



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Luciana Nunes Menolli Lanza

Tolerância ao estresse por hipoxia em soja: os efeitos do nitrato.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luciana Nunes Menolli Lanza
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L297t Lanza, Luciana Nunes Menolli, 1981-
Tolerância ao estresse por hipóxia em soja: os
efeitos do nitrato / Luciana Nunes Menolli Lanza. –
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ladaslav Sodek.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Soja. 2. Nitratos. 3. Alagamento (Solos). 4.
Nitrato redutases. I. Sodek, Ladaslav, 1941-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Hypoxic stress tolerance in soybean: the effect of nitrate

Palavras-chave em Inglês:

Soybean

Nitrates

Waterlogging (Soils)

Nitrate reductases

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Ladaslav Sodek [Orientador]

Luciano Freschi

Altair Toledo Machado

Cláudia Regina Baptista Haddad

Marlene Aparecida Schiavinato

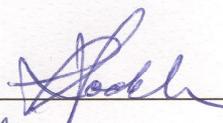
Data da defesa: 14-07-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

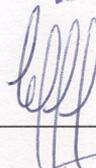
Campinas, 14 de julho de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador)



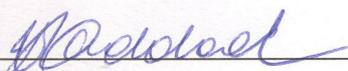
Prof. Dr. Luciano Freschi



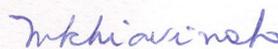
Dr. Altair Toledo Machado



Profa. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad



Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Profa. Dra. Ione Salgado

Profa. Dra. Nidia Majerowicz

**Ao meu amado marido Daniel,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas e ao seu Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas de estudo.

Ao professor Dr. Ladaslav Sodek, pela orientação, paciência e conhecimento.

Às professoras Cláudia Regina Baptista Haddad, Sandra Maria Carmello-Guerreiro e Marlene Aparecida Schiavinato, por todas as críticas e sugestões feitas a este trabalho durante a pré-banca.

Aos membros da banca pela participação e contribuições.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pelo apoio técnico e pela amizade.

A todos os colegas e amigos, pela ajuda, amizade e companheirismo.

Aos meus pais, João Antonio e Marisa e aos meus irmãos, Valéria e João Fernando pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus sogros Geraldo Carlos e Maria José e à minha cunhada Karina pelo amor e pelo incentivo.

Ao meu amado marido Daniel pelo amor incondicional, apoio e dedicação.

À Deus, pela possibilidade de mais uma conquista.

ÍNDICE

Abreviaturas	x
Resumo	xi
Summary	xiv
1. Introdução	1
1.1. Soja: origem e histórico no Brasil	1
1.2. A importância agronômica da soja.....	2
1.3. Deficiência do oxigênio no sistema radicular	3
1.4. Nitrato e o seu efeito benéfico sob hipoxia	5
1.5. O papel da Redutase do nitrato em condições de hipoxia.....	6
1.6. Justificativa do trabalho	8
2. Objetivos	10
3. Material e Métodos	11
3.1. Material vegetal e Condições de Cultivo.....	11
3.2. Obtenção, manutenção e multiplicação de inóculo	11
3.3. Soluções nutritivas.....	12
3.4. Tratamentos	13
3.4.1. Tratamentos em sistema hidropônico.....	13
3.4.1.1. Sistema hidropônico para material marcado com ¹⁵ N.....	14
3.4.2. Experimento com diferentes cultivares de soja: resposta ao nitrato em condições de alagamento	15
3.5. Métodos analíticos.....	16
3.5.1. Coleta da seiva do xilema.....	16

3.5.2. Extração de amostras vegetais para análises bioquímicas	16
3.5.3. Dosagem de nitrato	17
3.5.4. Dosagem de nitrito	17
3.5.5. Dosagem de aminoácidos solúveis totais	18
3.5.6. Separação e análise da composição de aminoácidos da raiz, seiva do xilema, nódulo e folhas por HPLC	18
3.5.7. Dosagem de proteínas solúveis totais	20
3.5.8. Dosagem de ureídeos totais.....	20
3.5.9. Extração e dosagem da enzima redutase do nitrato <i>in vivo</i>	21
3.5.10. Preparo das amostras e determinação isotópica de N por espectrometria de massa	22
3.5.11. Identificação em GC/MS de compostos marcados com ¹⁵ N	24
3.5.12. Medição da área foliar	26
3.5.13. Medição da massa seca da parte aérea e do sistema radicular	26
3.5.14. Medição do diâmetro do caule.....	27
3.5.15. Determinação do volume do sistema radicular	27
3.5.16. Análise Histológica	27
3.6. Análise Estatística	28
4. Resultados	29
4.1. Experimento I. Utilização de nitrato pelas plantas de soja não noduladas da cultivar IAC-23 em hidroponia e sob hipoxia.....	29
4.1.1. Nitrato e nitrito na solução do vaso em normoxia e hipoxia.....	30
4.1.2. Variações no conteúdo de nitrato nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas das plantas de soja em normoxia e hipoxia	30

4.1.3. Teor de aminoácidos solúveis totais e composição de aminoácidos livres nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas das plantas submetidas ou não à hipoxia	35
4.2. Experimento II. O nitrato e seu metabolismo nas plantas de soja não noduladas em condições de hipoxia.....	42
4.2.1. Consumo de nitrato e conteúdo de nitrito na solução do vaso	43
4.2.2. O conteúdo de nitrato nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas das plantas de soja.....	46
4.2.3. Teor de aminoácidos solúveis totais nas plantas de soja.....	48
4.2.4. Conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes e folhas das plantas de soja.....	52
4.3. Experimento III. O nitrato e seu metabolismo nas plantas de soja noduladas em condições de hipoxia	54
4.3.1. O nitrato na solução do vaso, nas raízes, nódulos, seiva do xilema e folhas das plantas de soja.....	55
4.3.2. Conteúdo de nitrito na solução do vaso, raiz, e nódulo das plantas.....	59
4.3.3. O teor de aminoácidos solúveis totais nas plantas de soja	61
4.3.4. A composição de aminoácidos livres presentes nas plantas de soja	63
4.3.5. Conteúdo de proteínas solúveis totais nas plantas de soja	69
4.3.6. Conteúdo de ureídeos totais nas plantas de soja.....	72
4.4. A atividade da enzima redutase do nitrato <i>in vivo</i> nas plantas de soja não noduladas e noduladas.....	74
4.5. Experimento IV. Análise da incorporação de $^{15}\text{NO}_3^-$ nas plantas de soja não noduladas e noduladas durante a hipoxia	79

4.5.1. Incorporação de $^{15}\text{N-NO}_3^-$ nas plantas de soja não noduladas e noduladas	80
4.5.2. Teor de N presente nas plantas de soja	84
4.5.3. Incorporação de ^{15}N em aminoácidos nas plantas de soja.....	87
4.6. Resposta de cinco cultivares de soja ao nitrato sob alagamento prolongado do sistema radicular.....	92
4.6.1. O efeito do alagamento na parte aérea das plantas	93
4.6.2. O alagamento e o diâmetro do caule.....	97
4.6.3. O efeito do alagamento no sistema radicular das cultivares de soja	99
4.6.4. Alterações nos tecidos das plantas em função do estresse por alagamento	104
5. Discussão	111
5.1. Utilização do nitrato por plantas de soja durante o alagamento do sistema radicular.....	111
5.2. Efeito do nitrato no desenvolvimento e na morfoanatomia de cinco cultivares de soja durante o alagamento prolongado do sistema radicular.....	122
6. Conclusões.....	129
7. Referências Bibliográficas	130

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
MF	Matéria fresca
MS	Massa seca
NAD ⁺	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NH ₄ ⁺	Amônio
PIB	Produto interno bruto

RESUMO

A soja é a leguminosa de maior importância econômica no Brasil com produção de 72,23 milhões de toneladas na safra de 2010/2011. O cultivo de soja em regiões que sofrem alagamento é uma das principais causas de perda de produtividade no Brasil. Nestas condições, ocorre redução na taxa de oxigênio do solo, e o sistema radicular da planta entra em hipoxia prejudicando o desenvolvimento e a produtividade das plantas. Existem evidências de que a adição de nitrato em condições de alagamento do sistema radicular (hipoxia) promove tolerância ao estresse, entretanto os mecanismos bioquímicos que envolvem essa tolerância ainda não estão totalmente elucidados. Analisando as alterações no metabolismo de nitrogênio em hipoxia, em plantas submetidas a diferentes condições experimentais, observou-se redução do conteúdo de nitrato dentro da planta, aumento no teor de aminoácidos solúveis totais, aumento na composição dos aminoácidos livres: Ala e Gaba, e redução de Asn, em plantas não noduladas e noduladas, além de redução no conteúdo de ureídeos totais em plantas noduladas. A adição de nitrato promoveu maior conteúdo de nitrato nas raízes, seiva do xilema e nódulos, maior teor de aminoácidos solúveis totais, maior conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes e menor nas folhas. A atividade da enzima redutase do nitrato *in vivo* em condições de hipoxia reduziu nas raízes das plantas não noduladas e nas raízes e folhas das plantas noduladas. A inclusão de $K^{15}NO_3$ no meio demonstrou que o nitrato é, de fato, absorvido em condições de hipoxia, pois as raízes, folhas e nódulos todos incorporaram o ^{15}N . Entretanto, absorção do nitrato sob hipoxia foi bem menor do que sob normoxia. Tanto em normoxia como hipoxia

as raízes apresentaram o maior grau de enriquecimento com ^{15}N enquanto que a incorporação nos nódulos foi menor. Houve incorporação de ^{15}N em aminoácidos em todos os tecidos, o que permite concluir que o nitrato não é apenas absorvido pelas raízes sob hipoxia mas também assimilado e transportado para a parte aérea. Os aminoácidos mais próximos ao processo de assimilação de nitrato, Asp, Glu, Ala e Asn, foram os que mais incorporaram o ^{15}N . No entanto, em geral um grau menor de incorporação foi encontrado sob hipoxia. A adição de nitrato, no dia 7, na solução do vaso de cinco cultivares de soja cujo sistema radicular estava alagado promoveu, na cultivar IAC Foscarin-31, maior crescimento da planta quando comparada às plantas com nitrato desde o início do experimento; na cultivar IAC-23, maior massa seca do sistema radicular; nas cultivares IAC-17 e IAC-18 foi evidenciado o mesmo crescimento da planta que as demais com nitrato; e na cultivar IAC-24, houve menor crescimento da planta. A adição também promoveu maior formação de aerênquima no caule, na raiz principal e adventícia, além de estimular a maior formação de raízes adventícias. Os dados sugerem que em condições de hipoxia, embora em quantidades bastante reduzidas e num processo mais lento, o nitrato é absorvido pelas raízes, sendo parte, convertida a aminoácidos e menos de 40% convertidos a nitrito, o qual é eliminado para o meio. A redução do nitrato via redutase do nitrato, passo inicial de sua metabolização, não é um passo limitante, uma vez que há produção de nitrito, produto da atividade da enzima. Com a adição de nitrato na solução do vaso de cinco cultivares de soja foram observadas tendências para suprir a ausência de nitrogênio e manter o desenvolvimento da plantas em condições de alagamento. A cultivar IAC Foscarin-31 e IAC-24 apresentaram crescimento geral da planta, sendo maior o crescimento observado na cultivar IAC Foscarin-31. Na cultivar

IAC-23 houve maior crescimento do sistema radicular; na cultivar IAC-17, da parte aérea, assim como na IAC-18.

SUMMARY

Soybean is a legume of great economic importance in Brazil with a production of some 72.23 million tons (2010/2011 harvest). One of the main causes of diminished yields of the cultivars produced in Brazil is their cultivation in regions subject to flooding. Under such conditions reduced availability of oxygen in the soil leads to hypoxia of the root system which impairs plant development and yield. There is evidence that the presence of nitrate during flooding can improve tolerance to hypoxic stress. However, the biochemical mechanisms underlying this phenomenon have not been fully elucidated. After analysis of the changes in nitrogen metabolism that occur under hypoxia, in plants subjected to a variety of experimental conditions, it was observed that there was a reduction in plant nitrate content, an increase in total soluble amino acids, an increase in the relative abundance of free Ala, Gaba, and a reduction in Asn, in both nodulated and non-nodulated plants, as well as a reduction of ureides in nodulated plants. The addition of nitrate during flooding resulted in a higher nitrate content of the root, nodule and xylem sap. Total soluble amino acids and soluble proteins also increased in the root under these conditions but decreased in the leaf. Under hypoxia the *in vivo* nitrate reductase activity declined in the roots of non-nodulated plants and in both the roots and leaves of nodulated plants. The inclusion of $K^{15}NO_3$ in the nutrient solution confirmed the uptake of nitrate under hypoxia, since roots, leaves and nodules became labelled. However, uptake under hypoxia was much lower than that observed under normoxia. Under both normoxia and hypoxia the roots showed the highest degree of ^{15}N enrichment while the nodules showed the weakest. Incorporation of ^{15}N in amino

acids of all tissues shows that $^{15}\text{NO}_3$ was not only taken up by the roots under hypoxia but that it was assimilated and transported to the shoot. The amino acids considered closest to N assimilation, Asp, Glu, Ala and Asn, were the most highly labelled. Nevertheless, lower levels of incorporation were generally found under hypoxia. The addition of nitrate to the hydroponic nutrient solution of five soybean cultivars, 7 days after flooding the root system, stimulated greater growth of the cultivar IAC Foscarin-31 as compared to plants with nitrate from the beginning of the experiment. It also stimulated greater root dry mass of the cultivar IAC-23, produced a similar growth increase of cultivars IAC-17 and IAC-18 compared to those with nitrate from the beginning, but resulted in less growth for the cultivar IAC-24. The addition of nitrate also stimulated formation of adventitious roots as well as aerenchyma which formed on both the stem and the main and adventitious roots. The data show that under conditions of hypoxia, nitrate is taken up by the roots although at a much lower rate than under normoxia, and in part is assimilated into amino acids while nearly 40% is reduced to nitrite which is excreted to the surrounding medium. The reduction of nitrate by the enzyme NR, the first step of nitrate metabolism, does not appear to be limiting since large quantities of the reaction product, nitrite, accumulate. With the addition of nitrate to the flooding medium of five soybean cultivars there was a tendency to overcome the absence of nitrogen and maintain plant development under flooded conditions. Of the five cultivars studied, IAC Foscarin-31 and IAC-24 responded positively through overall plant growth, with Foscarin-31 showing the greatest growth. Cultivar IAC-23 responded with greater root growth while IAC-17 and IAC-18 presented greater shoot growth.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Soja: origem e histórico no Brasil

A soja é uma leguminosa originária da região leste da China, sendo uma das culturas mais antigas conhecidas, há registros de plantio de soja que datam cinco mil anos.

A introdução da soja no Brasil deu-se no início do século XX, o primeiro registro data de 1882, na Bahia, por Gustavo Dutra. Diversos outros registros históricos indicam que a soja "amarela" foi inicialmente plantada no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em 1891, para teste como planta forrageira, e de lá expandiu-se para o sul do país.

A expansão e maior produtividade da cultura aconteceram em meados dos anos 70, quando além do sul, estados do centro-oeste do país começaram a cultivar soja. Este aumento na produção ocorreu devido à quebra da safra da Rússia e à incapacidade dos Estados Unidos de suprirem a demanda mundial. Nesta época o Brasil superou até a China, que era a segunda maior produtora mundial de soja com 8.500.000 toneladas, a qual ficava logo atrás dos Estados Unidos, o maior produtor mundial até os dias de hoje (Missão, 2006).

Esta fase coincidiu com o fim do ciclo da extração da madeira no Paraná, tornando a soja a cultura central desta região. Outro fator de relevância foi a grande geada de 1975 que devastou os cafezais do norte do Paraná. Desta forma os fazendeiros preferiram cultivar soja ao invés do café (Missão, 2006).

Dados do Conab (2011) indicam que os principais estados produtores de soja no Brasil são: MT, PR e RS sendo que juntos constituem mais de 62% da produção nacional.

Nos últimos anos a produção de soja no Brasil tem assumido grande importância econômica. A produtividade vem aumentando devido a muitos estudos visando à produção de cultivares de soja adaptadas às diferentes regiões do país, assim como de correção de solos, além de características de infra-estrutura e comercialização que já operam nos níveis mundiais. A grande demanda nacional e mundial por soja é outro fator preponderante para que esta cultura constitua 5% do PIB brasileiro e 25% do PIB agrícola (Conab, 2010).

1.2. A importância agrônômica da soja

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo com produção média de 72,23 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (Conab, 2011).

Do ponto de vista agrônômico, as leguminosas, como a soja, geram grande interesse por poderem ser cultivadas sem adubação nitrogenada. Isto é possível, uma vez que as leguminosas realizam a fixação do nitrogênio atmosférico através de uma associação simbiótica com bactérias do solo, que é caracterizada pela presença de nódulos nas raízes. Nesta associação, as bactérias fixam o nitrogênio atmosférico, e a planta fornece a energia necessária para reger o processo. Os tecidos do nódulo formam um ambiente propício para que o sistema funcione com grande eficiência. No caso do cultivo da soja, a fixação de nitrogênio é explorada ao máximo pelo agricultor brasileiro. A sua alta eficiência praticamente dispensa o uso

de adubo nitrogenado (Dobereiner, 1985) com enormes benefícios econômicos (Dobereiner, 1989).

O uso do adubo nitrogenado no cultivo da soja, utilizando-se nitrato ou amônio (este último transformado em nitrato em poucas semanas pelas bactérias nitrificadoras do solo), representa um grande desperdício de recursos, tendo em vista a forte inibição exercida pelo nitrato sobre o processo de formação do nódulo e a sua principal atividade metabólica, a fixação do N_2 (Streeter, 1988). Em algumas situações, entretanto, o uso do nitrato pode ser benéfico, por exemplo, em campos alagados, pois o nitrato aumenta a tolerância da planta ao encharcamento do sistema radicular (Sousa & Sodek, 2002).

1.3. Deficiência de oxigênio no sistema radicular

O alagamento do solo é um fenômeno bastante comum, principalmente em solos compactados ou com deficiência de drenagem natural (Sairam *et al.*, 2008). Basta uma chuva forte para que tais solos fiquem inundados durante horas ou até dias. Nesta situação, a troca gasosa entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo fica bastante prejudicada, devido à baixa taxa de difusão de gases no meio aquoso em relação ao solo seco. A taxa de difusão de oxigênio é cerca de 10^4 vezes menor na água do que no ar (Armstrong *et al.*, 1994) e a sua concentração 30 vezes menor (Thomson & Greenway, 1991).

A baixa disponibilidade de oxigênio para o sistema radicular num campo alagado torna o meio anaeróbico, inviabilizando a respiração das raízes. A partir do momento que a concentração de oxigênio presente se torna insuficiente para manter a taxa normal de respiração da raiz, por definição, o sistema entra no estado de

hipoxia. O estresse de hipoxia prejudica em primeira instância a respiração da raiz gerando declínio na taxa de ATP/ADP, o que indica restrição da fosforilação oxidativa (Dennis *et al.*, 2000). Além disso, a hipoxia diminui a condutividade hidráulica e afeta as aquaporinas, diminuindo a absorção de água e nutrientes da raiz (Dell'amico *et al.*, 2001; Tournaire-Roux *et al.*, 2003).

Os principais sintomas causados em plantas submetidas à hipoxia são: inibição do crescimento da planta (Sairam *et al.*, 2008), redução do crescimento do sistema radicular e da nodulação (Zenzen *et al.*, 2007), redução dos teores de nutrientes nas folhas (Pires *et al.*, 2002) e, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, a morte.

A hipoxia afeta inicialmente a respiração das raízes. Como o oxigênio é o aceptor final da cadeia transportadora de elétrons, em sua ausência ou com a redução da sua concentração, há acúmulo de NADH e FADH₂ (Sairam *et al.*, 2008) e conseqüentemente, diminuição da atividade enzimática no ciclo de Krebs e acúmulo de seus compostos intermediários. Com o acúmulo de piruvato e de poder redutor, ocorre aumento do processo de fermentação alcoólica com redução do piruvato a etanol, que será liberado para o meio externo a partir das raízes das plantas (Sousa & Sodek, 2003). Além de modificações bioquímicas, plantas em condições de hipoxia sofrem alterações morfológicas, como o desenvolvimento de aerênquima e a formação de raízes adventícias (Thomas *et al.*, 2005). Estas estruturas aparecem como mecanismos adaptativos que aumentam a área disponível para a entrada de oxigênio e permitem a sobrevivência da planta estressada por mais tempo.

1.4. Nitrato e o seu efeito benéfico sob hipoxia

Estudos demonstram que a adição de nitrato (NO_3^-) em solos alagados aumenta a tolerância das plantas de soja à hipoxia (Malavolta, 1954; Thomas, 2004). Teoricamente, isto ocorre uma vez que a redução do nitrato aumenta a regeneração do NAD^+ e produção do glutamato pela reação do 2-oxoglutarato com a glutamina, o qual descarboxilado, forma o GABA (ácido γ butírico), um dos precursores da alanina e do succinato (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). A alanina e o succinato são acumulados nas células em condições de hipoxia, uma vez que não são tóxicos às células e suas sínteses permitem a manutenção da respiração nestas condições, o que pode ser explicado por um modelo metabólico. A partir de outros estudos, foram reveladas algumas alterações metabólicas associadas à hipoxia do sistema radicular e um destes estudos (Sousa & Sodek, 2002) foi útil como ponto de partida para o atual. Observou-se que o acúmulo de matéria seca de plantas submetidas ao alagamento na presença do nitrato foi semelhante ao encontrado no controle não-alagado, embora o acúmulo de N tenha sido ligeiramente menor. Por outro lado, na presença de NH_4^+ , o acúmulo de matéria seca foi tão baixo quanto ao do controle alagado sem N (Thomas & Sodek, 2005).

O modelo do metabolismo primário sob hipoxia em *L. japonicus*, uma leguminosa, proposto por Rocha *et al.* (2010), elucidada como ocorre o acúmulo de alanina e succinato em condições de anoxia e indica uma rota de aumento na produção de ATP. Este modelo propõe que a produção de piruvato é ativada pela glicólise, a qual é mantida pela regeneração do NAD^+ via reações de fermentação que formam lactato e etanol. Para a produção de piruvato, ATP é formado. Evitando o acúmulo de piruvato, há produção de alanina, cuja reação produz 2-oxoglutarato, o

qual pode ser usado pela 2-oxoglutarato desidrogenase e a succinato Coa ligase para a produção de outro ATP. O succinato acumulará, assim como os compostos do Ciclo de Krebs, devido à limitação do oxigênio. Na mitocôndria, o NAD⁺ requerido pela 2-oxoglutarato oxidase pode ser reciclado via malato desidrogenase, a qual obtém o oxalacetato via fosfoenolpiruvato carboxilase ou via aspartato aminotransferase, sendo esta ativada em anoxia e provedora de glutamato, substrato da alanina aminotransferase.

Em plantas de arroz, uma espécie tolerante ao alagamento, acredita-se que o nitrato adicionado funcione como um dreno alternativo para elétrons, uma vez que para esta espécie, os elétrons de NADH são utilizados na redução do nitrato ao invés de serem utilizados na produção de etanol (Fan *et al.*, 1997).

1.5. O papel da redutase do nitrato em condições de hipoxia

A redutase do nitrato (RN) é uma enzima chave no processo de assimilação de nitrato pelas plantas (Botrel *et al.*, 1996; Campbell, 2001; De la Haba *et al.*, 2001), e cataliza a reação: $\text{NADH} + \text{NO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$.

O nitrato absorvido pelas raízes é reduzido a nitrito pela RN e então o nitrito (NO₂⁻) é reduzido pela redutase do nitrito (RNi) à amônia. A amônia é incorporada à estrutura dos aminoácidos através do sistema enzimático glutamina sintase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase (GS-GOGAT) (Aslam *et al.*, 2001), fornecendo nitrogênio para as plantas (Heller *et al.*, 1998). A forma induzida da RN é ativada na presença de nitrato, ou seja, a atividade da RN é regulada pelo “pool” metabólico de nitrato localizado no citoplasma sob condições de normoxia (Ferrari *et al.*, 1973; Aslam *et al.*, 1976; Allègre *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2004). A concentração de

nitrato no “pool” citoplasmático é menor e mais constante que a do “pool” vacuolar (Ferrari *et al.*, 1973; Martinoia *et al.*, 1981; Zhen *et al.*, 1991). Em raiz de plantas de cevada sob normoxia, a concentração exógena de nitrato determina a quantidade de íons de nitrato nos “pools” metabólicos e não-metabólicos (vacuolar) (Aslam *et al.*, 2001).

Vários estudos indicam que a síntese da RN é promovida, além do nitrato, pela luz, pelos fitocromos e pela atividade fotossintética (Appenroth *et al.*, 2000; De la Haba *et al.*, 2001). A atividade da RN é modulada tanto pela fosforilação como por uma proteína específica conhecida como 14-3-3 (Weiner & Kaiser, 1999, 2000). Em espinafre, a fosforilação da RN necessita da serina-543 e é o primeiro passo para sua inativação (Kanamaru *et al.*, 1999). A completa inativação ocorre quando a forma fosforilada é associada à proteína 14-3-3. Essa ligação é iniciada por cátions bivalentes como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} (Weiner & Kaiser, 2001). A ativação da RN ocorre na dissociação dessa proteína (14-3-3) assim como sua desfosforilação (Huber *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1999).

Garcia Novo & Crawford (1973) encontraram atividades maiores de RN nas raízes de diversas espécies submetidas à hipoxia. Atividade da RN também aumentou em coleótilos de plântulas de arroz durante a germinação em condições de anoxia, devido ao aumento na expressão gênica (Mattana *et al.*, 1996). Por outro lado, em todos os outros casos estudados, o aumento na atividade da RN durante a hipoxia foi explicado pelo mecanismo de desfosforilação (Kaiser & Huber, 2001). O mesmo mecanismo regulatório de desfosforilação foi observado em raízes de plantas de ervilha (Glaab & Kaiser, 1993), de cevada (Botrel *et al.*, 1996) e de pepino (De la

Haba *et al.*, 2001), nos quais aparentemente, a desfosforilação da RN é sinalizada pela acidificação da célula (Botrel *et al.*, 1996).

O papel fisiológico do aumento na atividade da RN durante a hipoxia é pouco compreendido. Dados obtidos com tomateiros, anteriormente (Allègre *et al.*, 2004) indicam que a redução do nitrato pode estar envolvida no efeito benéfico do nitrato na tolerância à hipoxia, pois a inibição da enzima por tungstênio anulou o efeito benéfico do nitrato. Por outro lado, outras evidências geram dúvidas em relação ao papel do nitrato. Medidas realizadas em tecidos hipoxicos mostraram que as taxas de redução e assimilação do nitrato são menores nestes casos (Lee, 1978). Esses resultados indicam que as taxas reais de redução de nitrato não acompanham o aumento na atividade da redutase de nitrato. O acúmulo do produto, nitrito, no meio em condições de anoxia sugere que a redução de nitrito é inibida mais fortemente do que a redução do nitrato (Lee, 1979; Morard *et al.*, 2004). É importante frisar que as espécies com capacidade de germinar em condições anaeróbicas, como as plantas de arroz, são um caso à parte (Reggiani *et al.*, 1993a), pois a assimilação do nitrato é aumentada sob anoxia (Kemp & Small, 1993; Reggiani *et al.*, 1993, 1993a). Em plantas de soja é observada uma queda acentuada na atividade da RN em raízes submetidas à hipoxia (Brandão, 2005).

1.6. Justificativa do trabalho

Os mecanismos de atuação do nitrato como promotor de tolerância em plantas de soja sob condições de hipoxia não estão totalmente elucidados. O presente trabalho buscou compreender como o nitrato está sendo metabolizado no sistema

radicular em condições de hipoxia, o que pode revelar os mecanismos do seu efeito benéfico durante o alagamento do sistema radicular.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar como a adição de nitrato promove a tolerância à hipoxia em plantas de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular. Os objetivos específicos foram:

- Verificar como o metabolismo do nitrogênio é modificado em condições de alagamento do sistema radicular, o que acarreta o estresse por hipoxia;
- Verificar possíveis alterações no metabolismo após a adição de nitrato na solução nutritiva de plantas em condições de hipoxia;
- Avaliar a atividade da enzima redutase do nitrato em condições de hipoxia;
- Determinar a localização e quantidade de NO_3^- marcado em diferentes partes da planta de soja, a sua proporção no teor de nitrogênio total, e sua incorporação na forma de aminoácidos, em plantas submetidas a condições de hipoxia;
- Compreender como cinco cultivares de soja produzidas no estado de São Paulo respondem ao nitrato adicionado após o sistema radicular estar em hipoxia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

As sementes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill] da cultivar IAC-23, desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas, foram germinadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação, em condições naturais de luz e temperatura.

