxido nítrico pode agir como um sinalizador em condições de anoxia (Magalhães *et al.*, 2002), porém ainda não se sabe o quanto a redutase de NO_3^- contribui para este processo.

Os resultados obtidos demonstram que a planta de soja nodulada possui a capacidade de se adaptar ao excesso de umidade no sistema radicular, inclusive fixar N_2 , e que isto ocorre devido a modificações morfológicas e metabólicas nos órgãos submersos. O estágio de desenvolvimento da planta tem influência no processo de reversão da hipoxia, pois quanto maior a quantidade de reservas nas raízes, mais rapidamente ela supera o estresse anaeróbico. Entretanto, a presença de NH_4^+ (forma de N que predomina em solos hidromórficos) durante a inundação prolongada (2 semanas ou mais) dos sistemas radiculares, prejudica o desenvolvimento das plantas. Mesmo com esse entrave, existe a perspectiva de se selecionar genótipos de soja que apresentem rendimentos de grãos satisfatórios quando cultivados em solos hidromórficos.

5. CONCLUSÕES

A planta de soja com sistema radicular inundado desenvolve aerênquima no segmento de caule submerso, nas raízes adventícias que surgem no caule submerso, na raiz principal, nas raízes laterais e nos nódulos. No segmento do caule submerso, na raiz principal e raízes laterais a origem do aerênquima é no periciclo. Nas raízes adventícias ocorrem aerênquima esquizógeno e lisígeno no córtex durante a primeira semana de inundação e após duas semanas de inundação ocorre o desenvolvimento de aerênquima a partir do periciclo. Nos nódulos a origem do aerênquima é o felogênio.

Na planta de soja com sistema radicular inundado as interconexões de aerênquima nos órgãos submersos da planta fazem com que após duas semanas de inundação a planta reverta o processo de deficiência de O_2 no sistema radicular e recupere a fixação simbiótica de N_2 . Entretanto, a planta tem seu desenvolvimento reduzido e apresenta-se clorótica.

O suprimento de NO_3^- durante a inundação do sistema radicular da planta de soja faz com ela apresente desenvolvimento similar ao da planta com sistema radicular não inundado. Entretanto, a presença de NH_4^+ durante a inundação reduz drasticamente o desenvolvimento da planta, mas a presença de NO_3^- na proporção de 1:1 na solução nutritiva praticamente elimina o efeito tóxico do NH_4^+ à planta de soja com sistema radicular inundado.

6. LITERATURA CITADA

- Amarante, L. do. 2002. Transporte e metabolismo de glutamina em soja [*Glycine max* (L.)]: uma relação estreita com a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado. 159p.
- Armstrong, W., Brändle, R. & Jackson, M.B., 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 43:307-358.
- Bacanamwo, M. & Purcell, L.C., 1999a. Soybean root morphological and anatomical traits associated with acclimation to flooding. *Crop Sci.* 39:143-149.
- Bacanamwo, M. & Purcell, L.C., 1999b. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *J. Exp. Bot.* 50:689-696.
- Botrel, A., Magé, C. & Kaiser, W.M., 1996. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *P.P. Bioch.* 34:645-652.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M. & Kronzucker, H.J., 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4255-4258.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. & Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Soil Sci. Plant Anal. Comm.* 6:71-80.
- Costa, J.A. & Marchezan, E., 1982. Características dos estádios de desenvolvimento da soja. Fundação Cargill, Campinas, 32p.
- Costa, J.A., 1996. Cultura da soja. Porto Alegre: I. Manica & J.A. Costa (eds.). 233p.
- Crafts-Brandner, S.J. & Harper, J.E., 1982. Nitrate reduction by roots of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) seedlings. *Plant Physiol.* 69:1298-1303.

- Dakora, F.D. & Atkins, C.A., 1989. Diffusion of oxygen in relation to structure and function in legume root nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 16:131-140.
- Dennis, E.S., Millar, A., Dolferus, R., Olive, M., Bruxelles, G. de & Peacock, W.J., 1992. Molecular analysis of the response to anaerobics stress. In: *Adaptation of food crops to temperature and water stress: Proceedings of an International Symposium, Taiwan, 13-18 august 1992.* Asian Vegetable Research and Development Center, publication n.93.410, pp.59-67.
- Dey, P.M. & Harborne, J.B., 1997. *Plant Biochemistry.* Academic Press, London, 554p.
- Drew, M.C., 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:223-250.
- Drew, M.C., He, C., & Morgan, P.W. 2000. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci.* 5:123-127.
- Evans, L.T., 1996. *Crop evolution, adaptation and yield.* Cambridge, University Press, 500p.
- Fan, T.W.M., Higashi, R.M., Frenkiel, T.A. & Lane, A. N., 1997. Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. *J. Exp. Bot.* 48:1655-1666.
- Felker, P., 1977. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal. Chem.* 49:1080.
- Forde, B.G., 2002. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:219-235.
- Gerrits, P.O., 1991. *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles.* Department of Anatomy and Embryology, State University. Netherlands, 80p.

- Gibberd, M.R., Gray, J.D., Cocks, P.S. & Colmer, T.D., 2001. Waterlogging tolerance among a diverse range of trifolium accessions is related to root porosity, lateral root formation and 'aerotropic rooting'. *Ann. Bot.* 88:579-589.
- Glaab, J. & Kaiser, W.M., 1993. Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots. *Planta* 191:173-179.
- Guash, L.M., Felipe, M.R. & Fernández-Pascual, M., 2001. Effects of different O₂ concentrations on nitrogenase activity, respiration, and O₂ diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. *J. Plant Physiol.* 158:1395-1402.
- Hiscox, J.D. & Israelstam, G.F., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Bull., Circular* 347.
- Howitt, S.M. & Udvardi, M.K., 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:152-170.
- Hsu, Y., Tseng, M. & Lin, C., 1999. The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40:193-198.
- IRGA. 2001. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. IRGA, Porto Alegre-RS, 2001. 128p.
- Jackson, M.B. & Armstrong, W., 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biol.* 1:274-287.
- Jarret, H.W., Cooksy, K.D., Ellis, B. & Anderson, J.M., 1986. The separation of ophthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. *Anal. Biochem.* 153:189-198.

- Jensen, C.R., Luxmoore, R.J., Van Gundy, S.D. & Stolzy, L.H., 1969. Root air space measurements by a pycnometer method. *Agron J.* 61:474-475.
- Jones, A.M., 2001. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.* 125:94-97.
- Justin, S.F.W. & Armstrong, W., 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytol.* 106:465-495.
- Kaiser, M.W. & Huber, S.C., 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52:1981-1989.
- Kaiser, M.W.; Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C., Rockel, P., Sono, M. & Planchet, E., 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J. Exp. Bot.* 53:875-882.
- Kawase, M. & Whitmoyer, R.E., 1980. Aerenchyma development in waterlogged plants. *Amer. J. Bot.* 67:18-22.
- Kennedy, R.A., Rumpho, M.E. & Fox, T.C., 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* 100:1-6.
- Kronzucker, H.J., Britto, D.T., Davenport, R.J., & Tester, M., 2001. Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Sci.* 6:335-337.
- Kronzucker, H.J., Kirk, G.J.D.; Siddiqi, M.Y. & Glass, A.D.M., 1998. Effects of hypoxia on $^{13}\text{NH}_4^+$ fluxes in rice roots. *Plant Physiol.* 116:581-587.
- Lea, J.P. & Ireland, R.J., 1999. Nitrogen metabolism in higher plant. IN: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology* (Singh, B.K., ed.) Marcel Dekker, New York, pp.1-47.
- Lea, P.J. & Fowden, L., 1975. The purification and properties of glutamine-dependent asparagine isolated from *Lupinus albus*. *Proc. Royal Society of London Series B.* 192:13-26.