Para obtenção e cultivo de plantas não noduladas, plantas com o primeiro par de folhas totalmente expandido (V1, Ritchie *et al.*, 1982) foram transferidas para vasos plásticos de 1,4 L contendo vermiculita e cultivadas com solução nutritiva completa (Hoagland & Arnon, 1938).

Para obtenção e cultivo das plantas noduladas, plantas em estágio V1 de desenvolvimento foram inoculadas com *Bradyrhizobium elkani* (SEMIA 5019) por imersão das raízes em uma suspensão contendo a bactéria. Em seguida as plantas foram transferidas e cultivadas em sistema similar ao das plantas não noduladas, com exceção da solução nutritiva que foi livre de N (0 mM NO₃⁻) (Hoagland & Arnon, 1938).

A aplicação da solução nutritiva foi feita duas vezes por semana, sendo distribuídos 250 mL da solução por vaso e, quando necessário, as plantas foram irrigadas com água de torneira.

3.2. Obtenção, manutenção e multiplicação do inóculo

A manutenção (meio sólido) e a multiplicação (meio líquido) das bactérias (*Bradyrhizobium elkani*) foram realizadas em meio de cultura recomendado por

Norris & Date (1976), pH 6,8 - 7,0, utilizando os seguintes reagentes: K_2HPO_4 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$), $NaCl$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), extrato de levedura ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$), manitol (10 g.L^{-1}) e 5 mL de azul de bromotimol a 0,5% (p/v) em metanol. O meio sólido foi obtido adicionando-se 15 g.L^{-1} de ágar ao meio líquido.

Após autoclavagem a 121°C por 20 minutos, os meios foram inoculados em câmara de fluxo laminar e incubados a $28\text{-}30^\circ\text{C}$. As placas com meio sólido depois de inoculadas receberam vaselina líquida (Labsynth), previamente autoclavada, sobre todo o meio, e, em seguida, foram armazenadas sob temperatura de 4 a 6°C . Enquanto que o meio líquido, após ter sido inoculado, foi incubado sob agitação à temperatura ambiente, por um período de 3 a 4 dias, quando a suspensão de bactérias atingiu uma quantidade em torno de 10^9 células viáveis. mL^{-1} de UFC - unidades formadoras de colônias, podendo assim, ser utilizada para a inoculação das plântulas.

3.3. Soluções nutritivas

As soluções nutritivas utilizadas no cultivo das plantas foram preparadas de acordo com Hoagland & Arnon (1938). A solução +N (com NO_3^-), 10 vezes concentrada, porém diluída antes do uso, e a solução -N (sem NO_3^-) tiveram a seguinte composição:

Solução +N (10x conc.): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50 mM); KNO_3 (50 mM); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mM); KH_2PO_4 (10 mM); H_3BO_3 (0,46 mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 mM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($7,65 \mu\text{M}$); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($3,20 \mu\text{M}$); H_2MoO_4 ($0,56 \mu\text{M}$).

Solução -N: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mM); KH_2PO_4 (1 mM); $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mM); K_2SO_4

(2 mM); H_3BO_3 (0,046 mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (9,1 μM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,765 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,32 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

As duas soluções foram preparadas com todos os macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro. O ferro foi adicionado apenas no momento da utilização das soluções. Para isso, acrescentou-se às soluções, +N ou -N, 1 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$, 33,2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e NaOH, 3,65 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

3.4. Tratamentos

3.4.1. Tratamentos em sistema hidropônico

Com o objetivo de verificar o efeito do nitrato, plantas não noduladas da cultivar IAC-23 em estágio vegetativo V4 (3º trifólio totalmente expandido) e plantas noduladas em estágio vegetativo V5 (4º trifólio totalmente expandido) (Ritchie *et al.*, 1982) foram transferidas para sistemas hidropônicos contendo solução nutritiva -N ou +N.

Em todos os experimentos hidropônicos foram utilizados vasos plásticos de 3 L contendo solução nutritiva (+N ou -N) diluída a 1/3. Em cada vaso foram acomodadas três plantas, que tiveram o sistema radicular lavado cuidadosamente com água para a remoção do excesso de vermiculita. O sistema foi mantido sob aeração contínua, por meio de tubo flexível ligado à tubulação de um compressor de ar nos tratamentos com aeração. As plantas de soja não noduladas foram transferidas para hidroponia sete dias antes do início do experimento e mantidas em aeração, visando à adaptação das plantas ao sistema hidropônico. A transferência das plantas noduladas para hidroponia foi realizada no início do experimento, para

evitar morte ou ineficiência dos nódulos devido à hidroponia. Nos dois casos, plantas noduladas e não noduladas, a hipoxia foi induzida pela suspensão da aeração e a adição de 100 mL de óleo mineral para cobrir a superfície da solução nutritiva e assim evitar a entrada de oxigênio no sistema. O volume inicial da solução no vaso foi restabelecido diariamente, com adição de água destilada, sendo esta anteriormente borbulhada em N₂ gasoso para a retirada de gases e para que não houvesse interferência do O₂ nos tratamentos em hipoxia.

Nos experimentos onde foi realizada adição de nitrato, esta ocorreu na solução do vaso um dia após a indução da hipoxia, colocando 10 mL de uma solução 1,5 M de KNO₃ com pipeta por baixo do óleo mineral na superfície. A solução foi anteriormente borbulhada em N₂ gasoso. Posteriormente, por diluição a solução do vaso passou a ter a concentração esperada de 5 mM de nitrato.

3.4.1.1. Sistema hidropônico para material marcado com ¹⁵N

As análises de incorporação de ¹⁵N em aminoácidos e em nitrogênio total foram obtidas a partir de plantas de soja da cultivar IAC-23 em diferentes fases de desenvolvimento. Sementes foram germinadas em vasos de 1,4 L com vermiculita e ao atingirem o estágio de desenvolvimento a ser avaliado, as raízes foram lavadas cuidadosamente com água corrente. Em seguida, as plantas foram colocadas em hidroponia, permanecendo uma planta por vaso. Dois tratamentos foram montados, um com plantas em normoxia, ou seja, com 5 mM de ¹⁵NO₃⁻ e aeração e o outro com 5 mM de ¹⁵NO₃⁻ sem aeração imposta no início do experimento. A solução de nitrato colocada nos vasos de 200 mL no momento da montagem do experimento era composta por 11% de N enriquecido. Os ensaios foram feitos nos estádios de

desenvolvimento V1 a V8 em plantas não noduladas e de V1 a V9 em plantas noduladas de acordo com Ritchie *et al.* (1982), e as coletas realizadas após 48 horas em sistema hidropônico.

3.4.2. Experimento com diferentes cultivares de soja: resposta ao nitrato em condições de alagamento.

Neste experimento avaliou-se como cinco cultivares de soja não noduladas, produzidas no estado de São Paulo, respondem ao nitrato em condições de alagamento do sistema radicular. Foram elas: IAC Foscarin-31, IAC-23, IAC-17, IAC-24 e IAC-18. Todas desenvolvidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

Três sementes de cada cultivar foram germinadas em vasos com vermiculita e após 10 dias foi realizado o desbaste, permanecendo uma planta por vaso durante todo experimento. As plantas foram nutridas duas vezes por semana com solução de Hoagland & Arnon (1938).

Quando as plantas atingiram o estágio V4 de desenvolvimento (terceiro trifólio totalmente expandido, de acordo com Ritchie *et al.*, 1982), foi montado o experimento. O alagamento foi realizado colocando os vasos com as plantas dentro de outro vaso maior e adicionado a eles: solução nutritiva sem nitrato; solução nutritiva com nitrato; e solução nutritiva com nitrato adicionado apenas no sétimo dia de análise. Nos tratamentos os vasos foram completados com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) a 1/3 (5 mM NO₃⁻), a qual era trocada a cada sete dias, uma vez que testes preliminares demonstraram que em 7 dias há praticamente consumo integral de nitrato da solução pelas plantas.

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada entre 11 e 13:00 h conforme metodologia descrita por McClure & Israel (1979). Com auxílio de uma lâmina foi feito um corte transversal abaixo do nó cotiledonar da planta, o qual separou a parte aérea do sistema radicular. Em seguida, a parte aérea foi descartada e a região do corte foi lavada com água destilada e enxugada com papel de filtro iniciando-se a coleta da seiva com auxílio de microcapilares de vidro. Os exsudatos da seiva foram coletados em eppendorfs e mantidos no gelo para posterior armazenamento a - 20°C até o momento das análises.

3.5.2. Extração de amostras vegetais para análises bioquímicas

A extração das amostras foi realizada de acordo com Bielecki & Turner (1966) pesando 1 g MF ou 0,1 g MS e adicionando a elas 10 mL de MCW (metanol: clorofórmio: água) na proporção 12:5:3 (v/v). Após 24 horas em repouso, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e para cada 4 mL deste foi acrescentado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada em funil de separação com agitação. A mistura foi mantida em repouso por 24 horas para a separação das fases. Em seguida, foi coletada a fase aquosa, a qual foi posteriormente utilizada para as análises de aminoácidos totais solúveis, nitrato, nitrito, entre outras. Enquanto que, ao precipitado foram adicionados 10 mL de NaOH 0,1 N. Após 24 horas, estas amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos e o sobrenadante guardado para posterior análise de proteínas solúveis totais.

3.5.3. Dosagem de nitrato

A dosagem de nitrato foi realizada de acordo com a metodologia de Cataldo *et al.* (1975), a qual utiliza de 0,2 a 1,0 μmol de KNO_3 , como padrão. Alíquotas de 100 μL foram pipetadas em tubos de ensaio e a elas adicionados 0,4 mL de reagente salicílico (ácido salicílico a 5% p/v em ácido sulfúrico concentrado). Em seguida, as amostras foram agitadas em vortex e após 20 minutos, a elas foram adicionados 9,5 mL de NaOH 2 N. As amostras foram novamente agitadas em vortex e ao atingirem a temperatura ambiente, as densidades óticas foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm.

3.5.4. Dosagem de nitrito

A determinação de nitrito seguiu o método de Hageman & Reed (1980). Foram misturados a 2 mL de amostra (1 mL de amostra e 1 mL de água destilada) ou branco (2 mL de água destilada) ou padrões (0,01 a 0,1 μmol de NO_2^-), 1 mL de sulfanilamida a 1% (p/v) em HCl 1,5 N e 1 mL de N-(naftil)-etilenodiamina 2.HCl a 0,02% (p/v) em água destilada, obtendo-se um volume final de 4 mL. A reação foi agitada em vortex e em seguida foram lidas as densidades óticas em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e a dosagem de nitrito não veiculado à atividade da enzima RN *in vivo* foi expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\mu\text{mol} \cdot \text{gMF}^{-1}$ ou $\mu\text{mol} \cdot \text{gMS}^{-1}$.

3.5.5. Dosagem de aminoácidos solúveis totais

Os aminoácidos solúveis totais foram analisados de acordo com Yemm & Cocking (1955). Para esta análise, 1 mL de amostra, branco ou padrões (20 - 100 nmol de leucina) foram colocados em tubo de ensaio e a ele adicionado 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 0,2 mL de ninhidrina a 5% em metilcelulsolve (éter monometílico de etilenoglicol) e 1 mL de KCN 0,01 M a 2% em metilcelulsolve. Em seguida, o tubo de ensaio foi agitado e coberto com bolinha de vidro, e incubado em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se etanol a 60% até completar o volume para 4 mL. As densidades óticas foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm.

3.5.6. Separação e análise da composição de aminoácidos das raízes, seiva do xilema, nódulos e folhas por HPLC.

A separação e análise de aminoácidos livres foram efetuadas por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivatização com o-ftaldialdeído (OPA) [(Benson & Hare, 1975; Jarret *et al.*, 1986) com modificações (Marur *et al.*, 1994)].

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

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com dois solventes: tampão fosfato pH 7,25 para a bomba A, denominado tampão A [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, 20 mL de tetrahydrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol a 65%

também específico para HPLC para a bomba B. Ambas as soluções foram submetidas à retirada de gases, sendo o tampão "A" filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana PVDF de 0,45 μm .

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se, inicialmente, 50 mg de OPA em 1 mL de metanol específico para HPLC e posteriormente misturando-o a 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (ácido bórico 2,4 g p/v em H_2O ; pH ajustado com NaOH 2 N), filtrando-se em seguida em filtro Millipore em PVDF de 0,22 μm . No dia de análise, 5 μL de 2-mercaptoetanol foram adicionados a 625 μL desta mistura.

As amostras de seiva do xilema foram centrifugadas a 14.000 x *g* por 2 minutos para posterior derivatização com o reagente OPA + 2-mercaptoetanol. As amostras de folhas, raízes e nódulos foram filtradas em filtro Millipore em PVDF de 0,22 μm e em seguida foram concentradas sob fluxo de nitrogênio gasoso 3 vezes para folha e 5 vezes para raízes. As amostras de nódulos não foram concentradas.

Uma alíquota de 20 μL , de amostra ou padrão, foi misturada com 60 μL do reagente OPA + mercaptoetanol em microtubos. Após agitação e dois minutos de reação, tempo suficiente para se formar os derivados aminoácidos-OPA, uma alíquota de 10 μL (padrão e folhas) ou 20 μL (seiva, raízes e nódulos) foi injetada na câmara de injeção de amostra do HPLC. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em um gradiente dos dois tampões, crescente de "B" em relação à "A", através da coluna cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2,5 μm , 250 x 4,6 mm, da SUPELCO INC.) com fluxo de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de "B" em relação à "A" da seguinte forma: 25% ao 0 min, 60% aos 35 min, 75% aos 45 min, 95% aos 60 min, 96% aos 65 min e 100% aos 66 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica, os derivados aminoácidos-OPA foram detectados por um monitor de fluorescência Shimadzu modelo 10AXL, ajustado com λ de excitação de 265 nm e λ de emissão de 450 nm. O sinal do monitor foi processado por um integrador LKB modelo 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparada à dos 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), ao qual foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos na concentração de 50 nmol.mL⁻¹.

3.5.7. Dosagem de proteínas solúveis totais

A determinação das proteínas solúveis totais foi feita de acordo com Bradford (1976). Inicialmente foi feito o reagente de Bradford: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G250 dissolvido em 50 mL de etanol a 95%. Em seguida, 100 mL de ácido fosfórico a 85% p/v foram adicionados e completado o volume para 1 litro com água destilada. Esta solução foi filtrada a vácuo e armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente. Para a dosagem, em 0,1 mL da amostra, branco ou padrão (0,02 a 0,1 mg de BSA) foram adicionados 5 mL do reagente de Bradford e os tubos com os reagentes mantidos incubando por 5 minutos a temperatura ambiente para posterior leitura das densidades óticas em espectrofotômetro a 595 nm.

3.5.8. Dosagem de ureídeos totais

A quantificação de ureídeos totais foi baseada na metodologia de Vogels & van der Drift (1970). A hidrólise alcalina da alantoína em alantoato foi realizada em

tubos de ensaio onde se acrescentou 250 µL de amostra, branco ou padrões (12,5 a 75 nmol de alantoína), 500 µL de água destilada e 250 µL de NaOH 0,5 N. Em seguida, os tubos foram fechados com bolinhas de vidro e levados ao banho-maria a 100°C por 8 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, pipetou-se 250 µL de HCl 0,65 N para a hidrólise ácida. Foram recolocadas as bolinhas de vidro e os tubos retornaram ao banho-maria a 100°C por 4 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e a eles adicionados 250 µL de tampão fosfato 0,4 M pH 7,0 e 250 µL de fenil-hidrazina a 0,33%. O processo foi seguido de agitação em vortex e repouso por 5 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo, onde permaneceram até a adição de 1,25 mL de HCl concentrado e gelado (0°C). Após atingir a temperatura ambiente foram adicionados 250 µL de ferricianeto de potássio a 1,65%. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex e deixados à temperatura ambiente durante 15 minutos para posterior leitura da densidade ótica a 535 nm.

3.5.9. Extração e dosagem da enzima redutase do nitrato *in vivo*

A dosagem *in vivo* da RN (EC 1.6.6.1) foi realizada baseada no método descrito por Majerowicz *et al.* (2003). O material vegetal (raízes e folhas) foi coletado, e apenas as raízes foram lavadas com água deionizada e secas em papel absorvente. As raízes foram cortadas em pequenos segmentos, com o auxílio de uma tesoura e posteriormente pesadas (0,2 g). As folhas foram separadas do caule, e a elas foi retirado em torno de 1 cm das regiões distal e proximal e posteriormente pesadas (0,1 g). Em seguida, o material vegetal foi colocado em seringa e adicionados 5 mL de meio de reação (K₂HPO₄ 0,05 M pH 7,5, KNO₃ 0,05 M e

propanol a 1%). Então, fez-se a inversão da mesma para expelir o ar. Fechou-se a saída da seringa com o dedo e puxou-se o êmbolo várias vezes para fazer vácuo com o material vegetal totalmente submerso no meio. As seringas foram cobertas com papel alumínio, conservadas no escuro, e incubadas por 30 minutos a 30°C. Após esse tempo, a reação foi paralisada retirando-se o meio de reação da seringa. As amostras foram utilizadas posteriormente para dosagem de nitrito, conforme descrito no item 4.5.8.

3.5.10. Preparo das amostras e determinação isotópica de N por espectrometria de massas

A análise da determinação isotópica de N foi realizada pelo Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) na cidade de Piracicaba-SP e o procedimento utilizado está descrito abaixo.

Amostras orgânicas com 20-200 µg de N, finamente moídas (granulometria de 100 “mesh”) foram seladas em cápsulas de estanho (Sn), e colocadas no auto-amostrador de um ANCA-GSL, modelo Hydra 20/20 de acordo com Barrie & Prosser (1996).

As amostras foram purgadas do ar com um fluxo de He ultrapuro no auto-amostrador. Em seguida, as amostras foram levadas para o interior de tubo de combustão vertical, quando um pulso de O₂ ultra puro substituiu temporariamente o fluxo de He. O tubo de combustão foi preenchido com um catalisador o Cr₂O₃ (óxido de cromo) e CuO (óxido de cobre) em fios cortados em pequenos pedaços, que oxidaram os hidrocarbonos, e lã de prata (Ag) que tem a função de reter o S (SO₂) e halogêneos. Quando o pulso de O₂ chegou ao forno de combustão juntamente com a

amostra selada na cápsula de Sn, a temperatura no local inicialmente em 1000°C, aumentou para 1700°C. Os produtos da combustão: CO₂, N₂, NO_x e H₂O foram levados para um tubo de redução mantido a 600°C e que contém cobre metálico (Cu). No tubo de redução os óxidos de nitrogênio são reduzidos a N₂, sendo também retido o excesso de O₂. A seguir, os gases são conduzidos pelo gás carregador para uma coluna preenchida com perclorato de magnésio [Mg(ClO₄)₂] que retém o vapor de água e coluna com carbosorb para reter CO₂, quando objetiva-se somente determinação isotópica de N. Por último uma coluna cromatográfica separa o N₂ de impurezas. Uma pequena fração do efluente (0,1%) do sistema de preparação de amostra entra no IRMS (analisador automático de C:N interfaceado com um espectrômetro de massas) através de um longo tubo capilar com um constritor para ajuste do fluxo de gás na entrada do IRMS. O gás entrando na fonte é analisado para N-total e razão ¹⁵N/¹⁴N, por meio das intensidades das massas 28 (¹⁴N¹⁴N), 29 (¹⁵N¹⁴N) e 30 (¹⁵N¹⁵N).

O valor da abundância isotópica da amostra (At) foi calculado pela fórmula:

$$\text{Cálculo: At\% } ^{15}\text{N} = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \times 100$$

... e subtraído o valor para a abundância natural de ¹⁵N (em torno de 0,37% At) para obter a APE (porcentagem de enriquecimento de átomos).

3.5.11. Identificação em GC/MS de compostos marcados com ¹⁵N

As amostras liofilizadas de raízes/folhas (0,05 g) e nódulos (0,025 g) foram extraídas em 2 mL de ácido sulfosalicílico a 2%. Em seguida foram agitadas em vortex e mantidas em repouso por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi separado e passado em coluna Dowex 50W x 8 forma H⁺ 200 mesh (0,5 g) e a coluna lavada com 4 mL de água deionizada. Em seguida, utilizou-se 2 mL de hidróxido de amônio 4 N para eluir os aminoácidos. Posteriormente, metade do volume (1 mL) da amostra de aminoácidos foi concentrada sob jato de nitrogênio gasoso.

Amostras de folhas, raízes e nódulos que foram liofilizadas inicialmente, assim como de seiva coletada foram separadas em alíquotas de 100 µL em eppendorfs e secas sob jato de gás nitrogênio. Em seguida, no caso da seiva, foram adicionados cerca de 100 µL de HCl 0,1 N para eliminar possíveis interferentes (Silvester *et al.*, 1996) e as amostras secas novamente. Posteriormente, adicionou-se dicloro-metano (CH₂Cl₂) para retirar possíveis resíduos de água por evaporação (mistura azeotrópica). Nas amostras secas foram adicionados 30 µL de piridina (Merck, super-seco) e 30 µL de MTBSTFA [*N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)trioflurocetamida] como agente derivatizante (Woo & Lee, 1995; Silvester *et al.*, 1996). A reação foi realizada em banho seco à temperatura de 70°C durante 30 minutos. Em seguida, os eppendorfs foram resfriados à temperatura ambiente, até serem centrifugados a 6000 x g e as amostras colocadas em “inserts” dentro de frascos de vidro para serem analisadas no GC/MS.

A análise de aminoácidos foi realizada por *Gas Chromatography/Mass Spectroscopy* (GC/MS), em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector de

massas QP2010 Plus, modelo Shimadzu, em que a fonte de impacto de elétrons opera com energia de ionização de 70 eV. Os aminoácidos foram separados em uma coluna capilar de sílica DB-5 de 30 metros; 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura do filme (J & W Scientific, USA).

As amostras foram injetadas utilizando-se um auto-injetor Split AOC-2i, Shimadzu, com temperatura do injetor em 290°C. Utilizou-se He como gás de arraste (1,46 mL.min⁻¹). Injetou-se 2 µL de amostra utilizando razão dos splits de 1.0 a 30.0. A temperatura da interface GC/MS foi de 290°C e a temperatura da fonte de íons foi de 200°C.

O gradiente de temperatura foi programado inicialmente para se manter em 100°C por 4 minutos e, posteriormente, para subir 6°C por minuto até alcançar a temperatura de 290°C, o que foi mantido por 4 minutos. O tempo de corrida foi de 36,67 minutos. O método de detecção utilizado foi o SIM, o qual detectava os aminoácidos de interesse, além dos ureídeos. No modo SIM foi utilizado o *m/z* do fragmento principal obtido, e este foi, para a maioria dos aminoácidos, o M-57. O M+1 desse fragmento (e também o M+2, no caso dos aminoácidos com 2 átomos de N) foram também medidos, pois a incorporação de ¹⁵N aumenta o *m/z* do fragmento em M+1.

Os valores de enriquecimento dos aminoácidos (¹⁵N) foram calculados de acordo com a fórmula abaixo, sugerida por Godber e Parsons (1998):

$$APE = (Re - Rc) / [1 + (Re - Rc)] \times 100, \text{ em que:}$$

APE representa a porcentagem de enriquecimento de átomos;

Re = [(M+1)/M] (enriquecido) e

Rc = [(M+1)/M] (controle).

Os principais aminoácidos avaliados, o tempo de retenção e o fragmento utilizado podem ser vistos na tabela abaixo (o *m/z* representa M, e o valor para M+1 (não-apresentado) é igual o *m/z* na tabela somado 1) .

aminoácidos	Tempo de retenção (min)	Fragmentos		
		M-57	M-85	M-159
ALA	12,2		232*	
SER	20,2			288*
ASP	22,8	418		
GLU	24,5	432		
ASN	24,9	417		
GLN	26,7	431		

* para Ala e Ser, o principal fragmento obtido foi, respectivamente, o M-85 e M-159

3.5.12. Medição da área foliar

A medida da área foliar foi realizada através de um integrador de área foliar (LICOR modelo Li-3100) e o resultado expresso em cm².

3.5.13. Medição da massa seca da parte aérea e do sistema radicular

As amostras de parte aérea (folhas e caule) e do sistema radicular (raiz

principal e raízes adventícias) foram secas em estufas a 50°C durante quatro dias e em seguida foram pesadas.

4.5.14. Medição do diâmetro do caule

A medição do diâmetro do caule foi feita um centímetro acima do local do alagamento (nó cotiledonar) com auxílio de um paquímetro digital da marca Mitutoyo Sul Americana e do modelo R500-196-20 B.

3.5.15. Determinação do volume do sistema radicular

Para determinar o volume do sistema radicular, foi verificado o volume de deslocamento da água da proveta quando submerso o sistema radicular menos o volume da proveta antes da submersão.

3.5.16. Análise Histológica

Para a análise histológica, o caule e as raízes foram fixados em FAA (formalina, ácido acético glacial e álcool etílico 50%) na proporção 1:1:18 (v/v) por 24 horas a vácuo (Johansen, 1940). Em seguida, o FAA foi substituído por álcool etílico 50% por mais 24 horas. Transcorrido este período, houve a troca de solução por álcool etílico 70%.

Amostras com 5 mm de comprimento, situadas acima e abaixo do nó cotiledonar (local do alagamento), foram retiradas do caule, da raiz principal e das adventícias, que surgiram após o início do alagamento. Essas amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em glicolmetacrilato (Historesin, Leica).

As seções transversais entre 5 e 8 mm foram obtidas em micrótomo rotativo Leica RM 2125RT e coradas com Azul de Toluidina (CI52040) a 0,05% (Feder & O'Brien, 1968) em tampão citrato pH 4,4. Observações e fotografias digitais foram retiradas em microscópio Olympikus BX51 com câmara digital acoplada modelo DP71.

3.6. Análise Estatística

Nos tratamentos realizados em hidroponia, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três ou cinco repetições, onde cada vaso apresentava uma ou três replicatas. Quando necessário, aos dados foi aplicada a análise de variância e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No tratamento de alagamento, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial de 5 x 3 (cultivares x tratamentos), com sete repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I. Utilização de nitrato pelas plantas de soja não noduladas da cultivar IAC-23 em hidroponia e sob hipoxia.

O objetivo deste experimento foi saber se o nitrato presente na solução do vaso é absorvido e metabolizado em condições de hipoxia.

Plantas não noduladas foram cultivadas em vermiculita e ao atingirem o estágio V4 de desenvolvimento foram transferidas para o sistema hidropônico. Após sete dias de adaptação das plantas ao meio, foram montados os tratamentos. Foram testados três tratamentos: plantas com nitrato em normoxia "+N+ar", plantas com nitrato em hipoxia "+N-ar" e plantas sem nitrato e em hipoxia "-N-ar". As plantas foram separadas em vasos com solução nutritiva contendo $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrato ou sem nitrato. Até o dia 1, as plantas dos tratamentos "+N+ar" e "+N-ar" ficaram submetidas às mesmas condições com nitrato e com aeração. A partir do dia 1, foi imposta a hipoxia para as plantas do tratamento "+N-ar" e para as plantas do tratamento "-N-ar". As coletas da solução do vaso foram realizadas do início do experimento (dia 0) até o final (dia 5), enquanto que as coletas de raízes, seiva do xilema e folhas foram feitas nos dias 0, 1, 2 e 5. Primeiramente, foram analisados os conteúdos de nitrato e nitrito da solução do vaso. Em seguida, foi verificado o conteúdo de nitrato nas raízes, seiva do xilema e folhas. O teor de aminoácidos solúveis totais, e a composição de aminoácidos também foram analisados nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas.

4.1.1. Nitrato e nitrito na solução do vaso em normoxia e hipoxia.

Até o dia 2, a quantidade inicial de $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ praticamente não alterou nos tratamentos com nitrato (Figura 1). Para as plantas do tratamento "+N+ar", ocorreu queda no conteúdo de nitrato do vaso a partir do dia 3, atingindo $1,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Para as plantas no tratamento "+N-ar" também foi observada redução na concentração de nitrato do vaso, chegando a $0,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Nas plantas com o tratamento "-N-ar", como esperado, foram observados apenas traços de nitrato na solução do vaso.

O nitrito, formado pela redução do nitrato, foi encontrado na solução do vaso das plantas do tratamento "+N-ar" conforme indicado na Figura 2. O conteúdo de nitrito presente no dia 3 foi em torno de $0,55 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, seguido de aumento para $2,12 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4, e este valor se manteve até o dia 5. Não foi encontrado nitrito nos demais tratamentos.

4.1.2. Variações no conteúdo de nitrato nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas das plantas de soja em normoxia e hipoxia.

No dia 0, o conteúdo de nitrato encontrado nas raízes das plantas foi de $36 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Figura 3A). No dia 1, para o tratamento "+N+ar" o nível endógeno do nitrato nas raízes das plantas teve ligeira queda chegando a aproximadamente $32 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$. O conteúdo de nitrato aumentou para $40 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 2, seguido de ligeira queda até o dia 5, quando foram observados $35 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ de nitrato presente nas raízes. O conteúdo de nitrato nas plantas do tratamento "+N-ar" redução acentuada no conteúdo de nitrato de $35 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para $14 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ do dia 0 para o dia 1, quando as plantas ainda estavam com aeração. Posteriormente,

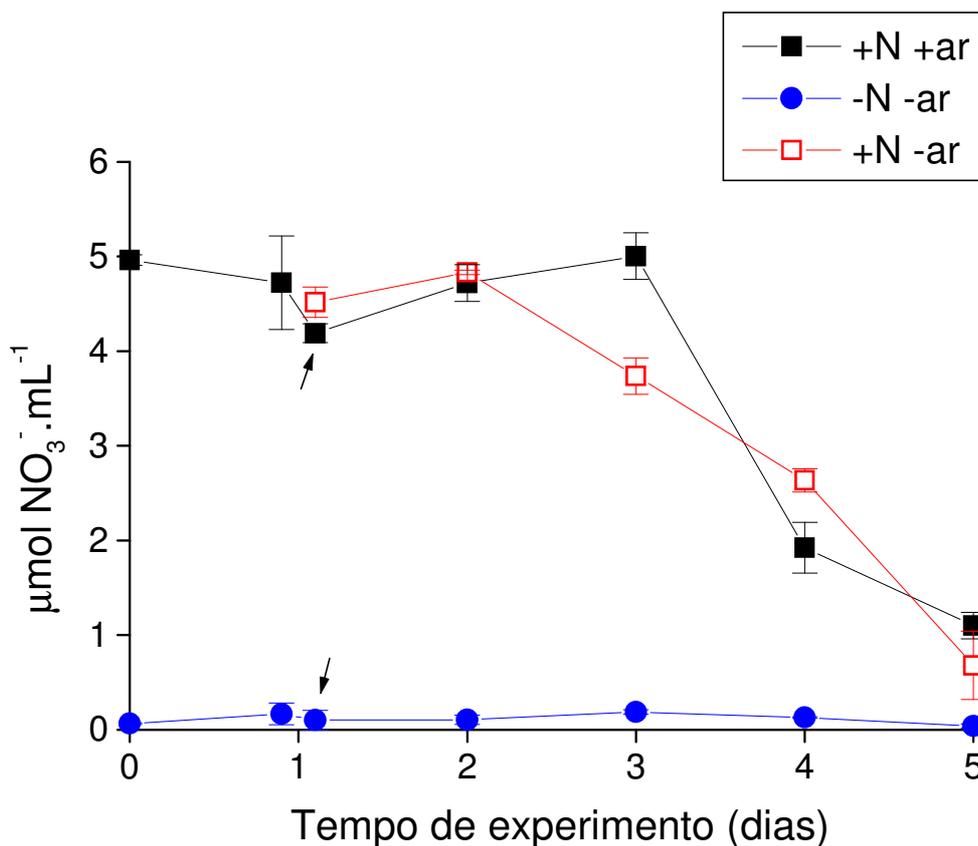


Figura 1. Conteúdo de nitrato presente na solução do vaso das plantas de soja da cultivar IAC-23 não noduladas em hidroponia. Os tratamentos foram: com 5 mM de NO_3^- e aeração “+N+ar” (■); com 0 mM de NO_3^- e sem aeração “-N-ar” imposta no dia 1 (●); com 5 mM de NO_3^- e sem aeração “+N-ar” imposta no dia 1 (□). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia) e as barras representam o erro padrão das médias.

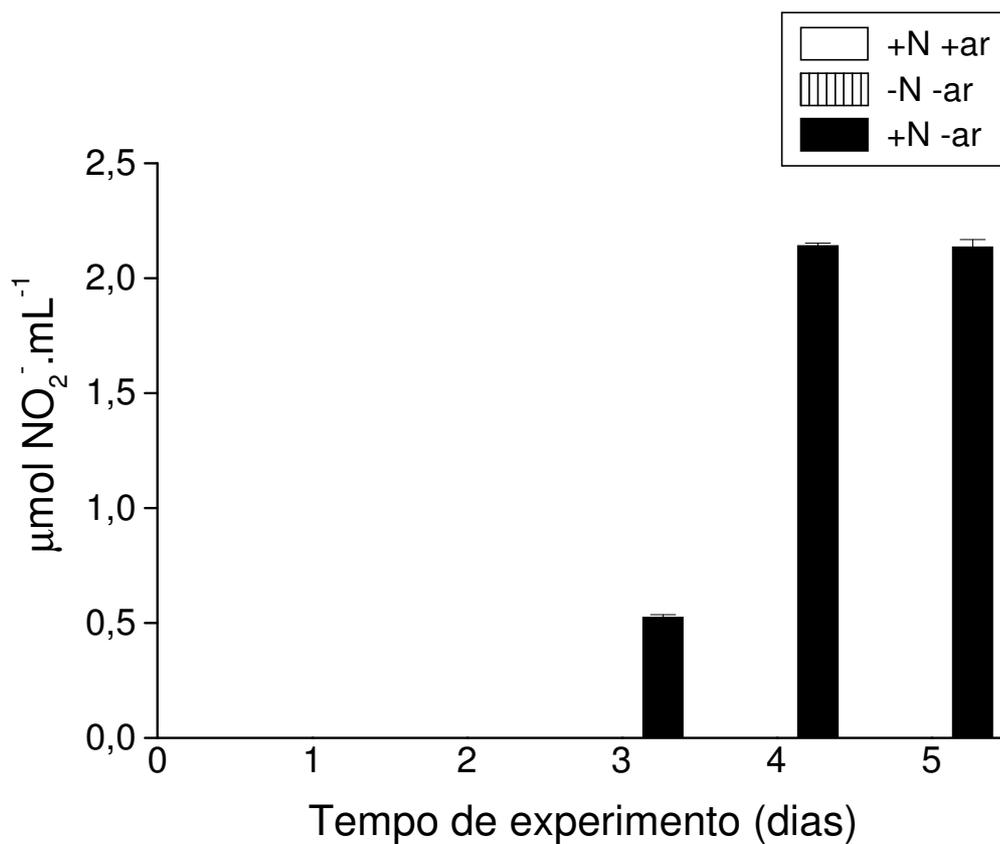


Figura 2. Conteúdo de nitrito presente na solução do vaso de plantas de soja da cultivar IAC-23 não noduladas em hidroponia. Os tratamentos foram: com 5 mM de NO_3^- e com aeração “+N+ar” (\square); com 0 mM de NO_3^- e sem aeração “-N-ar” imposta no dia 1 (III); com 5 mM de NO_3^- e sem aeração “+N-ar” imposta no dia 1 (\blacksquare). As barras representam o erro padrão das médias.

reduziu de $32 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 para $15 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 2, e continuou caindo, chegando a $8 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5 (Figura 3A). Nas raízes das plantas “-N-ar” houve queda para $5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5 (Figura 3A).

O conteúdo de nitrato na seiva do xilema no dia 0 foi de $15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Figura 3B). No dia 1, as plantas “+N+ar” apresentaram redução para $12 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrato, com posterior aumento atingindo $15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Houve redução de $12 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 para $2,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 nas plantas “+N-ar”. Na seiva das plantas “-N-ar” houve queda no conteúdo de nitrato de $15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1. Com a imposição da hipoxia, a redução no conteúdo de nitrato foi mais acentuada que a observada nos outros tratamentos, atingindo $2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrato no dia 2, e $0 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 (Figura 3B).

As folhas das plantas nos tratamentos “+N+ar” e “+N-ar” apresentaram $35 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ de nitrato, no dia 0 não havendo variação até o dia 1. No dia 2, houve aumento seguido de queda para os tratamentos com nitrato (Figura 3C). Para plantas “+N+ar” o aumento de nitrato nas folhas foi de $35 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para $57 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, seguido de redução para $35 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5. Para o tratamento “+N-ar” houve menor aumento no dia 2, de $35 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para $51 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, diminuindo para $10 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5. No tratamento “-N-ar” observou-se nas folhas comportamento semelhante ao visto nas raízes, com redução no conteúdo de nitrato no dia 1, seguido de manutenção nos dias 1 e 2, com $22 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, e redução para $15 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5. (Figura 3C).

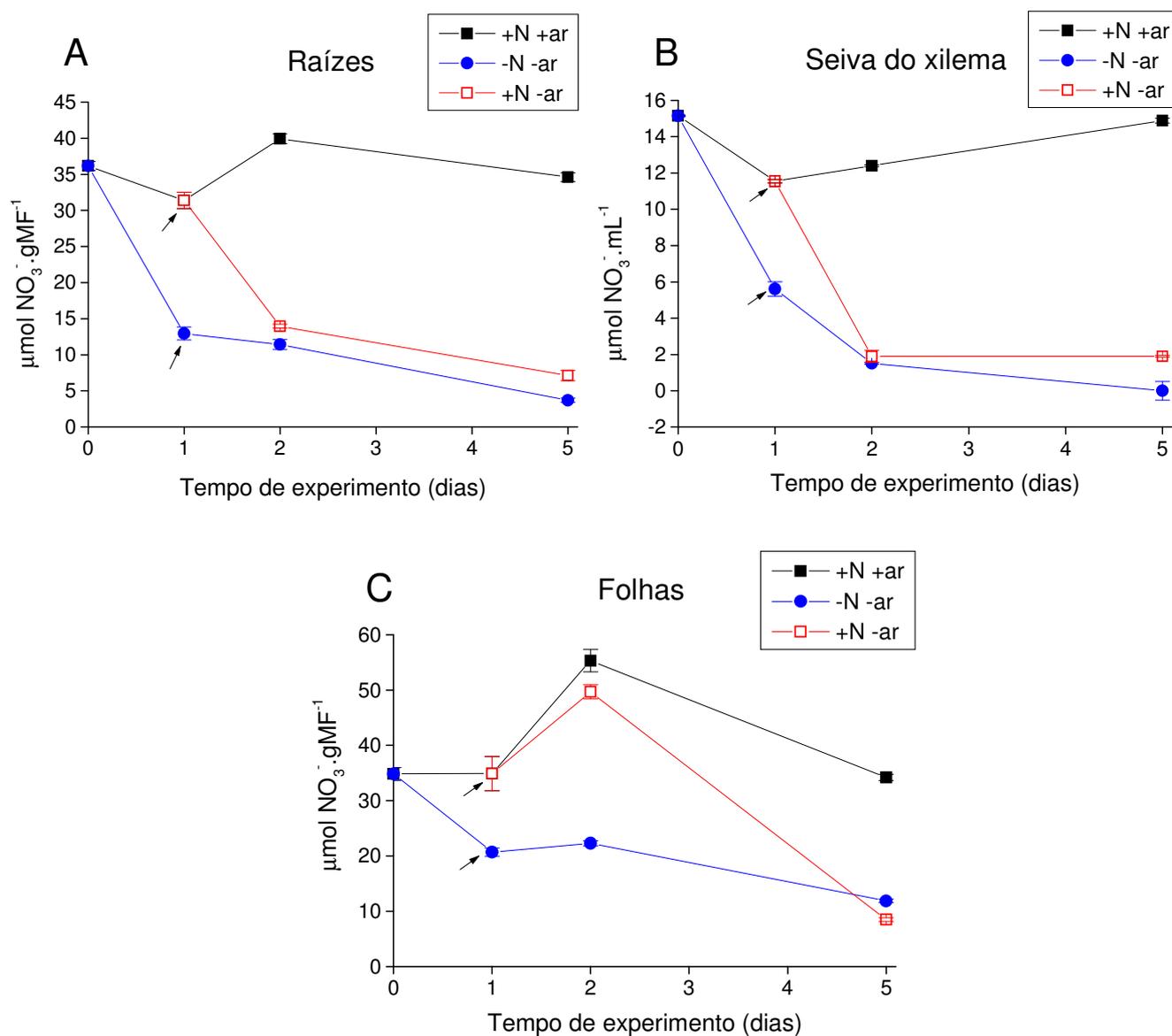


Figura 3. Conteúdo de nitrato presente nas plantas de soja não noduladas da cultivar IAC-23. A: raízes, B: seiva do xilema e C: trifólio mais novo totalmente expandido das folhas das plantas com 5 mM de NO_3^- e aeração “+N+ar” (■); com 0 mM de NO_3^- e sem aeração “-N-ar” imposta no dia 1 (●); com 5 mM de NO_3^- e sem aeração “+N-ar” imposta no dia 1 (□). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia) e as barras representam o erro padrão das médias.

4.1.3. Teor de aminoácidos solúveis totais e composição de aminoácidos livres nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas das plantas submetidas ou não à hipoxia.

Nas raízes, o teor de aminoácidos solúveis totais, no dia 0, foi de $1,6 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, para os três tratamentos testados (Figura 4A). No dia 1, nas raízes dos tratamentos com nitrato houve queda no teor de aminoácidos solúveis totais para $1,4 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$. Para as raízes “+N-ar” o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou para $4,3 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5. Não houve aumento para as raízes no tratamento “+N+ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais manteve-se em $1,4 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ até o dia 5. Nas raízes “-N-ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $1,6 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para $2,9 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ do dia 0 ao dia 1, seguido de queda para $1,4 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5 (Figura 4A).

Os principais aminoácidos encontrados nas raízes no dia 0 foram Asp, Glu e Asn com valores entre 20 e 24% e os aminoácidos Ala e Gaba apresentavam baixos valores, menos de 3% (Tabela 1). Durante o experimento, nas raízes das plantas do tratamento “+N+ar” a composição dos aminoácidos variou pouco, sendo que dos aminoácidos citados a Asn apresentou maior variação, aumentando de 24% para 32% no dia 5. Nas plantas do tratamento “+N-ar” houve aumento no teor de Ala do dia 1 ao dia 2 de 1,9% para 42,9%, chegando a 52,1% no dia 5. O expressivo aumento em Ala foi acompanhado por um declínio acentuado dos três aminoácidos mais abundantes (Asp, Glu e Asn), sendo a maior queda registrada para Asp, que chegou a 2,1%, enquanto que Asn e Glu chegaram a 6,3 e 7,1%, respectivamente, no dia 5 (Tabela 1). No tratamento “-N-ar”, também foi observado expressivo aumento em Ala e queda em Asp, Glu e Asn. A principal diferença entre

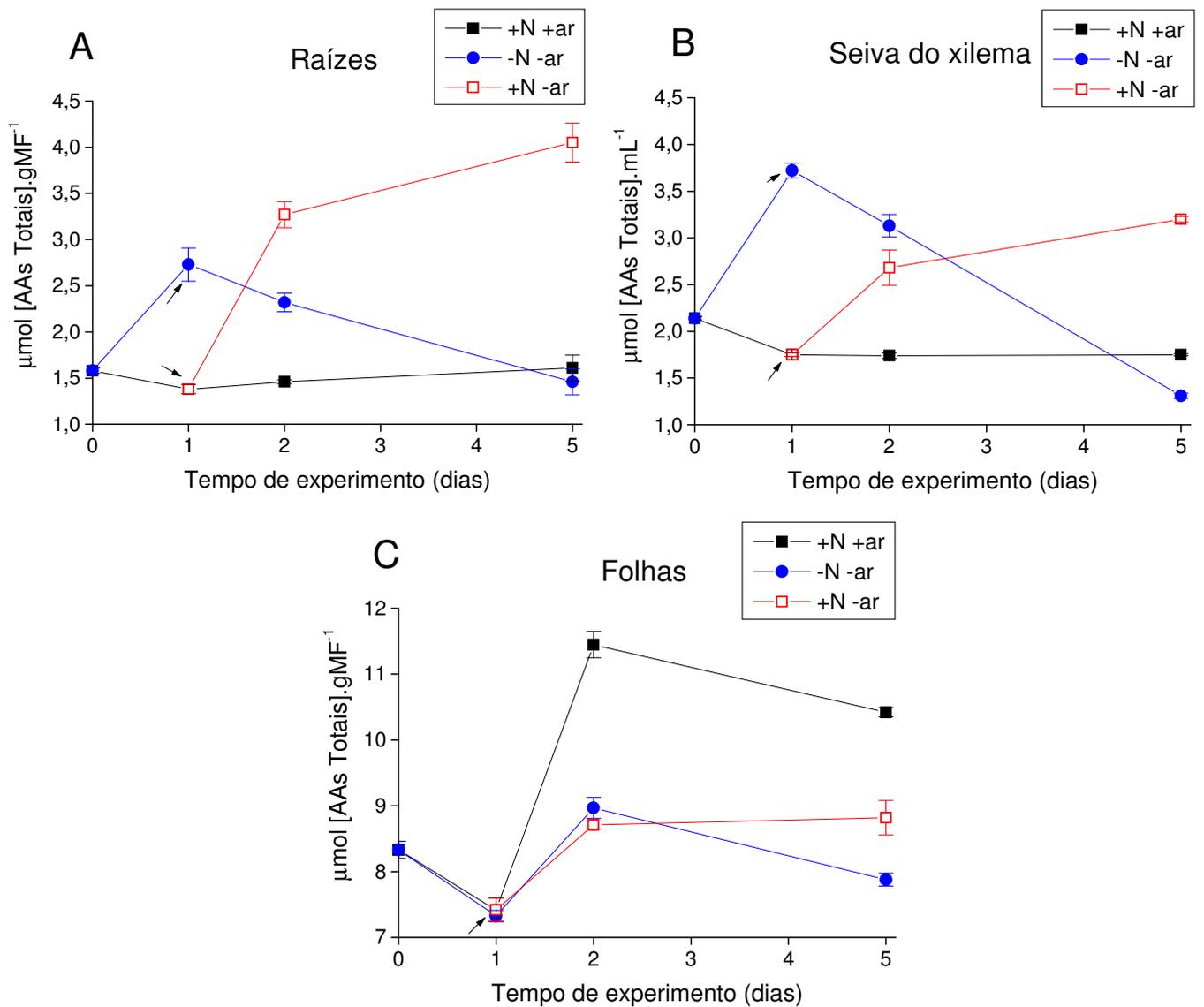


Figura 4. Teor de aminoácidos solúveis totais das plantas de soja da cultivar IAC-23 não noduladas em hidroponia. A: raízes, B: seiva do xilema e C: trifólio mais novo totalmente expandido das folhas das plantas com 5 mM de NO_3^- e aeração “+N+ar” (■); com 0 mM de NO_3^- e sem aeração “-N-ar” imposta no dia 1 (●); com 5 mM de NO_3^- e sem aeração “+N-ar” imposta no dia 1 (□). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia) e as barras representam o erro padrão das médias.

Tabela 1. Composição de aminoácidos (mol%) nas raízes das plantas de soja não noduladas em hidroponia. Todas as plantas foram transferidas para hidroponia na ausência (-N) ou na presença com 5 mM de NO₃⁻ (+N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem aeração (-ar)** por um período de cinco dias. Os valores representam a média das repetições. **Hipoxia induzida no dia 1.

	Dia 0	Dia 1	Dia 1	Dia 2	Dia 2	Dia 2	Dia 5	Dia 5	Dia 5
	+N+ar	+N+ar	-N-ar	+N+ar	-N -ar	+N -ar	+N+ar	-N -ar	+N -ar
ASP	22,8	17,2	16,4	23,5	5,6	0,9	18,0	3,5	2,1
GLU	20,3	21,8	21,0	17,7	19,4	9,4	19,0	12,5	7,1
ASN	24,0	21,0	10,9	23,3	9,2	10,9	32,0	2,4	6,3
SER	7,1	8,4	6,3	5,3	4,4	6,4	8,5	6,8	6,7
GLN	0,8	1,2	0,3	1,1	0,4	0,4	1,3	0,8	4,1
ALA	2,6	1,9	27,2	2,2	44,2	42,9	3,4	29,4	52,1
GABA	1,8	2,8	4,5	1,5	1,5	1,9	1,7	10,8	9,5
Outros*	20,6	25,7	13,4	25,2	14,5	27,9	16,0	33,7	11,9
Total ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$)	1,6	1,4	2,7	1,5	2,3	3,3	1,6	1,5	4,0

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu.

os tratamentos de hipoxia foi um menor aumento de Ala no dia 5 no tratamento “-N-ar” e uma menor queda de Glu. O aminoácido Gaba, assim como a Ala, aumentou no tratamento em hipoxia de aproximadamente 2% no dia 0 para valores em torno de 10% no dia 5 (Tabela 1).

Na seiva do xilema o teor de aminoácidos solúveis totais, no dia 0, foi de $2,1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ em todos os tratamentos testados (Figura 4B). Nos tratamentos com nitrato, do dia 0 ao dia 1, o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu de $2,1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $1,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. A partir do dia 1, nas plantas “+N+ar” o teor de aminoácidos solúveis totais não se alterou até o dia 5. No tratamento “+N-ar” houve aumento do teor de aminoácidos solúveis totais, a partir do dia 1, chegando a $3,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Na seiva do xilema das plantas “-N-ar” do dia 0 ao dia 1, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $2,1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $3,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e posteriormente, reduziu a $1,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 (Figura 4B).

A seiva do xilema das plantas, no dia 0, constituía-se principalmente dos aminoácidos Asp, Asn e Gln que juntos somavam 74,2% dos aminoácidos livres (Tabela 2). A Ala e o Gaba apresentaram valores inferiores a 1% no dia 0. Nas plantas “+N+ar” no dia 5, observou-se variação na composição em relação ao dia 0, principalmente pela redução do Asp de 9,8% para 4,2%. No tratamento “+N-ar” verificou-se do dia 1 ao dia 2 uma queda brusca da Asn de 42% para 15,7%, aumento de Glu de 1,9% para 4,8% e aumento da Ala de 0,9% para 37,3%. No dia 5, os aminoácidos Asn, Glu e Ala constituíam 12,3%, 8% e 43,1% da composição de aminoácidos livres presentes na seiva do xilema, respectivamente (Tabela 2). Perfil semelhante na composição dos aminoácidos foi observado na seiva do xilema das plantas “-N-ar”, com redução da Asn para 5,1%, aumento da Ala para 30,3% e do

Tabela 2. Composição de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema das plantas de soja não noduladas em hidroponia. Todas as plantas foram transferidas para hidroponia na ausência (-N) ou na presença com 5 mM de NO₃⁻ (+N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem aeração (-ar)** por um período de cinco dias. Os valores representam a média das repetições. **Hipoxia induzida no dia 1.

	Dia 0	Dia 1	Dia 1	Dia 2	Dia 2	Dia 2	Dia 5	Dia 5	Dia 5
	+N+ar	+N+ar	-N-ar	+N+ar	-N -ar	+N -ar	+N+ar	-N -ar	+N -ar
ASP	9,8	20,9	43,9	13,8	35,2	12,7	4,2	9,2	8,2
GLU	1,6	1,9	2,7	1,1	8,4	4,8	0,8	17,4	8,0
ASN	59,5	42,0	26,4	49,8	11,6	15,7	60,8	5,1	12,3
SER	1,7	1,8	2,7	0,9	5,8	9,6	0,7	7,2	8,3
GLN	4,9	5,9	1,1	5,7	0,7	1,1	6,9	0,2	2,1
ALA	0,6	0,9	3,2	0,4	13,7	37,3	0,3	30,3	43,1
GABA	0,7	1,7	1,3	0,8	5,7	4,4	0,6	3,9	3,0
Outros*	21,2	24,7	18,6	27,5	18,8	14,4	25,7	26,6	15,1
Total ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	2,1	1,7	3,7	1,7	3,1	2,7	1,7	1,3	3,2

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu.

Gaba para 3,9% no dia 5.

Nas folhas, o teor de aminoácidos solúveis totais no dia 0 foi de $8,3 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para os três tratamentos (Figura 4C). O teor de aminoácidos solúveis totais reduziu, de $8,3 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para $7,6 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, do dia 0 para o dia 1, nos três tratamentos, seguido de aumento no dia 2. No tratamento “+N+ar”, no dia 2, o teor de aminoácidos solúveis totais foi de $11,75 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ e no dia 5, de $10,8 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$. Nas folhas das plantas submetidas ao tratamento “+N-ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais foi de $8,9 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 2 e manteve-se no dia 5. O teor de aminoácidos solúveis das plantas “-N-ar” no dia 2 foi de $9,2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ e reduziu a $8,1 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5 (Figura 4C).

Nas folhas, no dia 0, os aminoácidos mais representativos foram o Asp, o Glu e a Ala que juntos constituíram 65,3% dos aminoácidos presentes (Tabela 3). Ao longo do experimento, no tratamento “+N+ar” algumas modificações na composição dos aminoácidos foram observadas, entretanto, pouco influenciaram na composição de aminoácidos das folhas. Nas folhas das plantas do tratamento “+N-ar” houve aumento no teor de Gaba de 9% para 16,6% no dia 2, assim com redução de Asn de 8,3% para 7,6% e do Asp de 15,8% para 14,6%. No dia 5, estes aminoácidos constituíram 15,8%, 2,6% e 11,2%, respectivamente, dos aminoácidos nas folhas (Tabela 3). Nas plantas “-N-ar” foram observadas alterações na composição dos aminoácidos Asp e Ala no dia 1, com redução de 28,6% para 19,3% do Asp e aumento de 9,8% para 16,8% da Ala. A partir do dia 1, houve queda na quantidade de Asp de 19,3% para 8,5%, e o Gaba destacou-se com aumento de 5,8% para 19,4%. No dia 5, os aminoácidos Asp, Ala e Gaba sofreram leves modificações na sua representação na composição dos aminoácidos, em contra partida a Asn e a Gln

Tabela 3. Composição de aminoácidos (mol%) no trifólio mais novo totalmente expandido das folhas das plantas de soja não noduladas em hidroponia. Todas as plantas foram transferidas para hidroponia na ausência (-N) ou na presença com 5 mM de NO_3^- (+N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem aeração (-ar)** por um período de cinco dias. Os valores representam a média das repetições.
**Hipoxia induzida no dia 1.

	Dia 0	Dia 1	Dia 1	Dia 2	Dia 2	Dia 2	Dia 5	Dia 5	Dia 5
	+N+ar	+N+ar	-N-ar	+N+ar	-N -ar	+N -ar	+N+ar	-N -ar	+N -ar
ASP	28,6	15,8	19,3	21,6	8,5	14,6	28,7	12,5	11,2
GLU	26,9	23,5	29,3	27,6	23,8	24,4	28,4	28,7	30,9
ASN	4,2	8,3	3,5	1,9	4,1	7,6	5,1	2,8	2,6
SER	8,3	10,9	9,8	12,4	10,6	9,6	5,8	7,8	9,8
GLN	3,7	3,6	4,0	2,6	3,3	3,0	0,1	1,8	1,9
ALA	9,8	12,4	16,8	12,9	16,9	13,7	12,3	16,6	17,6
GABA	6,3	9,0	5,8	11,1	19,4	16,6	8,3	17,6	15,8
Outros*	12,4	16,5	11,3	9,8	13,4	10,4	11,4	12,1	10,3
Total ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$)	8,3	7,42	7,3	11,4	9,0	8,7	10,4	7,9	8,8

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu.

destacaram-se com redução de 4,1 para 2,8% e de 3,3 para 1,8%, respectivamente (Tabela 3).

4.2. Experimento II. O nitrato e seu metabolismo nas plantas de soja não noduladas em condições de hipoxia.

Neste experimento, novos tratamentos foram adicionados no intuito de auxiliar na conclusão dos resultados obtidos anteriormente, principalmente, sobre a atuação do nitrato quando adicionado posteriormente à imposição de hipoxia.

Plantas não noduladas, em estágio V4 de desenvolvimento, foram transferidas para hidroponia em presença de nitrato e mantidas durante sete dias para a adaptação. Os tratamentos realizados foram: plantas sem nitrato e com aeração “-N+ar”, plantas sem nitrato e sem aeração “-N-ar”, plantas com nitrato e com aeração “+N+ar”, plantas com nitrato e sem aeração “+N-ar” e plantas sem nitrato nos dias 0 e 1, com adição de nitrato no dia 2 e sem aeração “+N(adição)-ar”. No dia 0, essas plantas foram separadas em vasos com 0 mM ou 5 mM de nitrato de acordo com cada tratamento. No dia 1, houve troca da solução do vaso e a aeração foi suspensa de acordo com os tratamentos. No dia 2 foi adicionado nitrato na concentração de 5 mM para o tratamento “+N(adição)-ar”. Do dia 0 ao dia 1, os tratamentos “+N+ar” e “+N-ar” estavam submetidos às mesmas condições com nitrato e com aeração, assim como os tratamentos “-N+ar” e “-N-ar”. As coletas da solução do vaso foram realizadas diariamente (inclusive antes e logo depois da troca da solução nos dias 1 e 2) e em seguida analisados os conteúdos de nitrato e nitrito, enquanto que as coletas de raízes, seiva do xilema e folhas foram feitas nos dias 0,

1, 2 e 5. As análises realizadas foram: conteúdo de nitrato, teor de aminoácidos solúveis totais e proteínas solúveis totais nas raízes, seiva do xilema e folhas.