- Lee, R.B., 1978. Inorganic nitrogen metabolism in barley roots under poorly aerated conditions. *J. Exp. Bot.* 29:693-708.
- Lee, R.B., 1979. The release of nitrate from barley roots in response to metabolic inhibitors, uncoupling agents and anoxia. *J. Exp. Bot.* 30:119-133.
- Liao, C. & Lin, C., 2001. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proc. Natl. Sci. Counc.* 25:148-157.
- Liesack, W., Schnell, S. & Revsbech, N.P., 2000. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:625-645.
- Lima, J.D., 2002. Transporte de nitrogênio e metabolismo da asparagina em soja (*Glycine max* L.) sob deficiência na assimilação do nitrogênio. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado. 171p.
- Linkemer, G., Board, J.E. & Musgrave, M.E. 1998. Waterlogging effects on growth and yield components in late-planted soybean. *Crop Sci.* 38:1576-1584.
- Loureiro, M.F., James, E.K. & Franco, A.A., 1988. Nitrogen fixation by legumes in flooded regions. In: *Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics* (F.R. Scarano and A.C. Franco, eds.), Series *Oecologia Brasiliensis*, vol. IV, PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil, pp.195-233.
- Loureiro, M.F., James, E.K., Sprent, J.I. & Franco, A.A., 1995. Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis*. *New Phytol.* 130:531-544.
- Magalhães, J.R., Silva, F.L.I.M., Salgado, I, Ferrarese-Filho, O., Rockel, P. & Kaiser, W.M., 2002. Nitric oxide and nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 8:11-17.
- Malavolta, E. 1954. Studies on the nitrogenous nutrition of rice. *Plant Physiol.* 29:98-99.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, 889p.

- McClure, P.R. & Israel, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- McClure, P.R., Israel, D.W. & Volk, R.J., 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- Minchin, F.R., 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29:881-888.
- Mitchell, H.T., 1972. Microdetermination of nitrogen in plants tissues. *J. Assoc.. Off. Agric. Chem.* 55:1-3.
- Morard, P. & Silvestre, J., 1996. Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: A review. *Plant Soil* 184:243-254.
- Nathanson, K.; Lawn, R.J., DeJabrun, P.L.M. & Byth, D.E., 1984. Growth, nodulation and nitrogen accumulation by soybean in saturated soil culture. *Field Crops Res.* 8:73-92.
- O'Brien, T.P., Feder, N. & McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59:368-373.
- Oosterhuis, D.M., Scott, H.D., Hampton, R.E. & Wullschleger, S.D., 1990. Physiological responses of two soybean [*Glycine max* (L.) Merr] cultivars to short-term flooding. *Environ. Exp. Bot.* 30:85-92.
- Pankhurst, C.E. & Sprent, J.I., 1975. Surface features of soybean nodules. *Protoplasma* 85:85-98.
- Parsons, R. & Day, D.A., 1990. Mechanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant, Cell Environ.* 13:501-512.
- Pauletto, E.A., Sousa, R.O. & Gomes, A.S., 1998. Caracterização e manejo de solos de várzea cultivados com arroz irrigado. In: Produção de arroz irrigado. Peske, S.T., Nedel, J.L., Barros, A.C.S.A. (eds.). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 1998. 659p.

- Peng, H., Chan, C., Shih, M. & Yang, S.F., 2001. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126:742-749.
- Perata, P., Pozueta-Romero, J., Akazawa, T. & Yamaguchi, J., 1992. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta* 188:611-618.
- Pires, J.L., Soprano, E. & Cassol, B., 2002. Adaptações morfo-fisiológicas da soja em solo inundado. *Pesq. agropec. bras.* 37:41-50.
- Prioul, J.L. & Guyot, C., 1985. Role of oxygen transport and nitrate metabolism in the adaptation of wheat plants to root anaerobiosis. *Physiol. Veg.* 23:175-185.
- Puiatti, M. & Sodek, L. 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 37:767-773.
- Reggiani, R., Brambilla, I. & Bertani, A., 1985. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots. II. Fermentation activity and adenylate energy charge. *J. Exp. Bot.* 36:1698-1704.
- Reggiani, R., 1999. Amino acid metabolism under oxygen deficiency. *Curr. Top. Phytochem.* 2:171-174.
- Reggiani, R., Cantú, C.A., Brambilla, I. & Bertani, A., 1988. Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. *Plant Cell Physiol.* 29:981-987.
- Reggiani, R., Nebuloni, M., Mattana, M. & Brambilla., 2000. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino Acids* 18:207-217.
- Ricard, B., Coueé, I., Raymond, P., Saglio, P.H., Saint-Ges, V. & Pradet, A., 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* 32:1-10.
- Sallam, A. & Scott, H.D., 1987. Effects of prolonged flooding on soybeans during early vegetative growth. *Soil Sci.* 144:61-66.