4.2.1. Consumo de nitrato e conteúdo de nitrito na solução do vaso.

Nos dias 0 e 1, o conteúdo de nitrato nos tratamentos com nitrato foi mantido em $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ pela troca da solução nutritiva (Figura 5). A partir do dia 2, o conteúdo de nitrato reduziu até o dia 5, nos tratamentos com nitrato. No tratamento “+N+ar”, no dia 5, o conteúdo de nitrato foi de $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e no tratamento “+N-ar”, o conteúdo de nitrato foi de $0,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Nos tratamentos sem nitrato foram observados apenas traços de nitrato durante os cinco dias de experimento (Figura 5).

A adição de nitrato, para o tratamento “+N(adição)-ar”, promoveu a concentração de $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, com redução do conteúdo de nitrato a partir do dia 2, chegando a $2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Estes dados mostram claramente que o consumo de nitrato ocorre após o sistema ter entrado em hipoxia.

O conteúdo de nitrito foi observado na solução do vaso apenas nos tratamentos onde havia nitrato a partir do 3º dia de experimento (Figura 6). Na presença de aeração apenas traços de nitrito foram observados no tratamento “+N+ar”, nos dias 4 e 5. No tratamento “+N-ar”, o conteúdo de nitrito no dia 3 foi de $0,32 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e em seguida aumentou para $0,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. A adição de nitrato, tratamento “+N(adição)-ar”, promoveu $0,08 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrito no dia 3 e aumento para $1,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 (Figura 6). É interessante observar que este valor é bem mais baixo do que a quantidade de nitrato consumido, em torno de 3 a $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Figura 5). Portanto, a maior parte do nitrato consumido não acumulou na forma de nitrito.

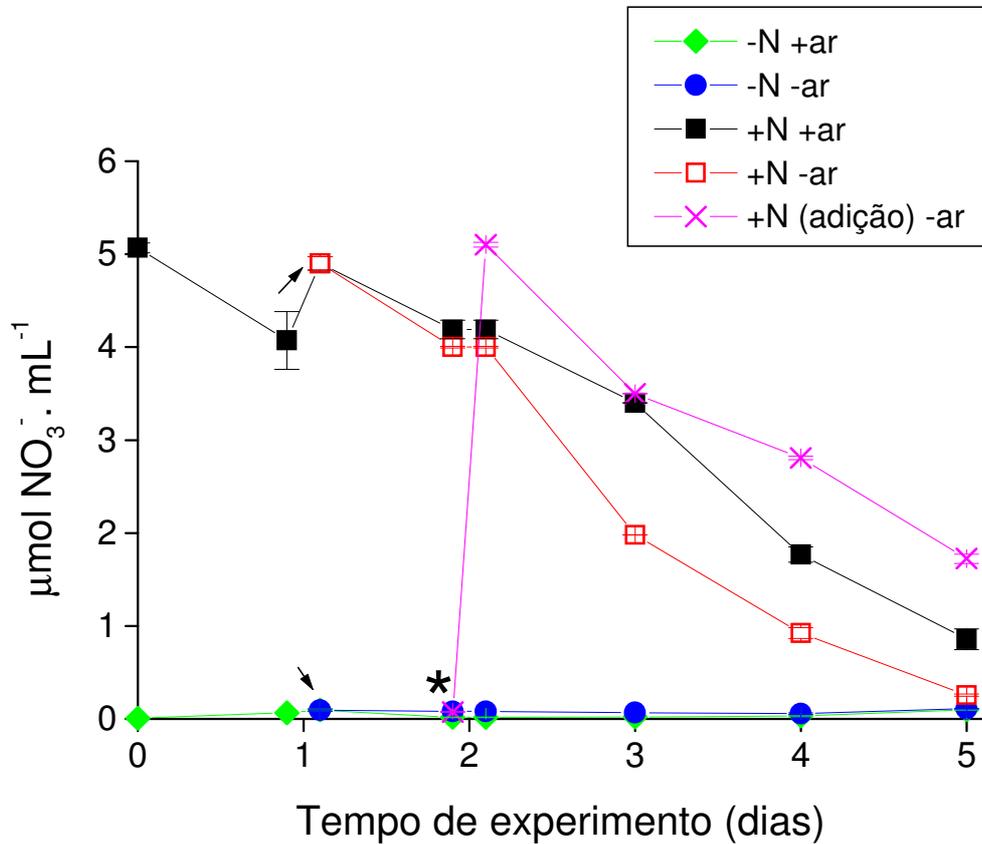


Figura 5. Conteúdo de nitrato na solução nutritiva das plantas de soja em sistema hidropônico com e sem aeração. Os tratamentos foram: com 0 mM de NO_3^- e aeração “-N+ar” (◆); com 0 mM de NO_3^- e sem aeração “-N-ar” imposta no dia 1 (●); com 5 mM de NO_3^- e aeração “+N+ar” (■); com 5 mM de NO_3^- e sem aeração “+N-ar” imposta no dia 1 (□); com 5 mM de NO_3^- adicionado no dia 2 e sem aeração “+N(adição)-ar” imposta no dia 1 (X). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia), o asterisco mostra a adição de nitrato e as barras representam o erro padrão das médias.

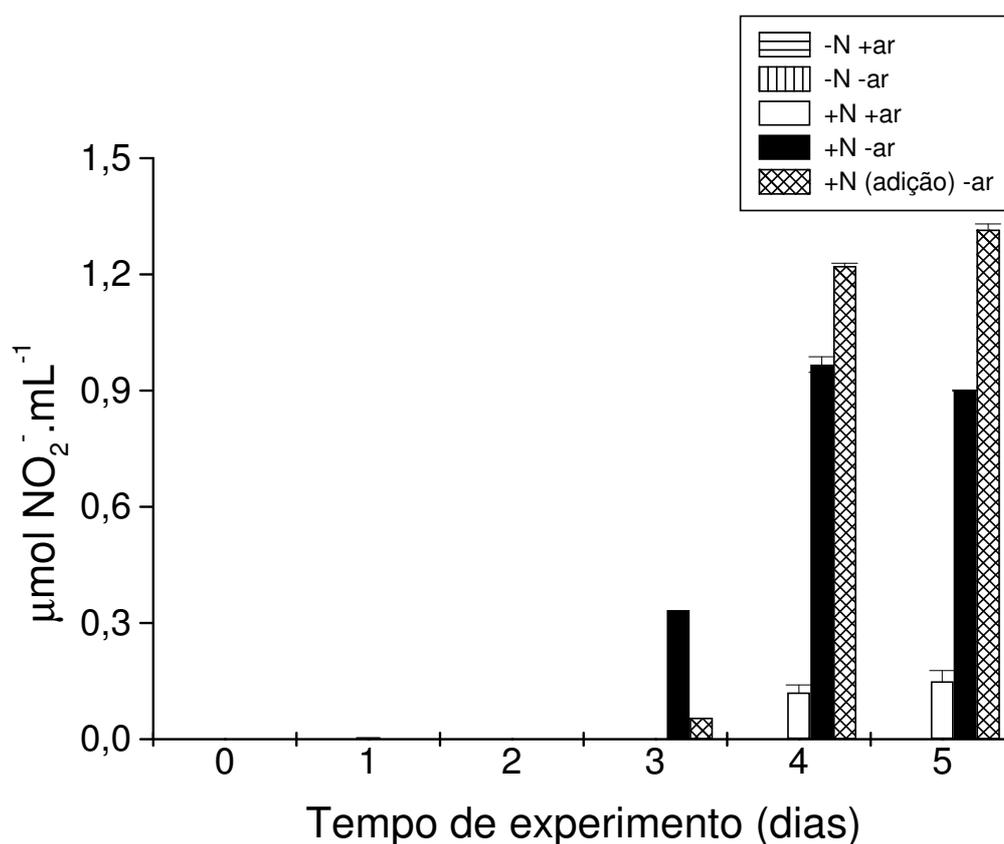


Figura 6. Conteúdo de nitrito presente na solução do vaso das plantas de soja da cultivar IAC-23 não noduladas em hidroponia. Os tratamentos foram: 0 mM de NO_3^- e com aeração “-N+ar” (\equiv); com 0 mM de NO_3^- e sem aeração “-N-ar” imposta no dia 1 (|||); com 5 mM de NO_3^- e com aeração “+N+ar” (\square); 5 mM de NO_3^- e sem aeração “+N-ar” imposta no dia 1 (\blacksquare); com adição de 5 mM de NO_3^- no dia 2 e sem aeração “+N(adição)-ar” imposta no dia 1 (\boxtimes). As barras representam o erro padrão das médias.

4.2.2. O conteúdo de nitrato nas raízes, na seiva do xilema e nas folhas das plantas de soja.

O conteúdo de nitrato nas raízes, no dia 0, foi de $400 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ (Figura 7A). Nos tratamentos com nitrato houve aumento no conteúdo de nitrato de $400 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ para $510 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1. No dia 5, o conteúdo de nitrato foi de $400 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$. A partir do dia 1, o conteúdo de nitrato nas plantas "+N-ar" reduziu para $250 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ e chegou a $100 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. Nas raízes das plantas "-N+ar", o conteúdo de nitrato caiu de $400 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 0 para $80 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1. O conteúdo de nitrato manteve-se em $80 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ até o dia 2 e reduziu a $0 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. No tratamento "-N-ar" o conteúdo de nitrato manteve-se em $80 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ do dia 1 com redução a $0 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. De modo geral, estes dados demonstram uma mobilização do nitrato endógeno das raízes na ausência de nitrato no meio (Figura 7A). No tratamento "+N(adição)-ar" foi detectado nitrato, em torno de $80 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$, apenas no dia 2, quando este foi adicionado seguido de manutenção no dia 5. Este dado indica a absorção de nitrato pela raiz sob hipoxia e está coerente com a queda do nitrato observada no meio (ver este mesmo tratamento na figura 5).

O conteúdo de nitrato na seiva do xilema foi de $3,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Figura 7B), no dia 0. Nas plantas "+N+ar" o conteúdo de nitrato manteve-se em $3,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ do dia 0 ao dia 1, e atingiu $3,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5, coincidindo com o observado nas raízes. O conteúdo de nitrato, a partir do dia 1, nas plantas "+N-ar" reduziu, chegando a $0,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Evidentemente, a hipoxia reduziu fortemente o transporte de nitrato pelo xilema. Na seiva do xilema das plantas "-N+ar", o conteúdo de nitrato reduziu de $3,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $0,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ do dia 0 para o dia 1, manteve-se

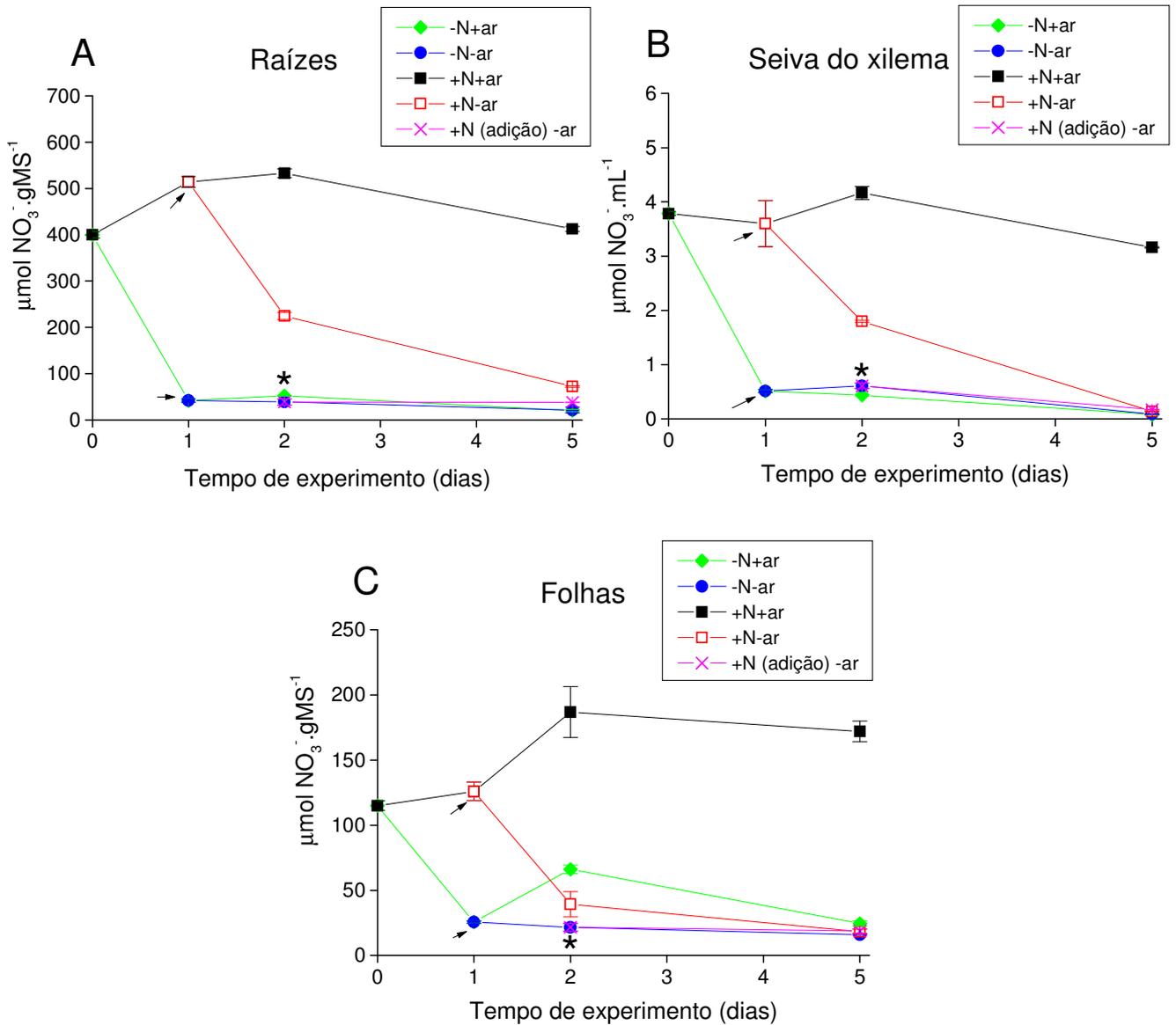


Figura 7. Conteúdo de nitrato nas plantas de soja em sistema hidropônico com e sem aeração. A: raízes; B: seiva do xilema e C: folhas (trifólio mais novo totalmente expandido). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia), o asterisco mostra a adição de nitrato e as barras representam o erro padrão das médias.

praticamente inalterado no dia 2 e sofreu pequena redução, caindo para a $0,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 (Figura 7B). Nas plantas do tratamento “-N-ar”, o conteúdo de nitrato do dia 0 ao dia 1 reduziu de $3,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $0,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, onde manteve-se até o dia 5. No tratamento “+N(adição)-ar”, o conteúdo de nitrato na seiva do xilema foi de $0,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 2 e de $0,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 (Figura 7B).

O conteúdo de nitrato nas folhas, no dia 0, foi de $115 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ (Figura 7C). Nas plantas com nitrato, o conteúdo deste chegou a $135 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1. No tratamento “+N+ar”, o conteúdo de nitrato aumentou de $115 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1 para $205 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2. No dia 5 o valor observado foi de $185 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ (Figura 7C). Nas plantas “+N-ar”, o conteúdo de nitrato reduziu de $135 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1 para $50 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2, com redução para $25 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. Nas folhas das plantas sem nitrato houve queda brusca e imediata no conteúdo de nitrato, com redução de $115 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ para $30 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1. Posteriormente, nas plantas do tratamento “-N+ar” o conteúdo de nitrato aumentou de $30 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ para $75 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2, com posterior redução no dia 5. O conteúdo de nitrato das plantas do tratamento “-N-ar” a partir do dia 1 manteve-se em $25 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ até o dia 5. No tratamento “+N(adição)-ar”, o conteúdo de nitrato foi de $25 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 e no dia 5.

4.2.3. Teor de aminoácidos solúveis totais nas plantas de soja.

Nas raízes, o teor de aminoácidos solúveis totais foi de $16,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 0 (Figura 8A). A partir do dia 0, nas plantas “+N+ar” o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou para $19 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ e posteriormente reduziu para aproximadamente $12 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5, de forma semelhante ao observado no

conteúdo de nitrato nas raízes (figura 7A). Nas plantas "+N-ar", o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $16,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 0 para $24 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 e diminuiu para $15,8 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. Aparentemente, na presença de nitrato, houve maior síntese ou acúmulo de aminoácidos em hipoxia do que em normoxia. Nas raízes das plantas dos tratamentos sem nitrato o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $16,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 0 para $17 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1 (Figura 8A). A partir do dia 1, nas plantas "-N+ar" o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou para $20,8 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 e reduziu para $11 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. Nas plantas "-N-ar" o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu $14,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 seguido de posterior queda para $13,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. No tratamento "+N(adição)-ar", o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $14,6 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 para $18 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5 (Figura 8A). O aumento no dia 5 observado no tratamento "+N(adição)-ar" pode estar relacionado com a diminuição no conteúdo de nitrato nas raízes em decorrência da assimilação do nitrato em aminoácidos.

Na seiva do xilema, o teor de aminoácidos solúveis totais foi de $3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 0 (Figura 8B). Nas plantas "+N+ar" o teor de aminoácidos solúveis totais caiu para $2,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1, manteve-se no dia 2 e com subsequente queda para $1,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. No tratamento "+N-ar" o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $2,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 para $3,2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 2, e reduziu a $1,75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Na seiva do xilema das plantas "-N+ar" o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu de $3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $0,7 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ do dia 0 ao dia 1 e aumentou para $1,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 2, com posterior redução para $0,7 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5. Esta redução pode estar relacionada à queda no transporte

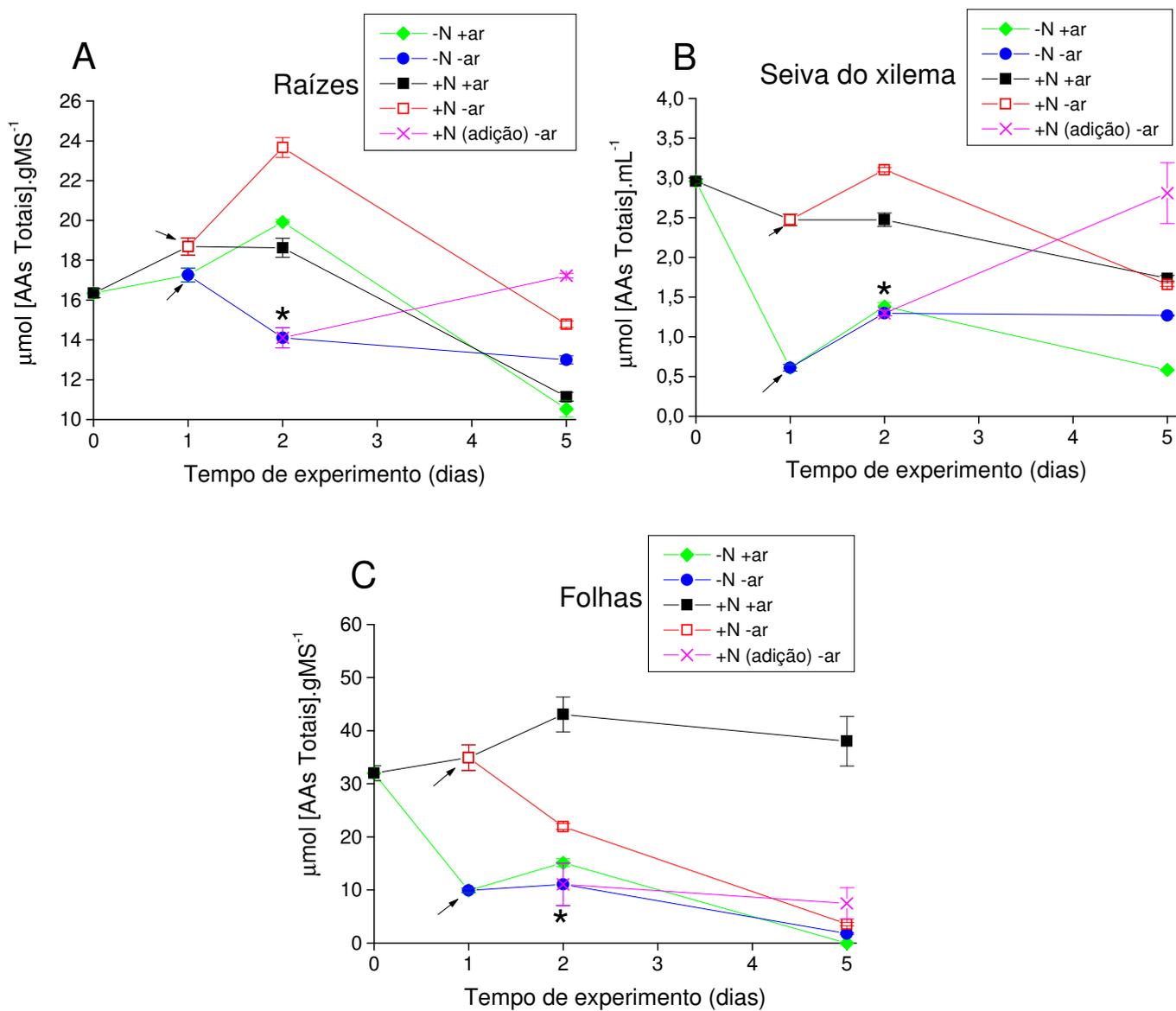


Figura 8. Teor de aminoácidos solúveis totais nas plantas de soja da cultivar IAC-23 em hidroponia com e sem aeração. A: raízes; B: seiva do xilema e C: folhas (trifólio mais novo totalmente expandido). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia), o asterisco mostra a adição de nitrato e as barras representam o erro padrão das médias.

de nitrato (ver figura 7B). A partir do dia 1, nas plantas “-N-ar” houve aumento no teor de aminoácidos solúveis totais de $0,7 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para $1,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 2 e no dia 5. No dia 2, as plantas do tratamento “+N(adição)-ar” apresentaram $1,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de teor de aminoácidos solúveis totais, seguido de aumento para $3,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 5 (Figura 8B).

No dia 0, o teor de aminoácidos solúveis totais nas folhas foi de $30,4 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ (Figura 8C). Nas plantas com nitrato na solução do vaso verificou-se manutenção no teor de aminoácidos solúveis totais do dia 0 ao dia 1. Nas plantas “+N+ar” o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou para $46 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 e valor semelhante foi observado também no dia 5. No tratamento “+N-ar” o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu de $37 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1 para aproximadamente $25 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 2 e para $5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. Este perfil esteve bastante próximo àquele observado para o conteúdo de nitrato nas folhas (ver figura 7C). Nas folhas das plantas “-N+ar” o teor de aminoácidos solúveis reduziu de $30,4 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ para $11 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ do dia 0 ao dia 1 e chegou a $0 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. O pequeno aumento no teor de aminoácidos solúveis totais, no dia 2, coincidiu com o conteúdo de nitrato observado nas folhas para este mesmo tratamento (Figura 7C). No tratamento “-N-ar” o teor de aminoácidos solúveis totais foi de $11 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 1 e de $2 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ no dia 5. Nas folhas das plantas do tratamento “+N(adição)-ar” o teor de aminoácidos totais foi de $11 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ nos dias 2 e 5 (Figura 8C).

4.2.4. Conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes e folhas das plantas de soja.

O conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes das plantas manteve-se constante em todos os tratamentos com valores médios de $87,5 \text{ mg.gMS}^{-1}$ do dia 0 ao dia 1, com posterior aumento para valores entre 91 e 95 mg.gMS^{-1} no dia 2. Em geral, o conteúdo de proteínas solúveis totais no tratamento “-N+ar” foi maior quando comparado ao tratamento “-N-ar”. O tratamento “-N-ar” não diferiu dos demais tratamentos testados (Figura 9A). No dia 5, as plantas do tratamento “+N+ar” mantiveram o conteúdo de proteínas solúveis totais em $95,5 \text{ mg.gMS}^{-1}$, as plantas “+N-ar” apresentaram redução para 90 mg.gMS^{-1} , as plantas “-N+ar” apresentaram aumento para $97,5 \text{ mg.gMS}^{-1}$ e nas plantas “-N-ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais manteve-se em 93 mg.gMS^{-1} . Com a adição de nitrato “+N(adição)-ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais aumentou para aproximadamente 98 mg.gMS^{-1} no dia 5 (Figura 9A).

O conteúdo de proteínas solúveis totais nas folhas apresentou comportamento diferente do encontrado nas raízes. No dia 0, o conteúdo de proteínas solúveis totais nas folhas foi de 21 mg.gMS^{-1} (Figura 9B). No tratamento “+N+ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais reduziu para $19,5 \text{ mg.gMS}^{-1}$ no dia 1, mantendo-se no dia 2 e chegando 24 mg.gMS^{-1} no dia 5. Nas folhas das plantas “+N-ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais aumentou de $19,5 \text{ mg.gMS}^{-1}$ no dia 1 para 30 mg.gMS^{-1} no dia 5. Nas folhas das plantas dos tratamentos sem nitrato, houve ligeiro aumento de 21 mg.gMS^{-1} para 23 mg.gMS^{-1} do dia 0 ao dia 2. No tratamento “-N+ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais reduziu para 20 mg.gMS^{-1} no dia 5. Para o tratamento “-N-ar” a quantidade manteve-se constante, em 23 mg.gMS^{-1} ao passo que para o

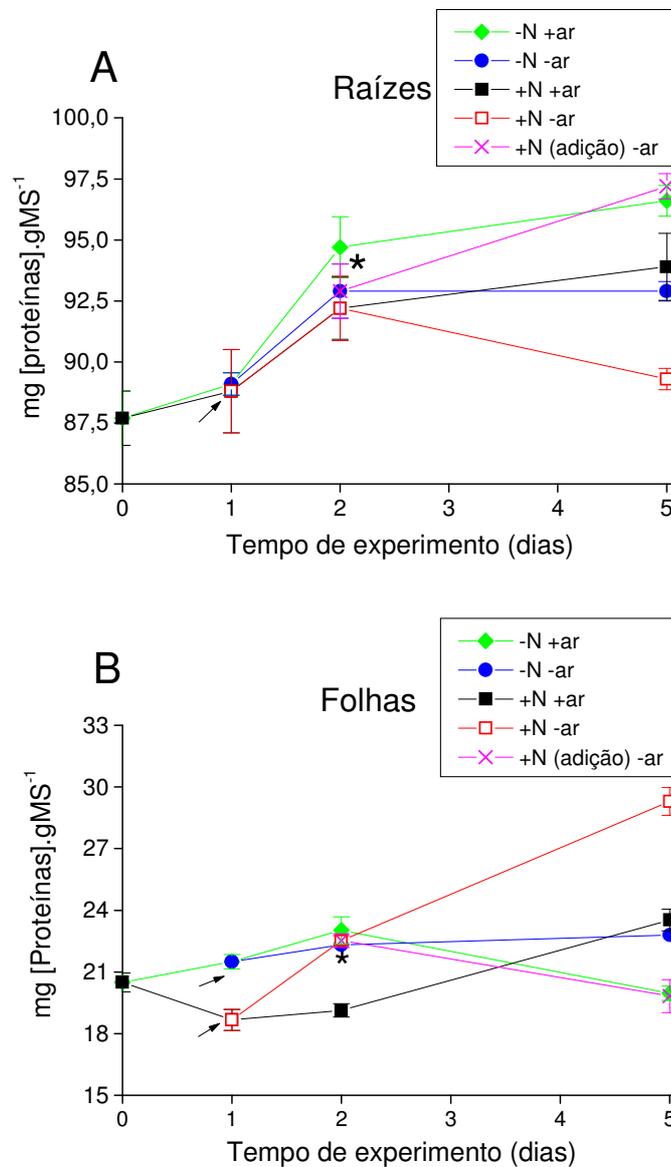


Figura 9. Conteúdo de proteínas solúveis totais nas plantas de soja da cultivar IAC-23 em hidroponia com e sem aeração. A: raízes e B: folhas (trifólio mais novo totalmente expandido). As setas indicam a retirada da aeração (início da hipoxia), o asterisco mostra a adição de nitrato e as barras representam o erro padrão das médias.

tratamento "+N(adição)-ar" o conteúdo de proteínas solúveis totais reduziu para 20 mg.gMS⁻¹, no dia 5. De modo geral, em todos os tratamentos exceto o "+N-ar", houve pouca variação no conteúdo de proteína solúveis totais das folhas (Figura 9B).

4.3. Experimento III. O nitrato e seu metabolismo nas plantas de soja noduladas em condições de hipoxia.

A presença de nitrato endógeno nas plantas não noduladas dificulta a interpretação de dados de adição de nitrato durante a hipoxia, porque não se sabe se o metabolismo observado é resultado do nitrato endógeno, do nitrato adicionado no meio ou de ambos. Visando responder esta questão foram utilizadas plantas noduladas neste experimento, que cresceram na ausência de nitrato. Nas plantas noduladas, a fonte de nitrogênio utilizada é o amônio proveniente da fixação biológica do nitrogênio molecular. Assim sendo, podemos assumir que todo nitrato observado na planta será proveniente de adição do mesmo.

As plantas foram cultivadas em vermiculita e no dia 0 os tratamentos foram montados. Os tratamentos realizados foram: plantas mantidas na vermiculita sem nitrato "V-N", plantas transferidas para hidroponia sem nitrato e com aeração "H-N+ar", plantas transferidas para hidroponia com 5 mM de nitrato adicionado no dia 1 e sem aeração "H+N(adição)-ar" e plantas colocadas em hidroponia sem nitrato e sem aeração "H-N-ar". No dia 0, algumas plantas foram mantidas em vermiculita. Outras plantas foram transferidas para hidroponia, e foi adicionada solução nutritiva contendo ou não nitrato, dependendo do tratamento, e adicionado óleo mineral na solução do vaso para a imposição da hipoxia. No dia 1, foi adicionado 5 mM de NO₃⁻ no tratamento "H+N(adição)-ar". Até o dia 1, os tratamentos "H-N-ar" e

“H+N(adição)-ar” estavam submetidos às mesmas condições. As coletas da solução do vaso foram feitas diariamente e em seguida analisados os conteúdos de nitrato e de nitrito. As coletas de raízes, nódulos, seiva do xilema e folhas foram realizadas nos dias 0, 1 e 4. As análises realizadas foram: conteúdo de nitrato, conteúdo de nitrito, teor de aminoácidos solúveis totais, composição de aminoácidos livres, conteúdo de proteínas solúveis totais e conteúdo de ureídeos totais nas raízes, nódulos, seiva do xilema e folhas.

4.3.1. O nitrato na solução do vaso, nas raízes, nódulos, seiva do xilema e folhas das plantas de soja.

Como esperado, não foi observado nitrato na solução do vaso dos tratamentos sem nitrato, exceto pelos traços verificados no dia 2, nas plantas com aeração (Figura 10). No tratamento “H+N(adição)-ar” o conteúdo de nitrato foi de $5,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1, reduzindo para $1,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ nos dias 2 e 3 e aumentando para $3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4 (Figura 10).

Nas raízes, o conteúdo de nitrato foi de $1 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 0 para as plantas dos três tratamentos, apesar das plantas terem sido cultivadas sem adição de nitrato (Figura 11A). Este conteúdo de nitrato foi mais de 10 vezes menor que o observado nas plantas não noduladas cultivadas com nitrato no experimento anterior, o que comprova a eficiência da utilização de plantas noduladas (Figura 7A). Provavelmente, a fonte deste nitrato seja a água usada no preparo da solução nutritiva. O conteúdo de nitrato das plantas “V-N” manteve-se em torno de $1 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ durante os quatro dias de experimento. As plantas que foram transferidas para hidroponia apresentaram aumento no conteúdo de nitrato para

1,6 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1. A partir do dia 1, as plantas “H-N+ar” e as plantas “H-N-ar” mantiveram o conteúdo de nitrato em 1,6 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ até o dia 4 e as plantas “H+N(adicação)-ar” apresentaram aumento no conteúdo de nitrato para 3,6 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Apesar de ser um teor relativamente baixo, o resultado indica absorção de nitrato do meio (Figura 11A).

Nos nódulos, o conteúdo de nitrato foi de 3,75 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (também considerado traços) no dia 0 e reduziu no dia 1 para valores em torno de 3,25 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nos 4 tratamentos testados (Figura 11B). A partir do dia 1, o conteúdo de nitrato reduziu nas plantas “V-N” e nas plantas “H-N+ar” de 3,25 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para 2,75 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas “H-N-ar”, o conteúdo de nitrato reduziu de 3,25 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 para 2,9 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Nos nódulos das plantas “H+N(adicação)-ar”, o conteúdo de nitrato aumentou de 3,25 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 para 4 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4 (Figura 11B).

O conteúdo de nitrato na seiva do xilema foi muito baixo nas plantas noduladas em relação ao observado nas plantas não noduladas (Figuras 2C e 7B). No dia 0, o conteúdo de nitrato foi de 0,24 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ na seiva das plantas (Figura 11C). Nas plantas “V-N”, o conteúdo de nitrato reduziu para 0,18 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 e para 0,11 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4. No dia 1, as plantas em hidroponia apresentaram 0,24 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de nitrato assim como no dia 0. A partir do dia 1, as plantas “H-N+ar” apresentaram aumento no conteúdo de nitrato para 0,48 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4, e as plantas “H-N-ar” apresentaram redução para 0,09 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas “H+N(adicação)-ar” o conteúdo de nitrato aumentou de 0,24 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 para 0,78 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4 (Figura 11C). Este aumento, embora discreto, está de

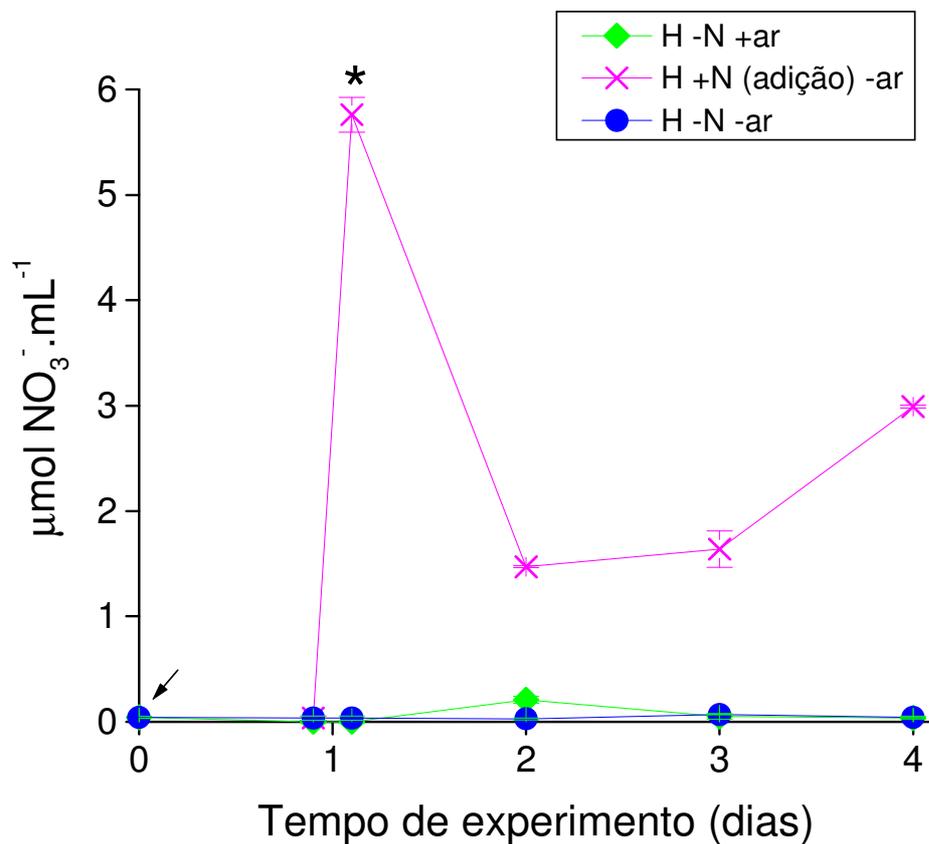


Figura 10. Conteúdo de nitrato na solução do vaso das plantas de soja noduladas. Plantas em hidroponia sem nitrato e com aeração “H-N+ar” (◆), em hidroponia com nitrato adicionado no dia 1 e sem aeração “H+N(adição)-ar” (X) e em hidroponia sem nitrato e sem aeração “H-N-ar” (●). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

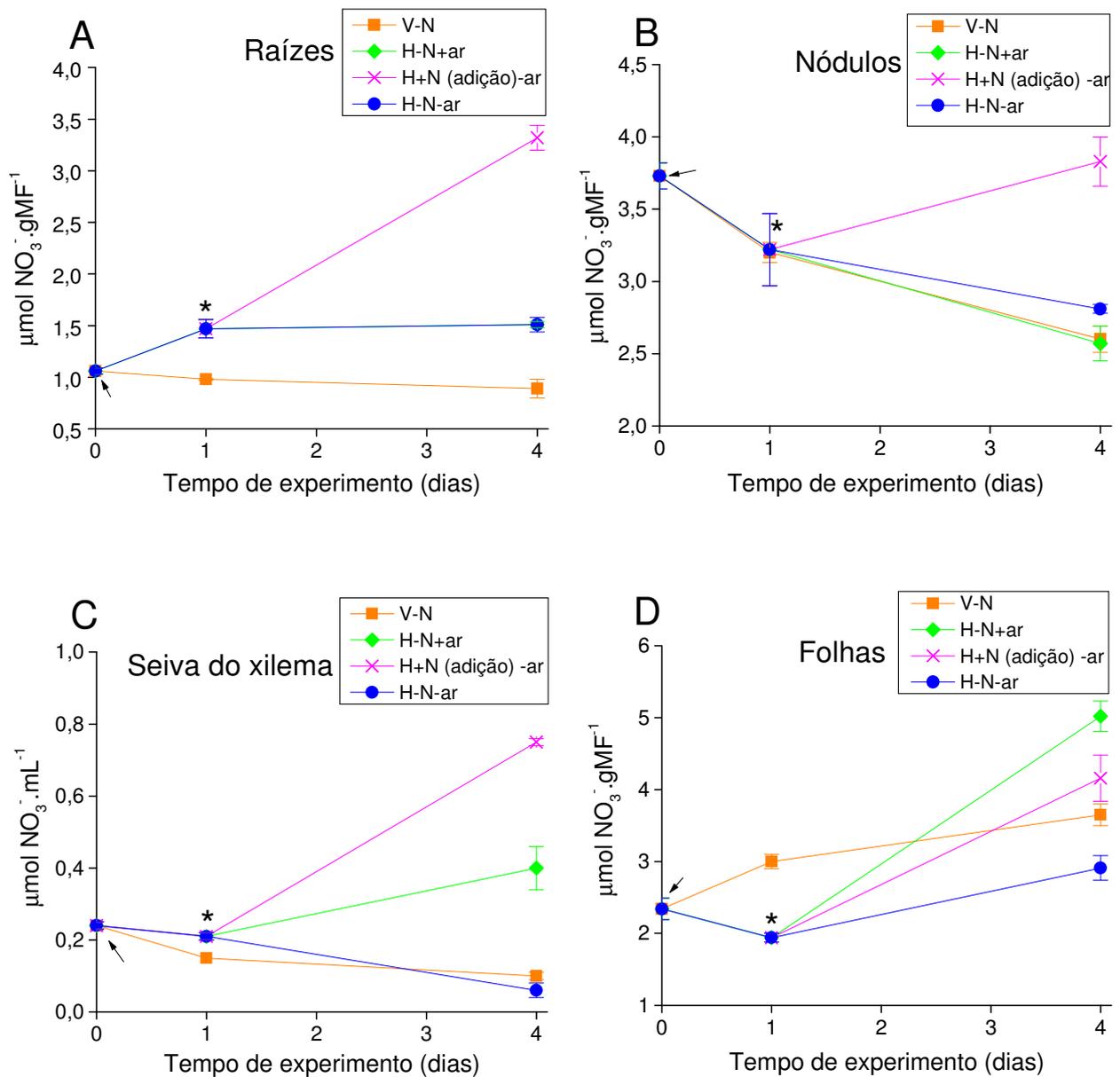


Figura 11. Conteúdo de nitrato nas plantas de soja noduladas. Análises nas raízes (A), nos nódulos (B), na seiva do xilema (C) e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (D) das plantas em vermiculita (V) ou em hidroponia (H). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

acordo com a entrada de uma pequena quantidade de nitrato na planta durante a hipoxia.

No dia 0, o conteúdo de nitrato nas folhas foi de $2,4 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Figura 11D). Nas plantas “V-N” o conteúdo de nitrato aumentou para $3,1 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 e para $3,5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. O conteúdo de nitrato nas folhas das plantas transferidas para a hidroponia reduziu de $2,4 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 0 para $2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1. No dia 4 o conteúdo de nitrato atingiu $5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nas plantas “H-N+ar” e nas plantas “H-N-ar” foi para $3 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$. O conteúdo de nitrato nas plantas “H+N(adição)-ar” foi de $2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 e aumentou para $4,6 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 5 (Figura 11D). A resposta positiva após adição de nitrato em plantas já em hipoxia vem de encontro com outros dados deste tratamento, todos indicativos da absorção de nitrato pela planta nesta condição.

4.3.2. Conteúdo de nitrito na solução do vaso, raízes e nódulos das plantas.

Na solução do vaso e nas raízes, o conteúdo de nitrito só foi observado nas plantas com nitrato no dia 4. O valor obtido foi de $1,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ na solução do vaso e de $0,85 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nas raízes (Figura 12A e 12B). Embora o valor seja baixo, é próximo do conteúdo de nitrato das raízes (Figura 2).

Nos nódulos, nos dias 0 e 1, o conteúdo de nitrito foi igual para todos os tratamentos testados, sendo de $0,2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 0 e de $0,12 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 (Figura 12C). Nos dias 2 e 3 não foi encontrado nitrito nos nódulos. No dia 4, nas plantas “V-N” o conteúdo de nitrito foi de $0,05 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, nas plantas “H-N+ar” foi de $0,12 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, assim como nas plantas “H-N-ar” e nas plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de nitrito foi de $0,95 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Figura 12C). Também foi realizada

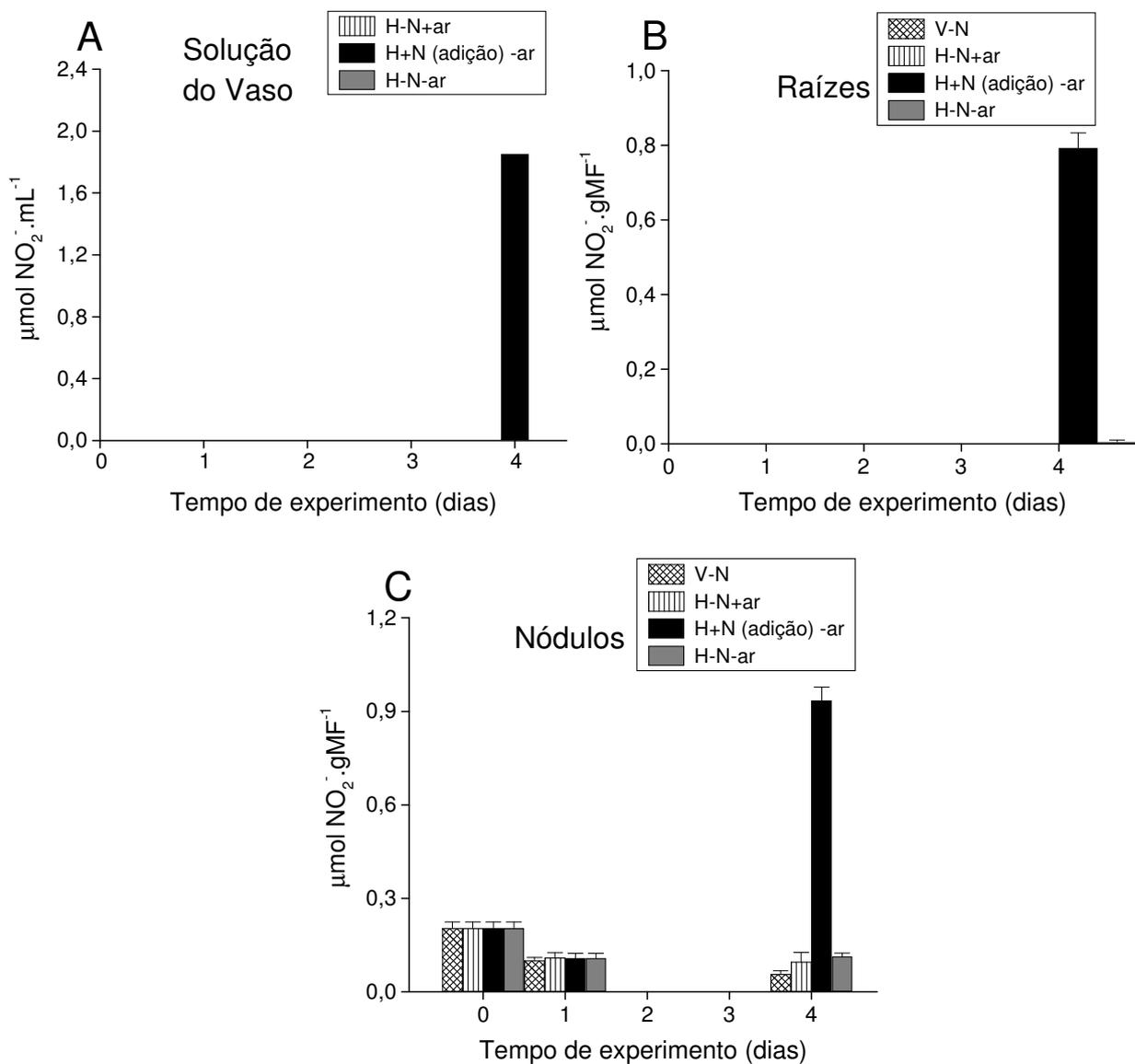


Figura 12. Conteúdo de nitrito nas plantas de soja noduladas. Análises na solução do vaso (A), nas raízes (B) e nos nódulos (C) das plantas em vermiculita (V) (X) e em hidroponia (H) sem nitrato e com aeração (III), com nitrato adicionado no dia 1 e sem aeração (■) e sem nitrato e sem aeração (■). As barras representam o erro padrão das médias.

análise do conteúdo de nitrito na seiva do xilema e nas folhas, porém não foram encontrados nem traços de nitrito.

4.3.3. O teor de aminoácidos solúveis totais nas plantas de soja.

Nas raízes, no dia 0, o teor de aminoácidos solúveis totais foi de $1,2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Figura 13A). Nas plantas “V-N” o teor de aminoácidos solúveis totais manteve-se em $1,2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ durante todo o experimento. No dia 1, o teor de aminoácidos solúveis totais, nas plantas em hidroponia, aumentou para $1,5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$. Nas plantas “H-N+ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $1,5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 para $2,2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Nas raízes das plantas “H-N-ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais, chegou a $2,0 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas do tratamento “H+N(adição)-ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $1,5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 para $4,1 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4 (Figura 13A), assim como observado no conteúdo de nitrato nas raízes (Figura 11A).

No dia 0, o teor de aminoácidos solúveis totais nos nódulo foi de $18 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Figura 13B). Nas plantas “V-N” o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu para $16,5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 e permaneceu com valores em torno de $17 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ até o dia 4. Nas plantas em hidroponia, o teor de aminoácidos solúveis totais caiu para $10,9 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 e reduziu para $8 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nas plantas sem nitrato (normoxia e hipoxia) no dia 4. Nas plantas “H+N(adição)-ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $10,9 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para $14 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ do dia 1 ao dia 4 (Figura 13B).

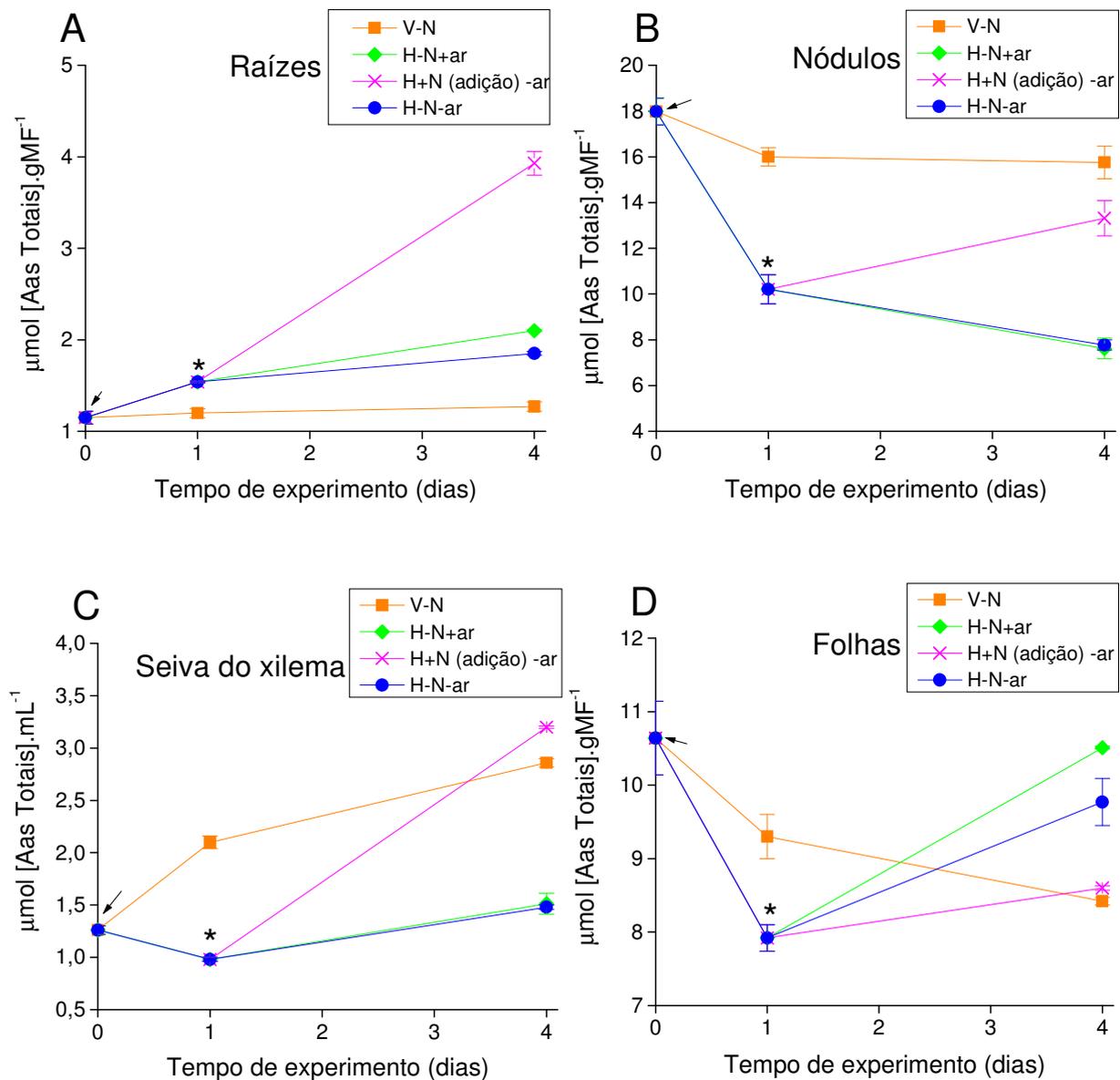


Figura 13. Teor de aminoácidos solúveis totais nas plantas de soja noduladas.

Análises nas raízes (A), nos nódulos (B), na seiva do xilema (C) e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (D) das plantas em vermiculita (V) ou em hidroponia (H). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

Na seiva do xilema, o teor de aminoácidos solúveis totais encontrado no dia 0 foi de $1,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Figura 13C). Nas plantas “V-N” o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou para $2,2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 e para $2,75 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas em hidroponia houve pequena redução no teor de aminoácidos solúveis totais, obtendo $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1. O teor de aminoácidos solúveis totais aumentou para $1,5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ nas plantas “H-N+ar” e nas plantas “H-N-ar”, no dia 4. Nas plantas “H+N(adição)-ar”, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou de $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 para $3,25 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4 (Figura 13C).

No dia 0, o teor de aminoácidos solúveis totais nas folhas, foi de $10,75 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ para todos os tratamentos analisados (Figura 13D). Nas plantas “V-N” o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu para $8,75 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas do tratamento “H-N+ar” o teor de aminoácidos solúveis totais reduziu para $8,25 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 e para $10,5 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. O mesmo teor de aminoácidos solúveis totais foi observado para os tratamentos “H-N-ar” e “H+N(adição)-ar” no dia 1. A partir do dia 1, as plantas “H-N-ar” apresentaram aumento no teor de aminoácidos solúveis totais para $10,25 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Na folha das plantas “H+N(adição)-ar” observou-se aumento no teor de aminoácidos solúveis totais para $8,75 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4 (Figura 13D).

4.3.4. A composição de aminoácidos livres presentes nas plantas de soja.

Nas raízes das plantas noduladas, os aminoácidos livres mais representativos no dia 4 foram o Asp, o Glu e a Asn quando as plantas estavam em vermiculita (Tabela 4). Estes três aminoácidos juntos perfizeram aproximadamente 50% da composição de aminoácidos livres, enquanto que os aminoácidos Ala e Gaba,

representaram 5,3 e 10%, respectivamente. Nas plantas “H-N+ar” foram observados valores inferiores de Gaba e Ala, além de maior participação do Asp e da Asn, quando comparados às plantas em hipoxia. No dia 4, observou-se nas raízes das plantas “H-N-ar”, redução acentuada do Asp, que passou de 24,9% (dia 0) para apenas 5,3% dos aminoácidos livres presentes, e redução drástica do Glu de 40% para 12,6% (Tabela 4). Os aminoácidos, Asn, Gln, Gaba, e principalmente Ala, aumentaram sua representação na composição dos aminoácidos das raízes. No tratamento “H+N(adição)-ar” observou-se 45% de Ala e 12,8% de Gaba valores superiores aos encontrados nas plantas “V-N”.

Nos nódulos das plantas “V-N” verificou-se no dia 0 que os três principais aminoácidos observados nas raízes, Asp, Glu e Asn compunham mais de 50% de aminoácidos livres, mas diferentemente das raízes, a Ala compunha mais de 15% dos aminoácidos (Tabela 5). Nas plantas em hidroponia e em hipoxia, observou-se maior participação do Gaba em relação às plantas “V-N”, representando 15,5% nas plantas “H+N(adição)-ar” e 13,7% nas plantas “H-N-ar”. A Ala não apresentou diferença entre os tratamentos “H+N(adição)-ar” e “H-N-ar”. O Glu nas plantas “H-N-ar” passou a compor 42,3% e nas plantas “H+N-ar”, 30,1% e o Asp passou a constituir menos de 7% nas plantas em hipoxia. A composição de aminoácidos livres nos nódulos das plantas “H-N+ar” foi semelhante à observada nos nódulos das plantas “V-N”, com menores valores de Ala e Gaba que passaram a representar 11,1% da composição de aminoácidos livres. Comparando as plantas em hipoxia com as com aeração no dia 4, foi observado para a Ala, no mínimo o dobro da composição e para o Gaba sete vezes (Tabela 5).

Tabela 4. Composição de aminoácidos (mol%) nas raízes das plantas de soja noduladas em vermiculita (V) ou hidroponia (H). As plantas que foram transferidas para hidroponia estavam na presença de nitrato com 5 mM (+N) ou em sua ausência (-N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem (-ar) por um período de quatro dias. Os valores representam a média das repetições.

	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4
	V -N	H-N-ar	V -N	H-N+ar	H+N(adição)-ar	H-N -ar
ASP	24,9	20,4	21,7	27,7	8,0	5,3
GLU	40,0	36,8	5,3	13,8	12,4	12,6
ASN	3,9	5,2	22,5	15,1	4,6	4,6
SER	2,9	3,8	6,2	8,8	0,1	4,4
GLN	1,7	0,8	3,4	3,4	1,7	6,1
ALA	3,2	13,2	5,3	4,2	45,0	23,8
GABA	2,1	2,7	10,0	6,0	12,8	16,6
Outros*	21,3	17,1	25,6	21,0	15,4	26,6
Total ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$)	1,2	1,6	1,2	2,0	4,0	1,8

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu.

Tabela 5. Composição de aminoácidos (mol%) nos nódulos das plantas de soja noduladas em vermiculita (V) ou hidroponia (H). As plantas que foram transferidas para hidroponia estavam na presença de nitrato com 5 mM (+N) ou em sua ausência (-N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem (-ar) por um período de quatro dias. Os valores representam a média das repetições.