- Salsac, L., Sylvain, C., Morot-Gaudry, J-F., Lesaint, C. & Jolivet, E., 1987. Nitrate and ammonium in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25:805-812.
- Schussler, E.E. & Longstreth, D.J., 1996. Aerenchyma develops by cell lyses in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *Am. J. Bot.* 83:1266-1273.
- Schussler, E.E. & Longstreth, D.J., 2000. Changes in cell structure during the formation of root aerenchyma in *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae). *Am. J. Bot.* 87:12-19.
- Serraj, R., Fleurat-Lessard, P., Jaillard, B. & Drevon, J.J., 1995. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell Environ.* 18:455-462.
- Shelp, B.J.; Bown, A.W. & McLean, M.D. 1999. Metabolic and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4:446-452.
- Shi, L., Twary, S.N., Yoshioka, H., Gregerson, R.G., Miller, S.S., Sarnac, D.A., Gant, J.S., Unkefer, P.J & Vance, C.P., 1997. Nitrogen assimilation in alfafa: isolation and characterization asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *Plant Cell.* 9:1339-1356.
- Sodek, L. Dados não publicados.
- Sousa, C.A.F. de & Sodek, L. 2002. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Braz. J. Plant Physiol.* 14:83-94.
- Sousa, C.A.F. de & Sodek, L., 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *environ. Exp. Bot.* 50:1-8.

- Sousa, C.A.F. de, 2001. Metabolismo de nitrogênio em plantas de soja [Glycine max (L.) Merr. cv. IAC-17] submetidas à deficiência de O₂ no sistema radicular. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado. 102p.
- Sousa, S., Camargo, F.A.O. & Vahl, L.C., 2000. Solos Alagados. In: Fundamentos de química de solo. Meurer, E.J.(ed.). Gênese, Porto Alegre-RS, 2000. 174p.
- Tedesco, J.M., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H. & Wolkweiss, S.J., 1995. Análise de solo, planta e outros materiais. 2. ed. amp. UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil, 174p. (Boletim Técnico, 5).
- Thomas, A.L., Pires, J.L.F. & Menezes, V.G., 2000. Rendimento de grãos de cultivares de soja na várzea. Pesq. agropec. gaúcha 6:107-112.
- Thomson, C.J. & Greenway, H., 1991. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. Plant Physiol. 96:1294-1301.
- Touraine, B., Grignon, N. & Grignon, C., 1988. Charge balance in NO fed soybean. Estimation of K⁺ and carboxylate recirculation. Plant Physiol. 88:605-612.
- Trought, M. C. T. & Drew, M. C. 1981. Alleviation of injury to young wheat plants in anaerobic solution cultures in relation to the supply of nitrate and other inorganic nutrients. J. Exp. Bot. 32:509-522.
- Vanlerberghe, G.C. & Turpin, D.H., 1990. Anaerobic metabolism in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*: II. Assimilation of ammonium by anaerobiose cells. Plant Physiol. 94:1124-1130.
- Vanlerberghe, G.C., Joy, K.W. & Turpin, D.H., 1991. Anaerobic metabolism in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*: II. Alanine is the product of anaerobic ammonium assimilation. Plant Physiol. 95:655-658.

- VanToai, T.T.; Beuerlein, J.E.; Schmitthenner, A.F. & Martin, S.K.St., 1994. Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. *Crop Sci.* 34:1112-1115.
- Vogels, G.D. & Van Der Drift, C., 1970. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33:143-157.
- Williams, L.E. & Miller, A.J., 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:659-688.
- Wirén, N. von, Gazzarrini, S., Gojon, A. & Frommer, W.B., 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Op. Plant Physiol.* 3:254-261.