	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4
	V -N	H-N-ar	V -N	H-N+ar	H+N(adição)-ar	H-N -ar
ASP	23,1	9,9	12,3	20,6	6,7	5,8
GLU	33,6	35,5	39,4	36,3	30,1	42,3
ASN	9,6	3,9	12,4	12,7	1,6	0,8
SER	7,3	6,3	8,1	8,7	4,0	3,5
GLN	1,6	0,9	1,1	2,3	1,0	0,8
ALA	15,3	20,5	16,1	9,3	18,9	18,8
GABA	2,4	5,4	3,4	1,8	15,5	13,7
Outros*	7,1	21,7	7,2	8,3	22,2	14,3
Total ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$)	18,0	11,6	16,5	8,0	14,0	8,0

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu

Na seiva do xilema, observou-se nas plantas “V-N” 20,3% de Asp, 2% de Glu e 31,2% de Asn no dia 0 (Tabela 6). A composição de Gln, diferente do valor baixo observado nas raízes (1,7%) e nos nódulos (1,6%) (Tabelas 4 e 5), passou a representar 25,7% e a Ala e o Gaba, 0,45% e 1,2%, respectivamente. Nas plantas “H-N+ar” o Asp, o Glu e Asn também contribuíram com mais de 50% na composição de aminoácidos livres, a Gln apresentou 14,3% (valor muito superior às plantas em hipoxia), Ala 0,7% e Gaba 1,5%. As plantas “H-N-ar” no dia 1 apresentaram 50,5% de Asp, 12,2% de Glu e 10,3% de Asn, os quais juntos perfizeram 73% da composição de aminoácidos livres (Tabela 6). A Gln diferentemente das plantas “V-N” passou a compor 1% e a Ala e o Gaba juntos 4,7%. No dia 4, a composição dos aminoácidos livres apresentava outro perfil, com 29,1% representando os três aminoácidos, Asp, Glu e Asn. A Gln reduziu a 0,1% e a Ala passou a representar 30,2% e curiosamente o Gaba não alterou a sua contribuição na composição dos aminoácidos na seiva. Nas plantas “H+N(adição)-ar”, no dia 4, a composição do Asp foi de 7,8%, a Gln representou 1,4% e a Ala contribuiu com 54,6%, sendo esta a maior representação de aminoácidos livres na seiva do xilema, em todos os tratamentos (Tabela 6).

Nas folhas das plantas “V-N”, os três principais aminoácidos (Asp, Glu e Asn) constituíram menos de 40% da composição de aminoácidos e a Ala e o Gaba constituem juntos 35% (Tabela 7). No dia 4, as plantas “H-N+ar” os aminoácidos Asp, Glu e Asn constituíram 37,6%, e a Ala e o Gaba, 27,8%. As plantas “H-N-ar” apresentaram 72,8% da composição em Asp, Glu e Asn e a Ala e o Gaba juntos contribuíram com 10,5%. No dia 0, Asp, Glu e Asn compunham 36% da composição nas plantas “V-N” enquanto Ala e Gaba constituíam 10,5% nas plantas “H-N-ar”. Nas

Tabela 6. Composição de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema das plantas de soja noduladas em vermiculita (V) ou hidroponia (H). As plantas que foram transferidas para hidroponia estavam na presença de nitrato com 5 mM (+N) ou em sua ausência (-N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem (-ar) por um período de quatro dias. Os valores representam a média das repetições.

	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4
	V -N	H-N-ar	V -N	H-N+ar	H+N(adição)-ar	H-N -ar
ASP	20,3	50,5	49,2	40,0	7,8	16,8
GLU	2,0	12,2	1,7	3,4	5,7	6,8
ASN	31,2	10,3	25,4	22,2	4,8	5,5
SER	4,6	3,8	0,7	4,6	8,8	8,2
GLN	25,7	1,0	12,7	14,3	1,4	0,1
ALA	0,45	2,1	0,2	0,7	54,6	30,2
GABA	1,2	2,6	0,6	1,5	2,6	2,5
Outros*	14,5	17,5	9,5	13,3	14,3	29,9
Total ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$)	1,25	1,0	2,75	1,5	3,25	1,5

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu.

plantas “H+N(adição)-ar” a composição de Asp, Glu e Asn chegou a 58,9% e de Ala e Gaba, 18,5% (Tabela 7).

4.3.5. Conteúdo de proteínas solúveis totais nas plantas de soja.

No dia 0, o conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes foi de 9,6 mg.gMF⁻¹ (Figura 14A). Nas plantas “V-N” o conteúdo de proteínas solúveis totais reduziu para 7,9 mg.gMF⁻¹ no dia 1 e para 6,9 mg.gMF⁻¹ no dia 4. Nas raízes das plantas em hipoxia o conteúdo de proteínas solúveis totais reduziu para 7,6 mg.gMF⁻¹ no dia 1. A partir do dia 1, o conteúdo de proteínas solúveis totais reduziu para 5,56 mg.gMF⁻¹ nas plantas “H-N+ar” e manteve-se em 7,6 mg.gMF⁻¹ nas plantas “H-N-ar” no dia 4. Nas raízes das plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais aumentou de 7,6 mg.gMF⁻¹ no dia 1 para 9,5 mg.gMF⁻¹ no dia 4 (Figura 14A).

No dia 0, o conteúdo de proteínas solúveis totais nos nódulos foi de 11,2 mg.gMF⁻¹ (Figura 14B). No dia 1 houve redução no conteúdo de proteínas solúveis totais para valores em torno de 9,5 mg.gMF⁻¹ para todos os tratamentos. No dia 4 o conteúdo de proteínas solúveis totais foi de 8,8 mg.gMF⁻¹ nas plantas “V-N” e 7,8 mg.gMF⁻¹ nas plantas “H-N+ar”. As plantas “H-N-ar” apresentaram, no dia 4, 8,8 mg.gMF⁻¹, assim como no dia 1. Nas plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais manteve-se em torno de 9,5 mg.gMF⁻¹ até o dia 4 (Figura 14B).

No dia 0, o conteúdo de proteínas solúveis totais nas folhas foi de 7,4 mg.gMF⁻¹ (Figura 14C). Nas plantas “V-N” o conteúdo de proteínas solúveis totais aumentou de 7,4 mg.gMF⁻¹ para 8,9 mg.gMF⁻¹ no dia 1 e para 10,2 mg.gMF⁻¹ no dia

Tabela 7. Composição de aminoácidos (mol%) nas folhas das plantas de soja noduladas em vermiculita (V) ou hidroponia (H). As plantas que foram transferidas para hidroponia estavam na presença de nitrato com 5 mM (+N) ou em sua ausência (-N) e foram mantidas em aeração (+ar) ou sem (-ar) por um período de quatro dias. Os valores representam a média das repetições.

	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 4	Dia 4	Dia 4
	V -N	H-N-ar	V -N	H-N+ar	H+N(adição)-ar	H-N -ar
ASP	8,7	13,9	9,2	13,2	26,4	36,2
GLU	25,1	33,3	22,7	21,4	32,0	36,1
ASN	2,1	2,2	7,3	3,0	0,5	0,5
SER	8,2	2,2	5,6	3,0	2,1	1,7
GLN	2,6	0,7	0,4	0,5	0,7	0,9
ALA	15,8	12,4	18,3	14,6	11,6	6,7
GABA	19,2	18,9	17,0	13,2	6,9	3,8
Outros*	18,3	16,4	19,5	31,1	19,8	14,1
Total ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$)	11,25	8,25	8,75	10,5	8,75	10,25

*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu.

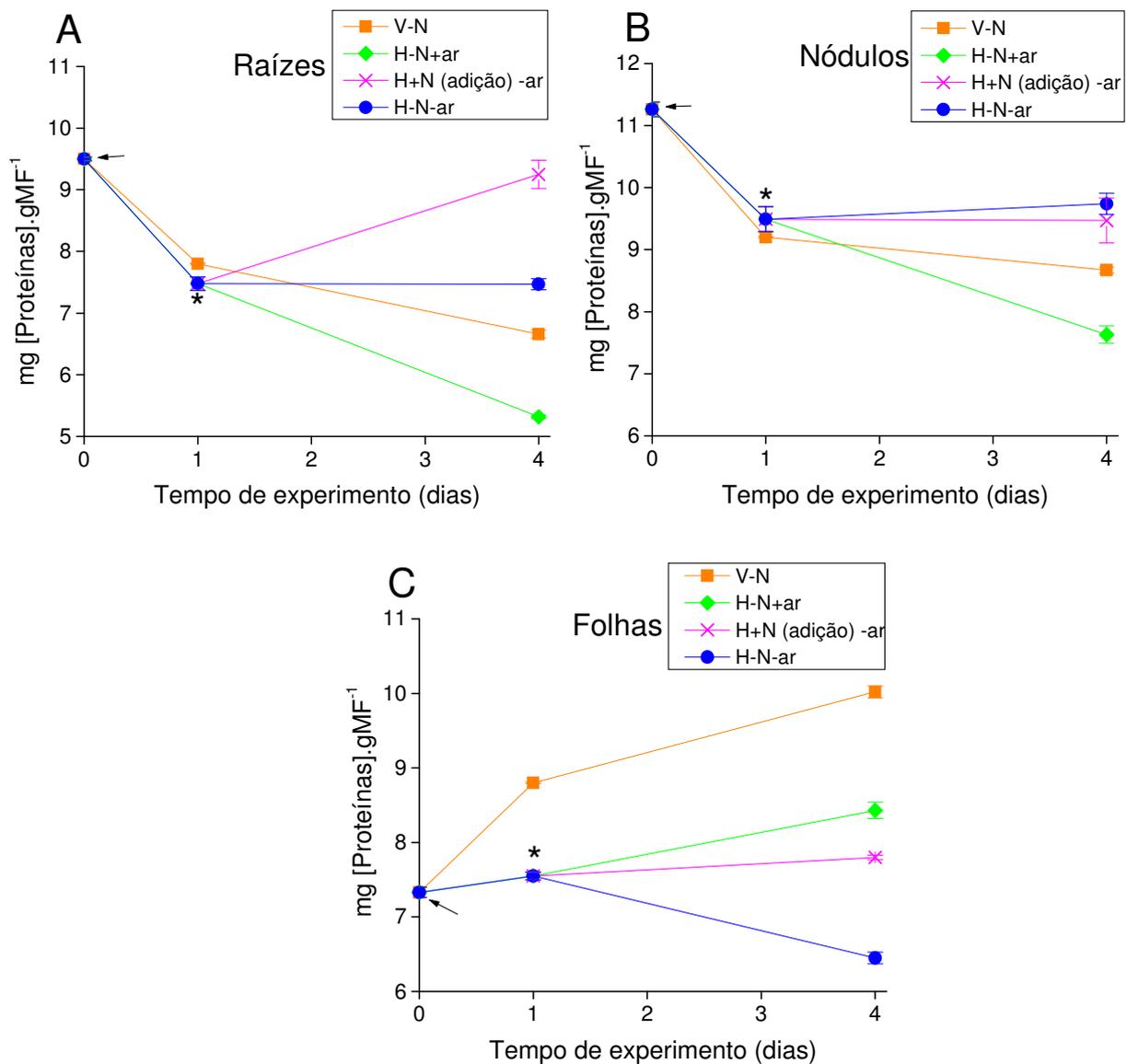


Figura 14. Conteúdo de proteínas solúveis totais nas plantas de soja noduladas. Análises nas raízes (A), nos nódulos (B), na seiva do xilema (C) e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (D) das plantas em vermiculita (V) ou em hidroponia (H). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

4. Nas plantas em hidroponia também houve aumento no conteúdo de proteínas solúveis totais para $7,6 \text{ mg.gMF}^{-1}$ no dia 1. No dia 4, o conteúdo de proteínas foi de $8,6 \text{ mg.gMF}^{-1}$ nas plantas “H-N+ar” e de $6,5 \text{ mg.gMF}^{-1}$ nas plantas “H-N-ar”. Nas plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de proteínas solúveis totais aumentou de $7,6 \text{ mg.gMF}^{-1}$ no dia 1 para aproximadamente 8 mg.gMF^{-1} no dia 4 (Figura 14C).

4.3.6. Conteúdo de ureídeos totais nas plantas de soja.

Nas raízes, os conteúdos de ureídeos totais foram muito baixos, apresentando valores inferiores a $0,05 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nos 4 dias de experimento (Figura 15A). Estes valores podem ser considerados como traços de ureídeos nas raízes, possivelmente proveniente dos nódulos, onde ocorrem a sua produção.

No dia 0, o conteúdo de ureídeos totais nos nódulos foi de $0,4 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Figura 15B). Nas plantas “V-N”, o conteúdo de ureídeos totais reduziu para $0,3 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1 e para $0,19 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. As plantas em hidroponia apresentaram redução no conteúdo de ureídeos totais para $0,18 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1. Nas plantas “H-N+ar” o conteúdo de ureídeos totais aumentou para $0,2 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ e nas plantas “H-N-ar” diminuiu para $0,12 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. No nódulo das plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de ureídeos totais foi de $0,12 \text{ } \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4 (Figura 15B).

Na seiva do xilema, o conteúdo de ureídeos totais foi de $0,42 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$, no dia 0 (Figura 15C). Nas plantas “V-N” o conteúdo de ureídeos totais aumentou para $0,6 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1 e chegou a $0,87 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 4, reflexo do transporte do principal produto da fixação de nitrogênio (ureídeos) para a parte aérea. Nas plantas em hidroponia, o conteúdo de ureídeos totais reduziu para $0,07 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no dia 1.

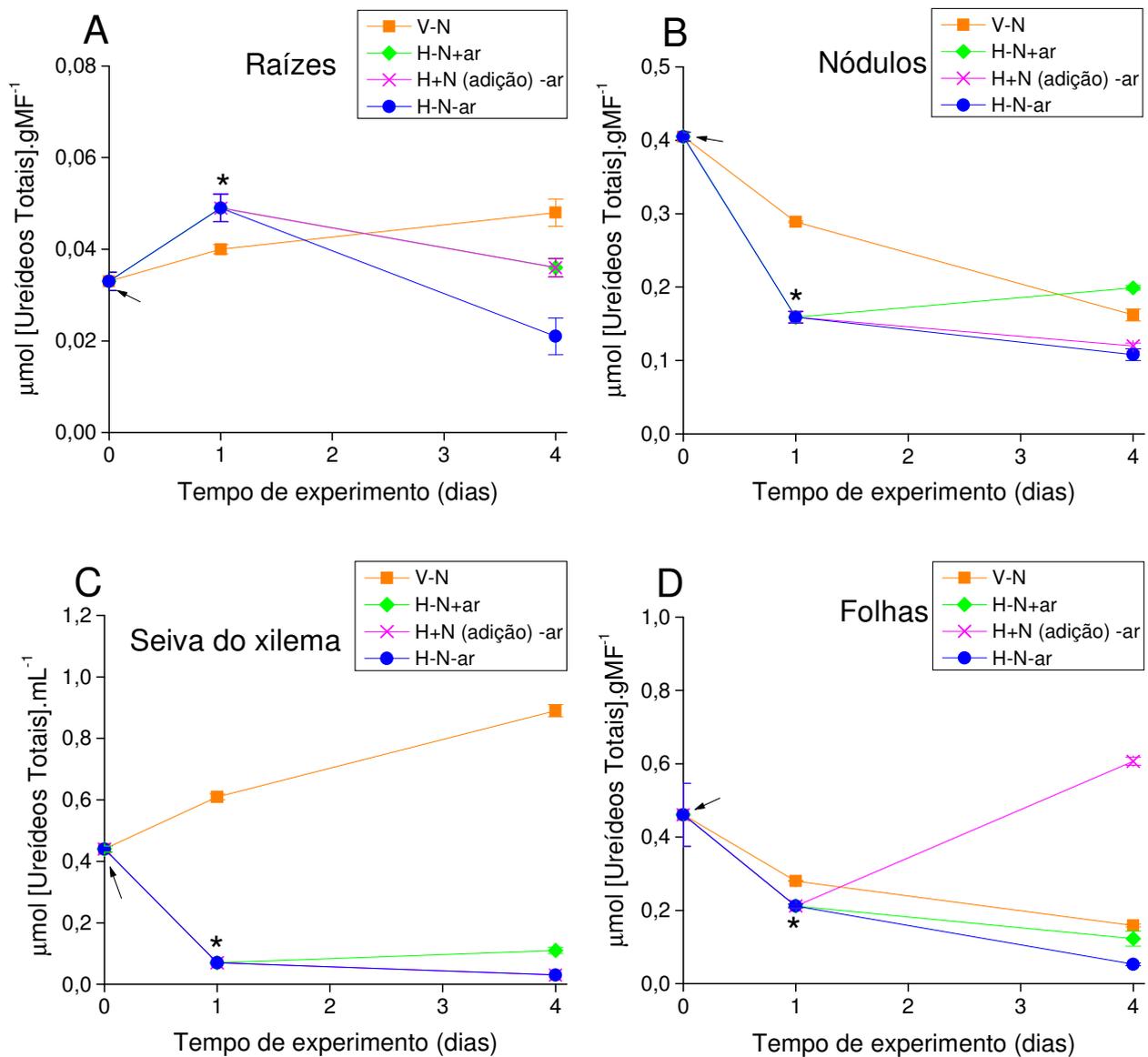


Figura 15. Conteúdo de ureídeos totais nas plantas de soja. Análises nas raízes (A), nos nódulos (B), na seiva do xilema (C) e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (D) das plantas em vermiculita (V) ou em hidroponia (H). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

No dia 4, o conteúdo de ureídeos totais nas plantas “H-N+ar” foi de $0,12 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e nas plantas “H-N-ar” foi de $0,07 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Nas plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de ureídeos totais manteve-se em $0,7 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ do dia 1 ao dia 4 (Figura 15C). Estes baixos valores de ureídeos são indicativos da inibição da atividade da fixação em condições de hidroponia.

Nas folhas, o conteúdo de ureídeos totais foi de $0,45 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 0 (Figura 15D). Nas plantas “V-N”, o conteúdo de ureídeos totais reduziu durante os quatro dias de experimento observando-se $0,2 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas em hidroponia, o conteúdo de ureídeos totais reduziu para $0,25 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 1. No dia 4, o conteúdo de ureídeos totais foi de $0,1 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nas plantas “-N+ar” e de $0,05 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ nas plantas “-N-ar”. Nas plantas “H+N(adição)-ar” o conteúdo de ureídeos totais foi de $0,6 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ no dia 4 (Figura 15D). Esta resposta positiva da adição do nitrato durante a hipoxia não foi esperada, pois não foi observada resposta em nenhuma outra parte da planta que indicasse síntese e/ou aumento no transporte.

4.4. A atividade da enzima redutase do nitrato *in vivo* nas plantas de soja não noduladas e noduladas.

Tendo em vista que os dados dos experimentos anteriores indicam um metabolismo bastante restrito do nitrato durante a hipoxia, este experimento foi realizado para verificar a existência de alguma associação entre a atividade da enzima redutase do nitrato e as alterações no metabolismo do nitrato em hipoxia. O experimento foi conduzido tanto com plantas não noduladas como com noduladas. A montagem deste experimento foi igual à montagem dos experimentos 2 e 3, exceto

pela adição do tratamento: hidroponia com nitrato adicionado no dia 2 mais aeração “+N(adição)+ar” nas plantas noduladas (rever Tópicos 4.2 e 4.3).

Nas plantas não noduladas a atividade da enzima redutase do nitrato *in vivo* foi avaliada em condições de hidroponia, sem ou com nitrato adicionado no dia 2, e na presença ou não de aeração.

Nas raízes, a atividade da enzima nas plantas com nitrato na solução do vaso foi maior que nas plantas sem nitrato. No dia 0, a atividade da enzima foi de $0,04 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nas raízes (Figura 16A). Nas plantas “+N+ar” a atividade da enzima manteve-se no dia 1, aumentou para $0,3 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 2 e para $0,4 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 5. Nas plantas “+N-ar” a atividade da enzima aumentou para $0,66 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 2, com posterior redução para $0,5 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 5. Nas plantas sem nitrato, a atividade da enzima manteve-se em $0,04 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ até o dia 1. Nas plantas “-N+ar” a atividade da enzima aumentou para $0,2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 2, com queda para aproximadamente $0,1 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 5. A atividade da enzima RN nas raízes das plantas “H-N-ar” manteve-se em $0,6 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ do dia 2 ao dia 5. A adição de nitrato promoveu aumento na atividade da enzima de $0,1 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 2 para $0,28 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 5 tornando evidente a indução da enzima pelo nitrato em condições de hipoxia, bem como em normoxia (Figura 16A).

Nas folhas das plantas não noduladas, a atividade da enzima foi de $0,55 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 0, de $1,2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 1 e de $1,5 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 2 para todos os tratamentos exceto para o tratamento “+N-ar” no dia 2 (Figura 16B). Isto ocorreu possivelmente pelo fato das folhas ainda possuírem nitrato o qual foi consumido durante o experimento. No dia 5, a atividade

da enzima aumentou para $2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nas plantas "+N+ar". Nas plantas "+N-ar" a atividade da enzima aumentou para $2,1 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 2 e reduziu para $2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 5. Nas plantas "-N+ar", a atividade da enzima manteve-se em $1,5 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e nas plantas "H-N-ar" reduziu para $1,2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 5 (Figura 16B). A adição de nitrato nas plantas promoveu a maior atividade da enzima no dia 5 com $2,2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, indicando, mais uma vez, a indução da enzima e, portanto, a entrada e transporte de nitrato da raiz até a folha nas plantas em hipoxia.

Nas plantas de soja noduladas, observou-se baixíssima atividade da enzima nas raízes (abaixo de $0,05 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) no dia 0, quando as plantas estavam em "V-N" (totalmente dependentes da fixação de N_2). Esta atividade manteve-se baixa no tratamento "V-N" durante todo experimento (Figura 17A). Nos demais tratamentos a atividade também manteve-se baixa com pequenas variações, exceto pelo aumento acentuado observado no tratamento com a adição de nitrato e hipoxia. Nas plantas em hidroponia a atividade da enzima foi de $0,2 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 1. No dia 4, a atividade da enzima reduziu a zero nas plantas "H-N+ar", manteve-se nas plantas "H-N-ar" e "H+N(adição)+ar". As plantas "H+N(adição)-ar" apresentaram aumento na atividade da RN para $1,18 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 4 (Figura 17A).

Nas folhas das plantas noduladas a atividade da enzima RN *in vivo* foi bastante baixa ($0,15 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) no dia 0 para todos os tratamentos testados (Figura 17B). Nas plantas "V-N" a atividade da enzima reduziu, chegando a $0 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas "H-N+ar" a atividade da

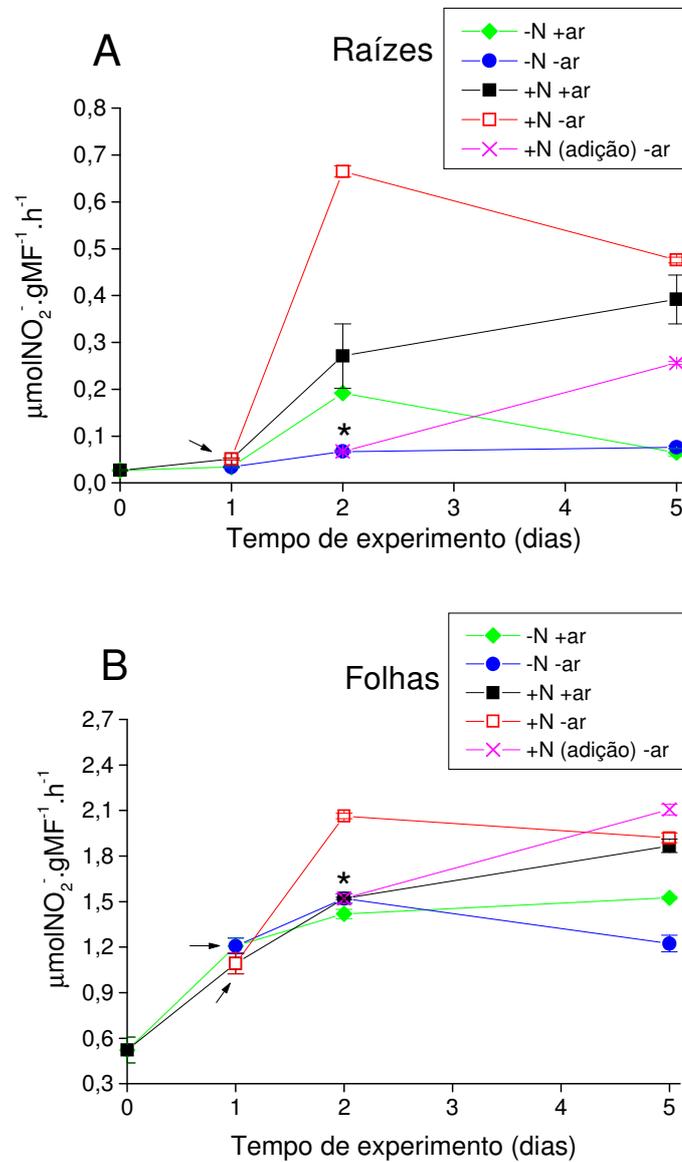


Figura 16. Atividade da enzima redutase do nitrato *in vivo* nas plantas de soja não noduladas. Análises nas raízes (A) e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (B). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

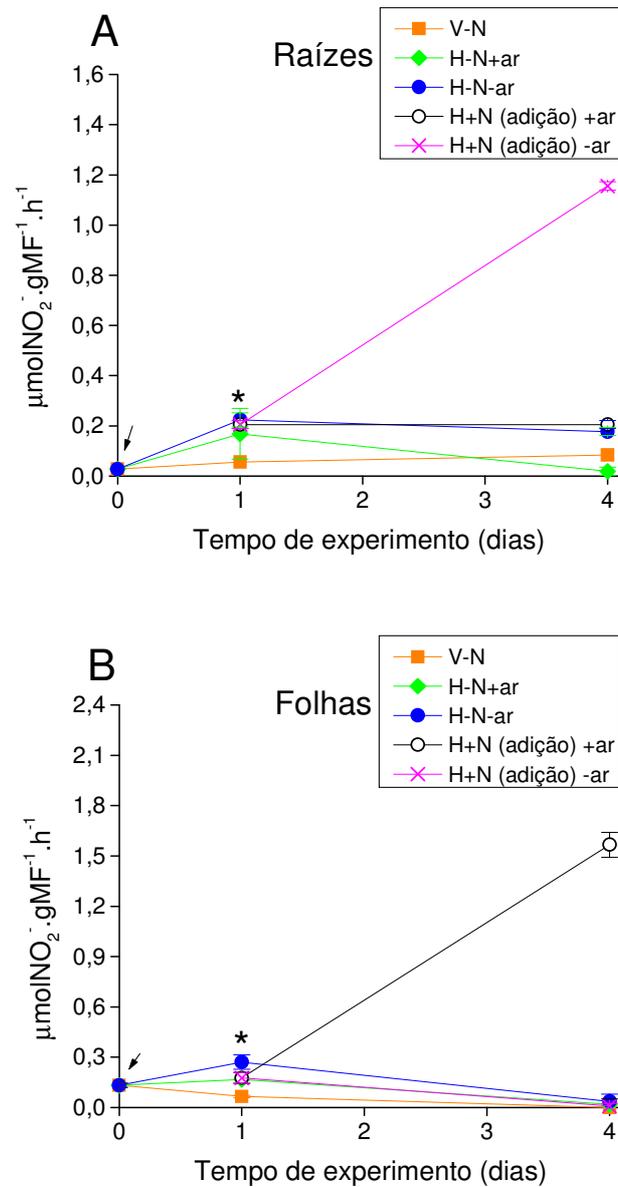


Figura 17. Atividade da enzima redutase do nitrato *in vivo* nas plantas de soja noduladas em vermiculita (V) e em hidroponia (H). Análises nas raízes (A) e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (B). As setas indicam a retirada da aeração (hipoxia) e o asterisco, a adição de 5 mM de nitrato. As barras representam o erro padrão das médias.

enzima manteve-se no dia 1 e reduziu a $0 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 4. Nas plantas “H-N-ar” a atividade da enzima aumentou para $0,3 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 1 e reduziu a $0 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 4. As plantas submetidas aos tratamentos de adição de nitrato, com aeração ou não, apresentaram atividades da RN diferentes no dia 4. As plantas “H+N(adição)+ar” apresentaram manutenção da atividade no dia 1, seguido de aumento para $1,6 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 4, e as plantas “H+N(adição)-ar” também apresentaram manutenção da atividade no dia 1, porém diminuição para $0 \mu\text{molNO}_2^- \cdot \text{gMF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no dia 4 (Figura 17B). Neste caso, o efeito da hipoxia nas folhas foi o contrário do observado nas raízes.

4.5. Experimento IV. Análise da incorporação de $^{15}\text{NO}_3^-$ nas plantas de soja não noduladas e noduladas durante a hipoxia.

O objetivo deste experimento foi observar a absorção de nitrato durante a hipoxia, utilizando para isso um composto marcado ($^{15}\text{NO}_3^-$).

Experimentos que utilizam $^{15}\text{NO}_3^-$ na solução do vaso exigem condições especiais de aplicação do isótopo, como volume de meio reduzido; o que acarreta menor tempo de exposição ao isótopo. Além destas peculiaridades, a eficiência de absorção pode variar com a idade da planta. Por esta razão foram feitas análises nos diversos estádios de desenvolvimento das plantas de soja.

As fases do desenvolvimento testadas foram: 1^o par de folhas, e do primeiro ao sétimo trifólio totalmente expandido, totalizando 8 fases diferentes. Cada planta foi colocada em um frasco com 200 mL de K^{15}NO_3 na concentração de 5 mM com 11% de N enriquecido onde as plantas eram mantidas por 48 horas. Estas plantas foram separadas em 2 tratamentos: normoxia, com aeração ininterrupta, e hipoxia, sem

aeração e com uma camada de óleo mineral sobre a solução do vaso colocada durante a montagem do experimento. O volume do frasco e o tempo de exposição para que não fosse esgotado todo isótopo do meio foram determinados em testes preliminares.

As raízes, nódulos, quando presentes, e folhas de cada planta foram coletados, liofilizados e parte da amostra foi enviada para o Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA para análises da incorporação de ^{15}N na amostra e teor de N. O restante das amostras foi utilizado em nosso laboratório para a determinação do enriquecimento de ^{15}N em aminoácidos via GC/MS.

4.5.1. Incorporação de $^{15}\text{N-NO}_3^-$ nas plantas de soja não noduladas e noduladas.

Observou-se durante o desenvolvimento das plantas não noduladas, que o enriquecimento de ^{15}N nas raízes caiu de 4 a 0,9% do 1º par de folhas ao 7º trifólio, nas plantas em normoxia (Figura 18A). Em hipoxia, esta queda também foi observada até o 6º trifólio, embora com valores mais baixos que em normoxia. No 7º trifólio das plantas em hipoxia, houve maior enriquecimento de ^{15}N , em relação às plantas do mesmo tratamento sendo este valor (2,3%), o maior de enriquecimento observado em hipoxia (Figura 18A).

Nas folhas das plantas não noduladas também houve maior incorporação de ^{15}N em normoxia em relação às plantas em hipoxia na mesma fase de desenvolvimento (Figura 18B). Os menores valores de enriquecimento em normoxia foram de 1,1% no 1º par de folhas, seguido de aumento no 1º trifólio para 3%. A partir do 2º trifólio verificou-se queda, tendo sido obtido 1,2% no 7º trifólio (Figura

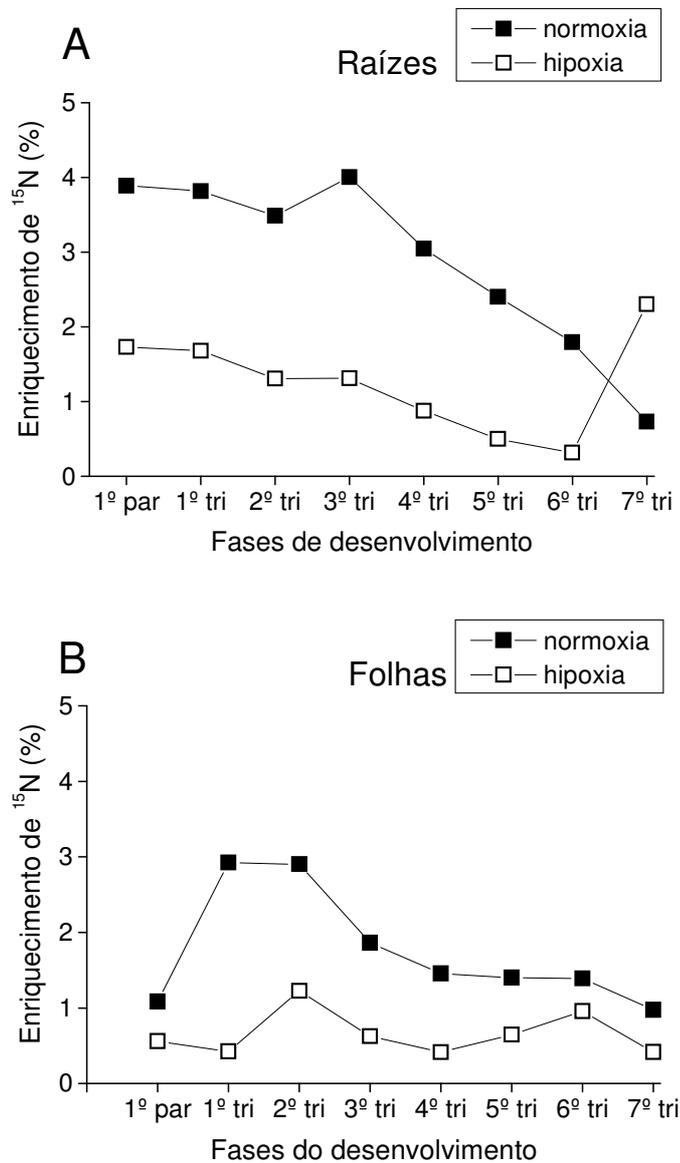


Figura 18. Incorporação de ^{15}N em plantas de soja não noduladas. Enriquecimento do N das raízes (A), e das folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (B) durante as fases do desenvolvimento das plantas em normoxia (■) e em hipoxia (□) após 48h da aplicação do isótopo $^{15}\text{NO}_3^-$. As fases de desenvolvimento foram definidas pelo estágio em que apareceu a folha primária/trifoliolada expandida indicada.

18B). Nas folhas das plantas em hipoxia houve dois picos de incorporação no 2º trifólio e no 6º trifólio com 1,25% e 1,1%, respectivamente. Nas raízes das plantas noduladas o enriquecimento de ^{15}N foi maior em normoxia durante todas as fases de desenvolvimento das plantas, com valores de enriquecimento entre 2 (7º trifólio) e 4,9% (1º trifólio) (Figura 19A). Esta tendência à queda também foi observada nas raízes de planta não noduladas (Figura 18A). As plantas em hipoxia apresentaram valores inferiores a 2% de incorporação de ^{15}N nas raízes. A menor incorporação foi de 0,6% no 4º e no 6º trifólio.

Nos nódulos das plantas mantidas em normoxia e hipoxia, a incorporação de ^{15}N foi muito baixa, entre 0,1 e 0,3% de enriquecimento (Figura 19B). As análises nos nódulos começaram a ser realizadas com o 3º trifólio totalmente expandido, uma vez que anteriormente a esta fase de desenvolvimento não havia nódulos suficientes para a realização desta análise, por estarem em formação e serem em sua maioria muito pequenos.

Nas folhas das plantas noduladas, o enriquecimento de ^{15}N foi maior nas plantas em normoxia quando comparada às plantas em hipoxia na mesma fase de desenvolvimento (Figura 19C). Em normoxia a porcentagem de enriquecimento foi entre 0,9 % e 3,6%, sendo o maior enriquecimento observado no 2º trifólio e o menor no 7º trifólio. Nas folhas das plantas em hipoxia, a porcentagem de enriquecimento variou entre 0,3 e 1,8%. O maior enriquecimento foi observado no 2º trifólio e o menor no 4º e 7º trifólio (Figura 19C). Em hipoxia, houve um comportamento semelhante ao observado em normoxia, com dois aumentos na incorporação de ^{15}N no 2º e no 6º trifólio, porém em intensidades diferentes.

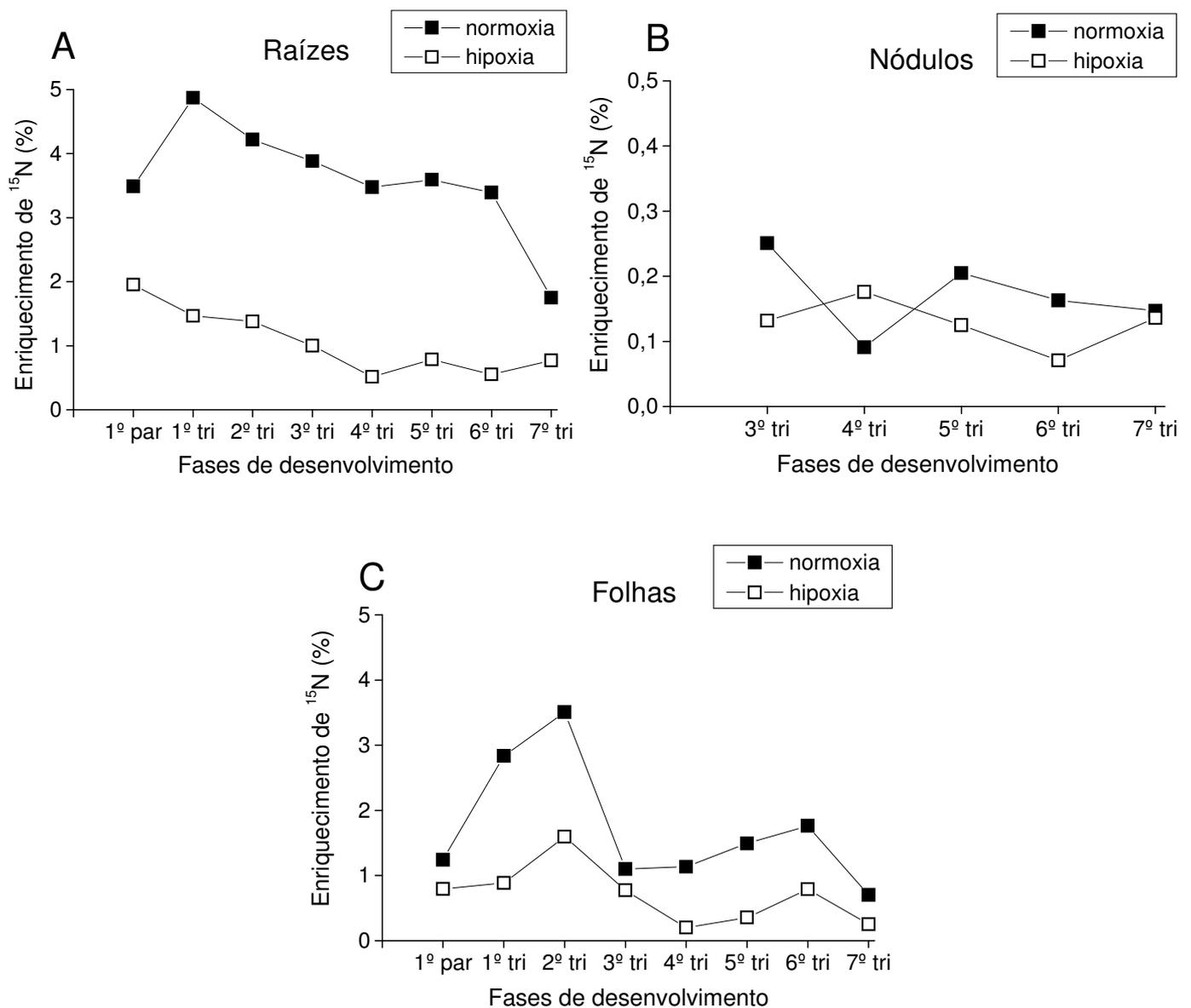


Figura 19. Incorporação de ^{15}N em plantas de soja noduladas. Enriquecimento do N das raízes (A), dos nódulos (B) e das folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (C) durante as fases do desenvolvimento das plantas em normoxia (■) e em hipoxia (□) após 48h da aplicação do isótopo $^{15}\text{NO}_3^-$. As fases de desenvolvimento foram definidas pelo estágio em que apareceu a folha primária/trifoliolada expandida indicada.

4.5.2. Teor de N presente nas plantas de soja.

O teor de N nas raízes das plantas não noduladas foi semelhante em normoxia e em hipoxia, com queda no teor no 1º par de folhas até o 2º trifólio e aumento no 3º trifólio, seguido de queda, em ambos os tratamentos (Figura 20A). A partir do 4º trifólio pode-se dizer que ocorreu manutenção no teor de N na raiz até o 7º trifólio nas plantas em normoxia e até o 6º trifólio nas plantas em hipoxia. O maior teor de N foi observado nas raízes das plantas em normoxia com 3% no 3º trifólio e nas em hipoxia, 2,1% no 7º trifólio. Geralmente, o teor de N nas raízes das plantas sob hipoxia é nitidamente menor do que em normoxia.

Nas folhas, a partir do 1º trifólio, o teor de N nas plantas em normoxia e em hipoxia seguiram um padrão, com aumento até o 3º trifólio, seguido de redução até o 6º trifólio com aumento posterior (Figura 20A). Sendo os maiores valores verificados nas plantas em normoxia do 1º par de folhas até o 3º trifólio. A partir do 3º trifólio não houve diferença no teor de N entre as plantas em normoxia e em hipoxia.

O teor de N, nas raízes das plantas noduladas, tanto em normoxia quanto em hipoxia oscilou durante todas as fases de desenvolvimento de 1,2 a 2,4% em normoxia e de 0,75 a 2,4% em hipoxia (Figura 21A). A partir do 4º trifólio houve um padrão no teor de N para ambos os tratamentos, com aumento no 5º trifólio, redução no 6º e novo aumento no 7º trifólio (Figura 21A). Normalmente, conforme observado para as plantas não noduladas, o teor de N foi menor em plantas em hipoxia.

No nódulo, o teor de N oscilou entre 4,55 e 5,3% em normoxia e entre 4,45 e 5,5% em hipoxia (Figura 21B). Esta leve variação pode ter ocorrido devido a fatores climáticos entre uma fase e outra e pela presença de nódulos ativos e inativos. Portanto, pode-se considerar que os teores apresentaram comportamento

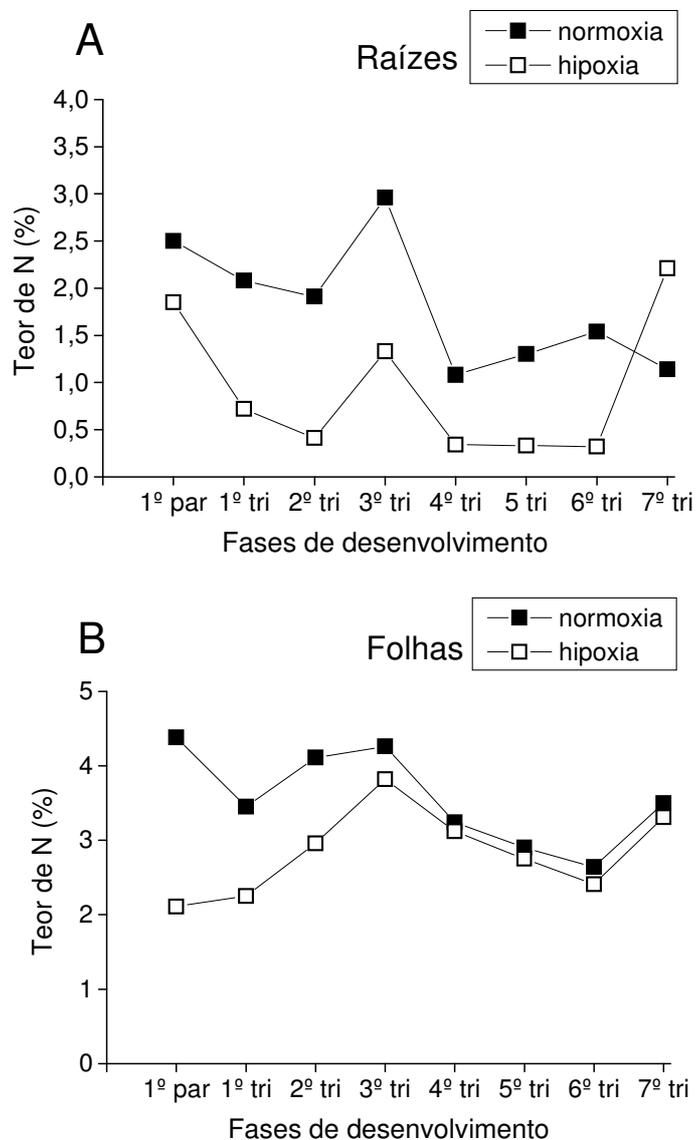


Figura 20. Teor de N (%) nas plantas de soja não noduladas. Análises das raízes (A), dos nódulos (B) e das folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (C) durante as fases do desenvolvimento das plantas após 48h em normoxia (■) e em hipoxia (□). As fases de desenvolvimento foram definidas pelo estágio em que apareceu a folha primária/trifoliolada expandida indicada.

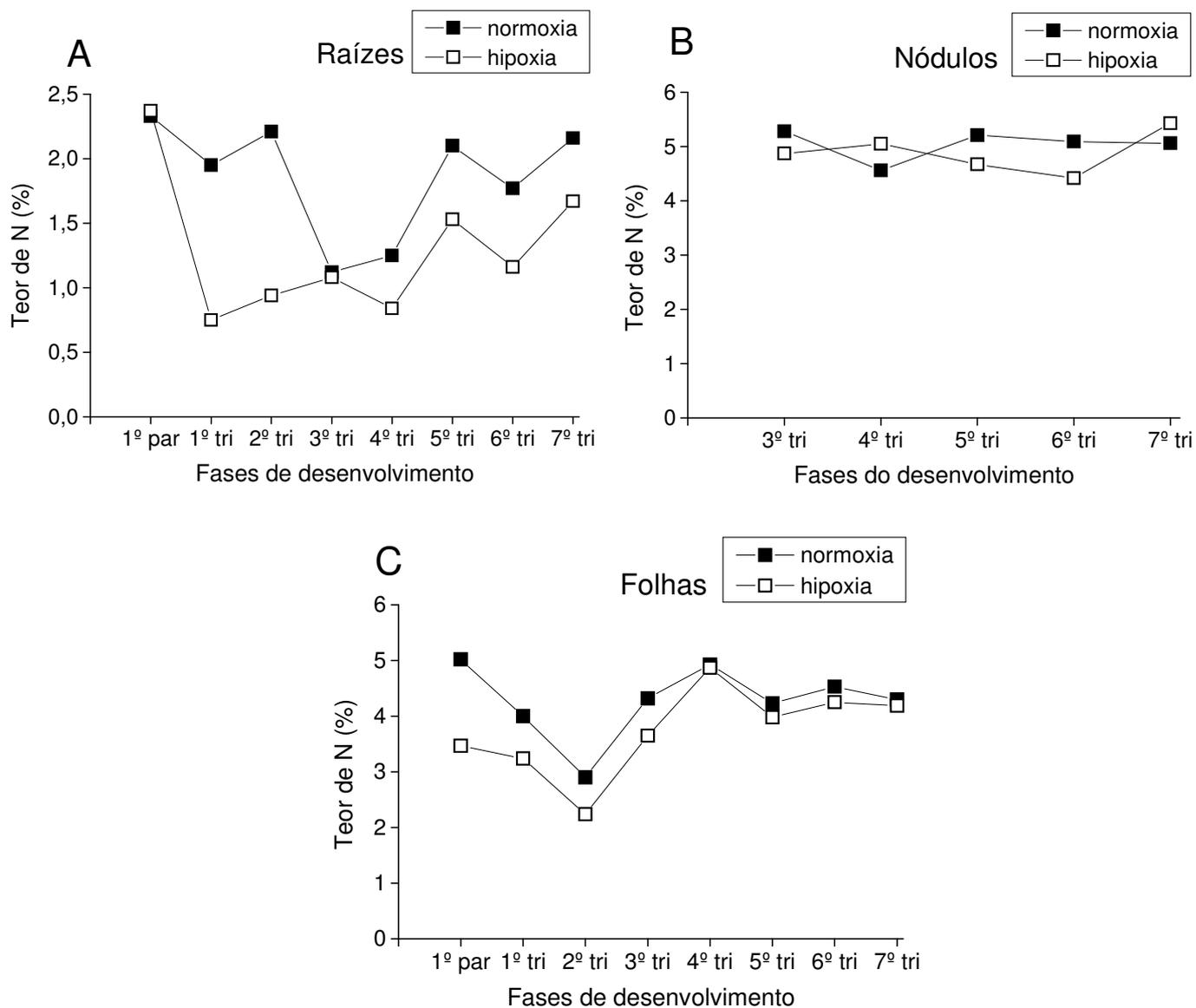


Figura 21. Teor de N (%) nas plantas de soja noduladas. Análises das raízes (A), dos nódulos (B) e das folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) (C) durante as fases do desenvolvimento das plantas após 48h em normoxia (■) e em hipoxia (□). As fases de desenvolvimento foram definidas pelo estágio em que apareceu a folha primária/trifoliolada expandida indicada.

praticamente estável. Esta variação coincide com o perfil encontrado no enriquecimento de ^{15}N nos nódulos (ver Figura 19B). Nas folhas das plantas noduladas, o teor de N manteve um padrão durante o desenvolvimento das plantas em normoxia e em hipoxia, com valores quase sempre menores nas plantas em hipoxia (Figura 21C). Os menores teores de N foram observados no 2º trifólio nos dois tratamentos, com valores de 3% em normoxia e 2,2% em hipoxia. A partir do 4º trifólio o teor de N nas plantas em normoxia e hipoxia, praticamente foram os mesmos até o 7º trifólio expandido (Figura 21C), coincidindo com o observado nas folhas das plantas não noduladas (Figura 20B).

4.5.3. Incorporação de ^{15}N em aminoácidos nas plantas de soja.

Os principais aminoácidos encontrados nas raízes, nódulos e folhas são: a Ala, Ser, Asp, Glu, Asn, por esta razão, esses aminoácidos foram escolhidos para análise da porcentagem de enriquecimento em ^{15}N . Outro aminoácido comum nas plantas é a Gln, no entanto, não foi encontrado enriquecimento significativo neste aminoácido nas plantas noduladas.

Nas raízes das plantas não noduladas, em normoxia, ocorreu enriquecimento de ^{15}N em todos os aminoácidos testados na maioria das fases de desenvolvimento. A Ala foi o único aminoácido que apresentou enriquecimento em todas as fases do desenvolvimento nos dois tratamentos testados (Figura 22). Em normoxia o enriquecimento de ^{15}N em Ala ficou entre 3,5 e 5,8%, em Ser entre 0,4% e 4,5% e em Asp, de 0,5 a 6,8%. O Glu apresentou de 0,3 a 5% de enriquecimento. O maior enriquecimento em normoxia nas raízes foi obtido pela Asn no 3º trifólio, 8,8%. Em hipoxia, nas raízes, o maior enriquecimento de ^{15}N foi obtido pela Ala no 1º trifólio

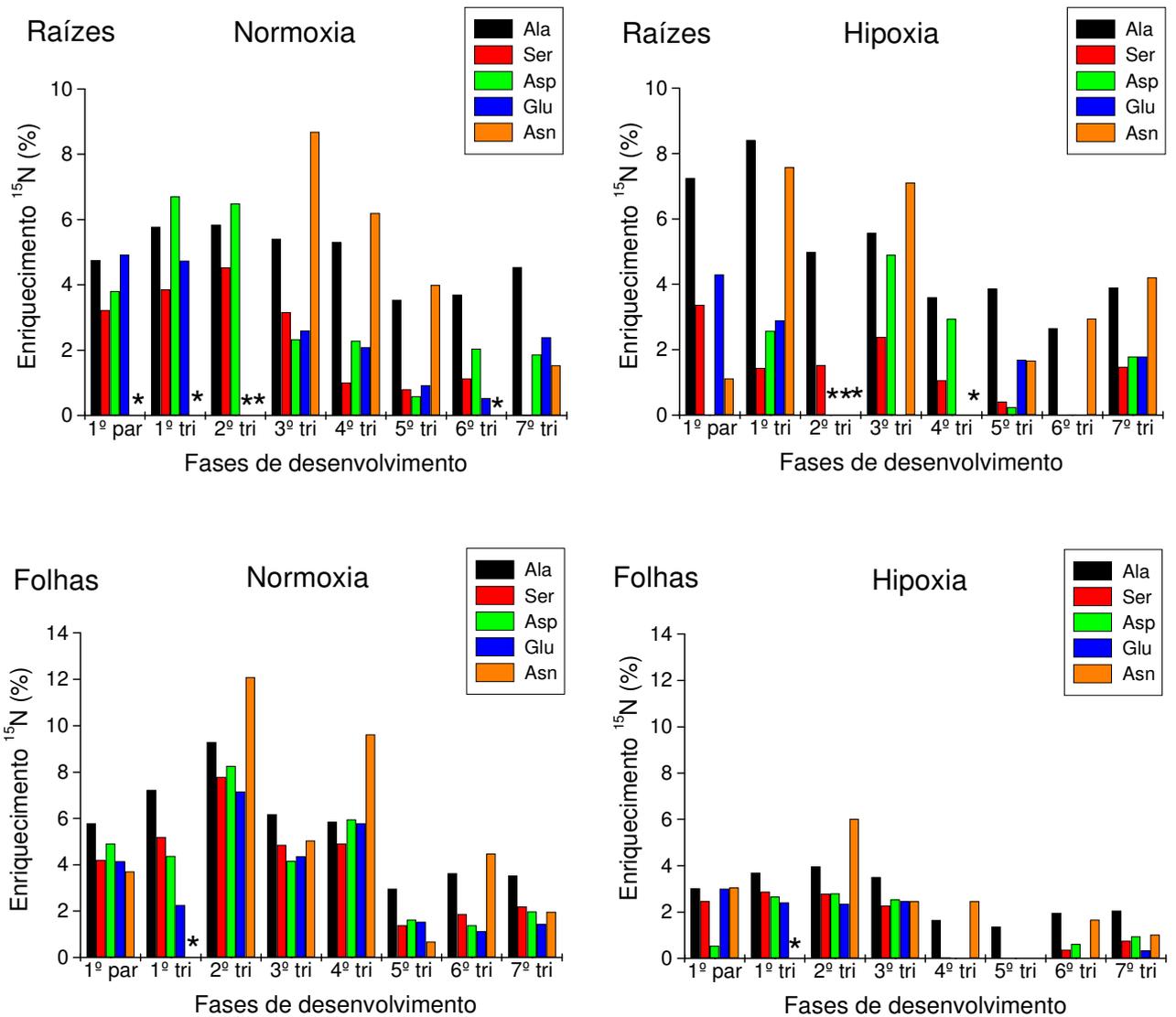


Figura 22. Incorporação de ¹⁵N em aminoácidos nas plantas de soja não noduladas. Avaliações nas raízes, nos nódulos e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) das plantas em normoxia e hipoxia. O asterisco indica a não detecção do aminoácido.

com 8,4% e para este aminoácido o menor enriquecimento foi de 2,8% no 6º trifólio. A Ser apresentou valores de enriquecimento de 0,2% a 3,2%, o Asp enriqueceu 5% no 3º trifólio e o Glu apresentou enriquecimento de 1,8% a 4,1%. A Asn apresentou grandes valores de enriquecimento de 1 a 7,5%, sendo o maior valor obtido no 1º trifólio (Figura 22).

Nas folhas das plantas não noduladas, houve maior incorporação de ^{15}N nos aminoácidos avaliados em normoxia que em hipoxia em praticamente todas as fases do desenvolvimento das plantas (Figura 22). Em normoxia, houve enriquecimento nos cinco aminoácidos avaliados. A incorporação em Ala variou de 3 a 9,2%, em Ser de 1,6 a 7,9%, em Asp de 1,7 a 8,2%, em Glu de 1 a 7% e em Asn de 0,5 a 12%. Os maiores enriquecimentos foram em Asn no 2º (12,1%) e no 4º trifólio (9,8%). Em hipoxia, o maior enriquecimento foi de 6% em Asn, assim como observado em normoxia no 2º trifólio. Em Ala os valores de enriquecimento oscilaram de 1,6 a 4%, em Ser de 0,2 a 3% e em Asp de 0,7 a 2,8%. O Glu obteve enriquecimento de 0,2 a 3% e a Asn de 0,8 a 6%, exceto no 1º e no 5º trifólio (Figura 22).

Nas raízes das plantas noduladas em normoxia observou-se para Ala valores de enriquecimento entre 4,2 e 7,8%, já em hipoxia, os valores ficaram entre 3,8 e 5,9% (Figura 23). O enriquecimento nos aminoácidos Ser em normoxia ficou de 2,5 a 4,8%, Asp foi de 4 a 8,8% e Glu de 4,9 a 9,8%. A maior porcentagem de enriquecimento foi em Asn (12%) no 6º trifólio. Nas plantas em hipoxia, apenas a Ser obteve enriquecimento de ^{15}N nas raízes do 1º par de folhas até o 7º trifólio totalmente expandido com valores de 3 a 4,8% de enriquecimento. O Asp, e o Glu, apresentaram enriquecimento no 1º par de folhas e do 3º ao 5º trifólio, oscilando entre valores de 0,4 a 3,1% para o Asp e de 2,1 a 4,2% para o Glu. A incorporação

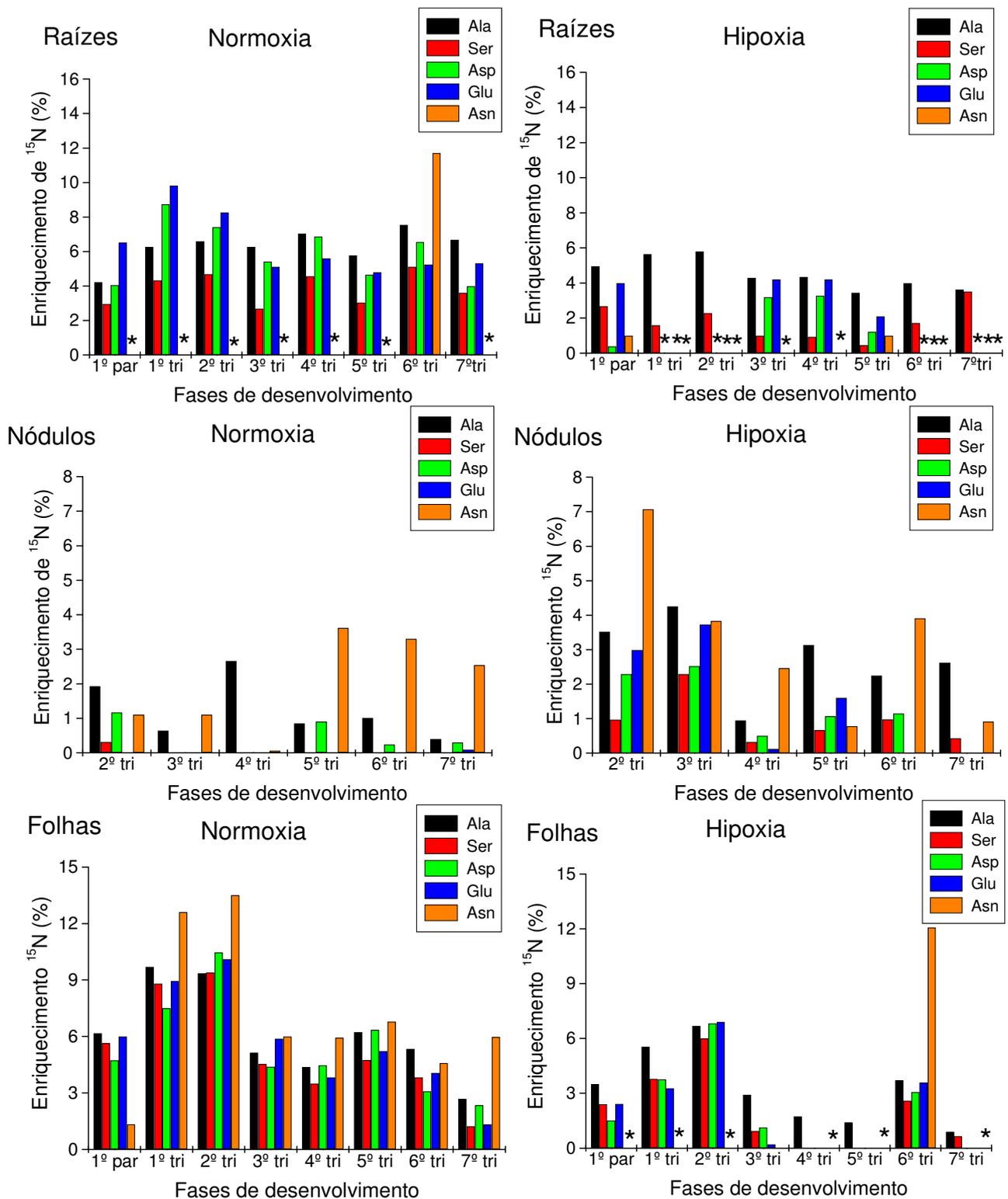


Figura 23. Incorporação de ^{15}N em aminoácidos nas plantas de soja noduladas.

Avaliações nas raízes, nos nódulos e nas folhas (trifólio mais novo totalmente expandido) das plantas em normoxia e hipoxia. O asterisco indica a não detecção do aminoácido.

em Asn, tanto em normoxia quanto em hipoxia, muitas vezes não foi detectada, sendo observada nas raízes apenas no 6º trifólio (12%) em normoxia e no 1º par de folhas (0,8%) e no 5º trifólio (1%) em hipoxia (Figura 23).

Nos nódulos das plantas em normoxia, os aminoácidos que apresentaram maior enriquecimento de ^{15}N foram a Ala (presente em todas as fases do desenvolvimento), o Asp e a Asn, com valores superiores a 2,6%, 1,2% e de 3,6%, respectivamente. Os demais aminoácidos, Ser e Glu apresentaram enriquecimento apenas no 2º trifólio (Ser) e no 7º trifólio (Glu) com valores inferiores a 0,3% (Figura 23). Em hipoxia, a porcentagem de enriquecimento no nódulo foi superior a das plantas em normoxia. A Ala apresentou enriquecimento entre 1 e 4,2%, a Ser de 0,3 a 2,3% e a Asn de 1 a 7%. No caso de Asp só não foi possível detectar enriquecimento de ^{15}N no 7º trifólio. O Glu apresentou maior enriquecimento (3,8%) no 3º trifólio (Figura 23).

Nas folhas das plantas noduladas em normoxia houve enriquecimento de ^{15}N em todos os aminoácidos avaliados e em todas as fases de desenvolvimento, sendo os maiores valores obtidos pela Asn, com 12,5% e 13,5%, no 1º e 2º trifólio respectivamente (Figura 23). A Ala apresentou padrão semelhante ao observado nas raízes nestas mesmas condições, no entanto com valores entre 6 e 9,5%. A Ser apresentou enriquecimento entre 1 e 9,1%, o Asp entre 2 e 10,5% , o Glu entre 1,3 e 10% e para Asn a variação observada foi de 1 a 13%. A incorporação em Asn foi a que apresentou maiores valores. Nas folhas das plantas em hipoxia observou-se que apenas a Ala obteve enriquecimento de ^{15}N em todas as fases do desenvolvimento com valores inferiores a 6,5%. A Ser apresentou o maior enriquecimento (6%) no 2º trifólio. O Asp e o Glu não obtiveram enriquecimento no 4º, 5º e no 7º trifólio e os

maiores valores para estes aminoácidos foram 7% no 2º trifólio. Asn só apresentou enriquecimento no 6º trifólio com valor de 12% (Figura 23).

4.6. Resposta de cinco cultivares de soja ao nitrato sob alagamento prolongado do sistema radicular.

O objetivo deste trabalho foi avaliar como cinco cultivares de soja não noduladas (IAC Foscarin-31, IAC-23, IAC-17, IAC-24 e IAC-18) produzidas no estado de São Paulo respondem ao nitrato em condições de alagamento prolongado do sistema radicular, utilizando para isso parâmetros de desenvolvimento.

As sementes de cada cultivar foram germinadas em vasos com vermiculita e quando as plantas atingiram o estágio V4 de desenvolvimento foi montado o experimento. O alagamento foi realizado colocando os vasos com as plantas dentro de outro vaso maior e adicionado a eles: solução nutritiva sem nitrato “-N”; solução nutritiva com nitrato “+N”; e solução nutritiva com nitrato adicionado apenas no sétimo dia de análise “+N adição”. Nos tratamentos, os vasos foram completados com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1938) em concentração 1/3 do normal, sem nitrato ou com 5 mM de nitrato. A solução foi trocada a cada sete dias.

As coletas foram realizadas com 0 e 28 dias de tratamento e avaliados os parâmetros de desenvolvimento: área foliar; massa seca da parte aérea (MSPA); diâmetro do caule sob a lâmina d'água; o volume do sistema radicular (VSR) e massa seca do sistema radicular (MSSR). Análises histológicas também foram realizadas no 28º dia de experimento no nó cotiledonar do caule (local de delimitação do alagamento nas plantas), na raiz principal e nas raízes adventícias formadas após o alagamento.

4.6.1. O efeito do alagamento na parte aérea das plantas.

A análise da área foliar das cinco cultivares de soja no dia 0 não apresentou diferença significativa entre as cultivares IAC Foscarin-31, IAC-17, IAC-24 e IAC-18. A cultivar IAC-23 diferiu significativamente apenas das cultivares IAC-24 e IAC-18, apresentando maior área foliar (Figura 24). No dia 28 não houve diferença significativa na área foliar das cinco cultivares no tratamento “-N”. No tratamento “+N”, a cultivar IAC-17 apresentou a maior área foliar entre as cinco cultivares, com média de 1430 cm². As cultivares IAC-23 e IAC-24 não diferiram, obtendo em torno de 1300 cm². As cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-18 apresentaram os menores valores de área foliar no tratamento “+N” após 28 dias de experimento apresentando cerca de 1000 cm². No tratamento “+N adição” obtiveram-se as maiores áreas foliares, em torno de 1400 cm³, nas cultivares IAC Foscarin-31, IAC-23 e IAC-17 não havendo diferença entre elas. As menores áreas foliares foram observadas nas cultivares IAC-24 e IAC-18, em torno de 800 cm² (Figura 24).

Análise entre os tratamentos para a mesma cultivar mostraram que não houve diferença entre o dia 0 e as plantas “-N” nas cultivares IAC Foscarin-31, IAC-23, IAC-17, IAC-24 e IAC-18 (Figura 24), indicando baixíssimo crescimento destas plantas na ausência de nitrogênio.

Não houve diferença na área foliar das plantas da cultivar IAC-23 submetidas aos tratamentos “+N” e “+N adição” no dia 28 e o mesmo foi observado para as cultivares IAC-17 e IAC-18. A cultivar IAC-24, apresentou menor área foliar no tratamento “+N adição” com plantas 23,33% menores que as plantas “+N”. A cultivar IAC Foscarin-31, ao contrário, apresentou maior área foliar nas plantas “+N adição” com valor de 1400 cm² (Figura 24).

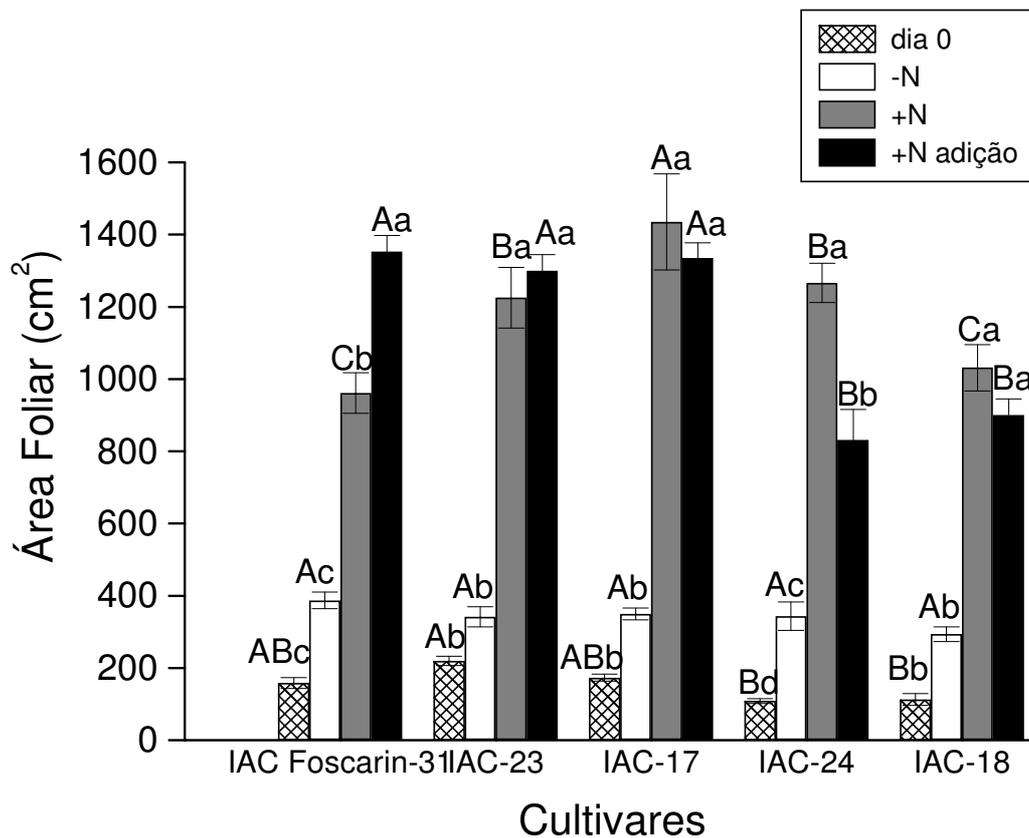


Figura 24. Área foliar de cinco cultivares de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular. Análises no dia 0 (XX) e alagadas sem nitrato “-N” (□), com nitrato “+N” (■) e com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição” (■) por 28 dias de experimento. As barras representam o erro padrão das médias e as letras, o teste Tukey a 1% de probabilidade. As letras maiúsculas indicam a comparação entre as cultivares para o mesmo tratamento e as letras minúsculas, a comparação entre os tratamentos para a mesma cultivar.

No dia 0 não havia diferença na MSPA entre as cinco cultivares avaliadas (Figura 25). Nas plantas “-N” houve aumento significativo na MSPA para todas as cultivares do dia 0 ao dia 28, exceto para a IAC-18. Nas plantas “+N” houve maior MSPA, com diferenças significativas entre cultivares. Os maiores valores de MSPA, entre 10,5 e 11,5 g, foram encontrados nas cultivares IAC-23 e IAC-24, respectivamente. Neste mesmo tratamento não houve diferença entre as cultivares IAC-23 e IAC-17. Valores em torno de 6,25 g foram encontrados nas cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-18 no dia 28 (Figura 25).

No tratamento “+N adição” houve maior acúmulo de MSPA que no tratamento “+N”, na cultivar IAC Foscarin-31 (9,1 g), menor na cultivar, IAC-24 (7,5 g) e igual nas demais cultivares. O perfil observado neste tratamento foi semelhante ao verificado para área foliar (Figura 24).

Na cultivar IAC Foscarin-31 foi observado aumento de 1 g no dia 0 para 3,5 g na MSPA das plantas “-N”, no dia 28. Plantas “+N” obtiveram aumento superior, tendo em torno de 6 g de MSPA. Já a adição de nitrato promoveu maiores valores de MSPA, em torno de 9 g (Figura 25).

As cultivares IAC-23 e IAC-17 apresentaram o mesmo comportamento para a MSPA. Plantas que no dia 0 apresentavam pouco mais de 1 g chegaram a 3 g de MSPA no tratamento “-N”. Nos tratamentos “+N” e “+N adição” a MSPA foi de aproximadamente 11 g no dia 28 (Figura 25).

A cultivar IAC-24 apresentou aumento em torno de 200% na MSPA das plantas “-N” quando comparada com as do dia 0. Plantas “+N” apresentaram valores aproximadamente 2 vezes maiores que no dia 0 e aproximadamente 9 vezes maiores que nas plantas “-N”. A adição de nitrato promoveu valores médios de 7 g,

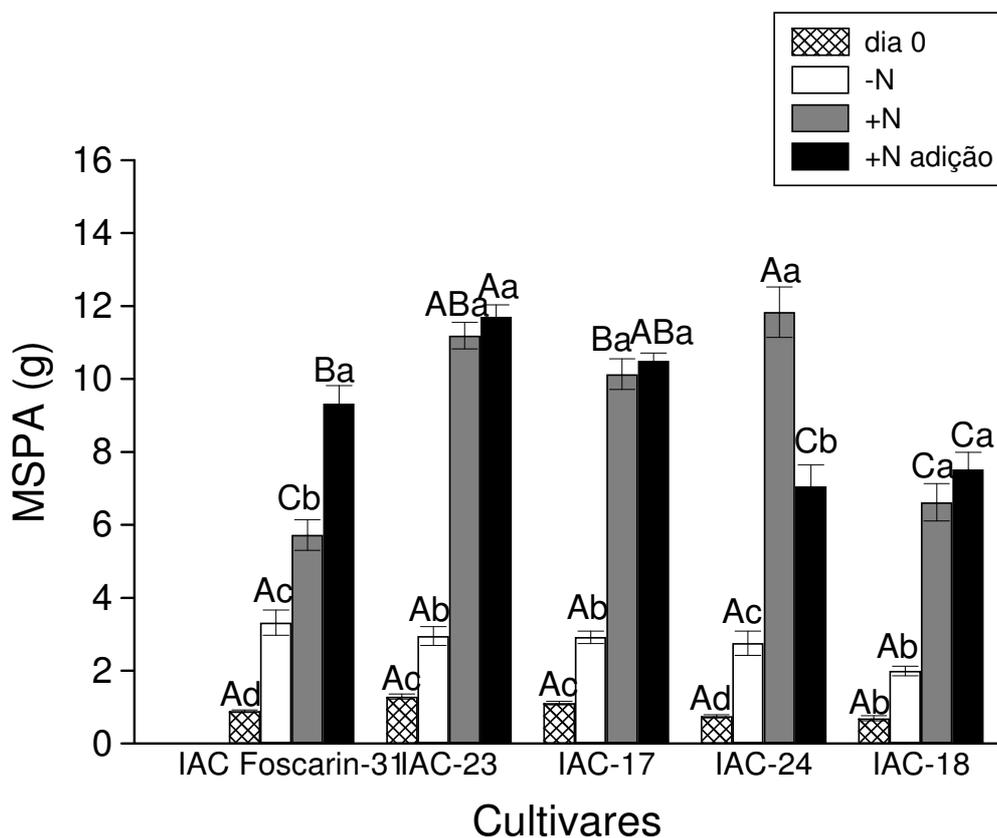


Figura 25. Massa seca da parte aérea de cinco cultivares de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular. Análises no dia 0 (XX) e alagadas sem nitrato “-N” (□), com nitrato “+N” (■) e com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição” (■) por 28 dias de experimento. As barras representam o erro padrão das médias e as letras, o teste Tukey a 1% de probabilidade. As letras maiúsculas indicam a comparação entre as cultivares para o mesmo tratamento e as letras minúsculas, a comparação entre os tratamentos para a mesma cultivar.

sendo estes inferiores aos observados nas plantas "+N" (12 g) no dia 28 (Figura 25).

Na cultivar IAC-18, as plantas "-N" não diferiram das plantas do dia 0. As plantas alagadas sob as duas condições de nitrato (" +N" e "+N adição") não diferiram entre si, e apresentaram valores em torno de 7 g de MSPA (Figura 25).

4.6.2. O alagamento e o diâmetro do caule.

No dia 0 não houve diferença entre as cinco cultivares de soja avaliadas, assim como nas análises da parte aérea no mesmo período (ver Figuras 24 e 25). A maioria das cultivares não apresentou diferença no diâmetro do caule no tratamento "-N" quando comparadas entre si. O diâmetro do caule da cultivar IAC-18 "-N" não diferiu do diâmetro do caule da cultivar IAC Foscarin-31 com valores ao redor de 5 mm (Figura 26).

As cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-24 quando submetidas ao tratamento +N apresentaram os maiores valores de diâmetros do caule atingindo valores superiores a 8 mm (Figura 26). As cultivares IAC-23, IAC-17 e IAC-18 não apresentaram diferença significativa no diâmetro do caule no tratamento "+N" com valores superiores a 7 mm. O diâmetro do caule entre as cultivares IAC-17 e IAC-24 não diferiram no tratamento "+N" (Figura 26).

O maior diâmetro do caule nas plantas "+N adição" foi observado para as cultivares IAC-23 que atingiu 8 mm e IAC Foscarin-31 que atingiu 7 mm. A IAC-17 com diâmetro do caule superior a 7 mm não diferiu das cultivares IAC Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24.

A cultivar IAC Foscarin-31 apresentou maior diâmetro do caule (5,1 mm) nas plantas "-N" em relação às plantas no dia 0 (2,4 mm) e estes valores foram

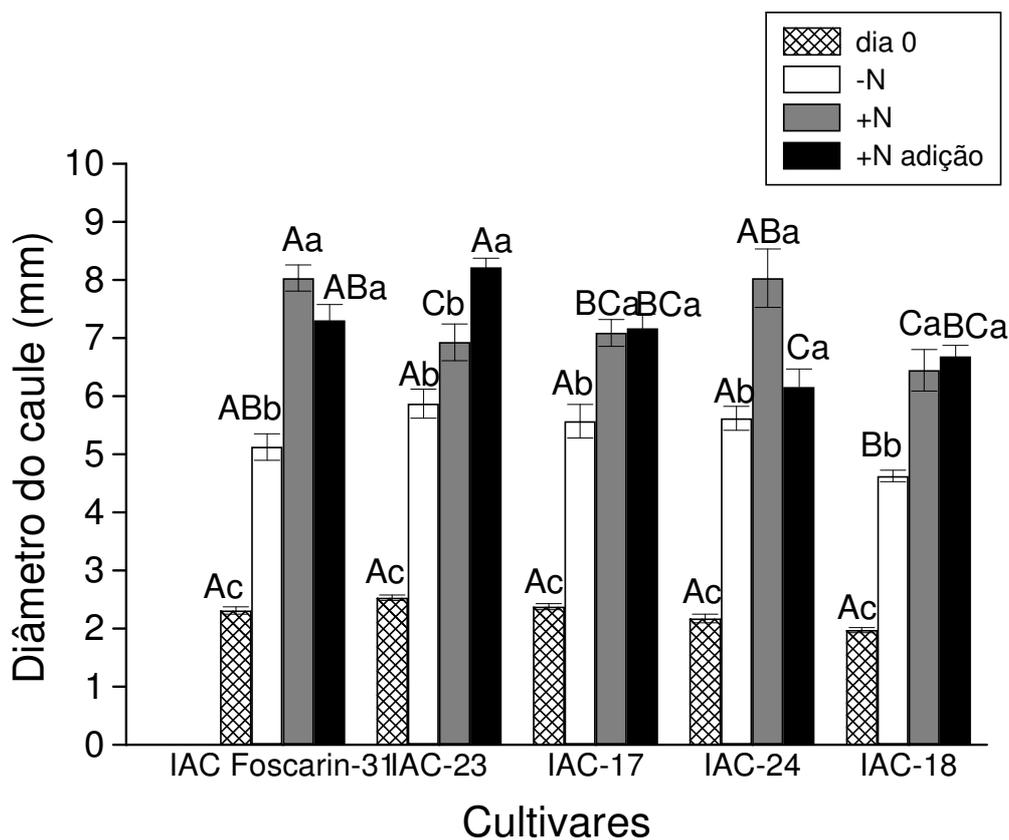


Figura 26. Diâmetro do caule de cinco cultivares de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular. Análises no dia 0 (XX) e alagadas sem nitrato “-N” (□), com nitrato “+N” (■) e com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição” (■) por 28 dias de experimento. As barras representam o erro padrão das médias e as letras, o teste Tukey a 1% de probabilidade. As letras maiúsculas indicam a comparação entre as cultivares para o mesmo tratamento e as letras minúsculas, a comparação entre os tratamentos para a mesma cultivar.

inferiores aos obtidos nos dois tratamentos com nitrato (em torno de 7 mm). Este mesmo comportamento foi observado nas cultivares IAC-17 e IAC-18 (Figura 26).

A cultivar IAC-23 apresentou maior diâmetro no caule nas plantas “+N adição” com valores de 8 mm, seguido das plantas “-N” e “+N”, que não diferiram entre si. Resultado diferente foi observado na cultivar IAC-24, onde os maiores valores de diâmetro do caule foram encontrados nas plantas “+N” e “+N adição”, 7,5 mm (Figura 26).

É notável que a resposta ao nitrato em termos de aumento no diâmetro do caule tenha sido menor do que para os outros parâmetros, pois na ausência do nitrato o aumento no diâmetro do caule foi bastante significativo e para uma cultivar (IAC-23) este não diferiu do aumento obtido com nitrato.

4.6.3. O efeito do alagamento no sistema radicular das cultivares de soja.

Análises do VSR entre as cinco cultivares não demonstraram diferença entre elas no dia 0 (Figura 27). No dia 28, as cultivares IAC Foscarin-31, IAC-23, IAC-17 e IAC-18 não diferiram no VSR para o tratamento “-N”. A cultivar IAC-24 apresentou o maior VSR, em torno de 22,5 cm³ neste mesmo tratamento, e as cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-23 não diferiram da IAC-24 (Figura 27).

A resposta ao nitrato foi bastante variável entre as cultivares. As cultivares IAC-23 e IAC-24 apresentaram os maiores valores do VSR (44 cm³) nas plantas “+N”. A cultivar IAC-17 apresentou em média 32,5 cm³ de VSR neste mesmo tratamento. Valores inferiores a este nas plantas “+N” foram obtidos pelas cultivares IAC Foscarin-31 (22 cm³) e IAC-18 (16 cm³).

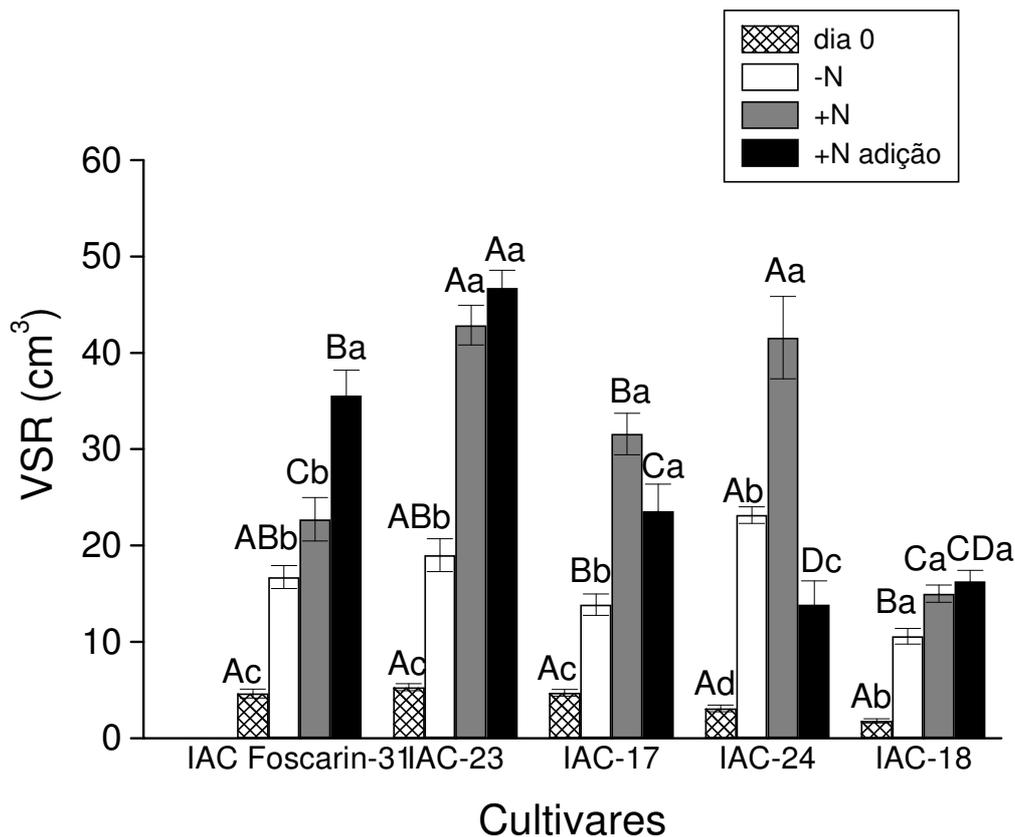


Figura 27. Volume do sistema radicular de cinco cultivares de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular. Análises no dia 0 (XX) e alagadas sem nitrato “-N” (□), com nitrato “+N” (■) e com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição” (■) por 28 dias de experimento. As barras representam o erro padrão das médias e as letras, o teste Tukey a 1% de probabilidade. As letras maiúsculas indicam a comparação entre as cultivares para o mesmo tratamento e as letras minúsculas, a comparação entre os tratamentos para a mesma cultivar.

A adição de nitrato promoveu o maior VSR na cultivar IAC-23 (48 cm^3) e os menores valores nas cultivares IAC-24 e IAC-18 (em torno de 16 cm^3) (Figura 27).

Na cultivar IAC Foscarin-31 observou-se aumento de aproximadamente quatro vezes entre as plantas “-N” e as plantas no dia 0. As plantas “-N” não diferiram das “+N” no VSR. Valores médios de 35 cm^3 foram encontrados nas plantas “+N adição”, as quais tiveram aumento de sete vezes em relação ao dia 0.

Na cultivar IAC-23 observou-se aumento nas plantas “-N” em relação ao dia 0 de 5 cm^3 para 19 cm^3 . Nesta cultivar foram encontrados valores médios de 46 cm^3 de VSR nos tratamentos com nitrato, os quais não diferiram entre si (Figura 27).

Na cultivar IAC-17, aumento de duas vezes foi observado em plantas “-N” e de cinco vezes nas plantas “+N adição” em relação ao dia 0 e o maior valor de VSR foi de 32 cm^3 nas plantas “+N”.

A cultivar IAC-24 apresentou aumento de 4,6 vezes no VSR nas plantas “-N” comparado com o dia 0, obtendo valores médios de 23 cm^3 . As plantas “+N” apresentaram aumento de 8,6 vezes e as plantas “+N adição” de 3 vezes em relação ao dia 0, apresentando valores em torno de 43 cm^3 e de 15 cm^3 , respectivamente (Figura 27).

Na cultivar IAC-18, o VSR foi menor nas plantas no dia 0 com 2 cm^3 e não houve diferença entre os tratamentos no dia 28 com valores superiores a 10 cm^3 (Figura 27).

Não houve diferença na MSSR no dia 0 entre as cultivares avaliadas. Para o tratamento “-N” não houve diferença significativa na MSSR entre as cinco cultivares avaliadas (Figura 28).

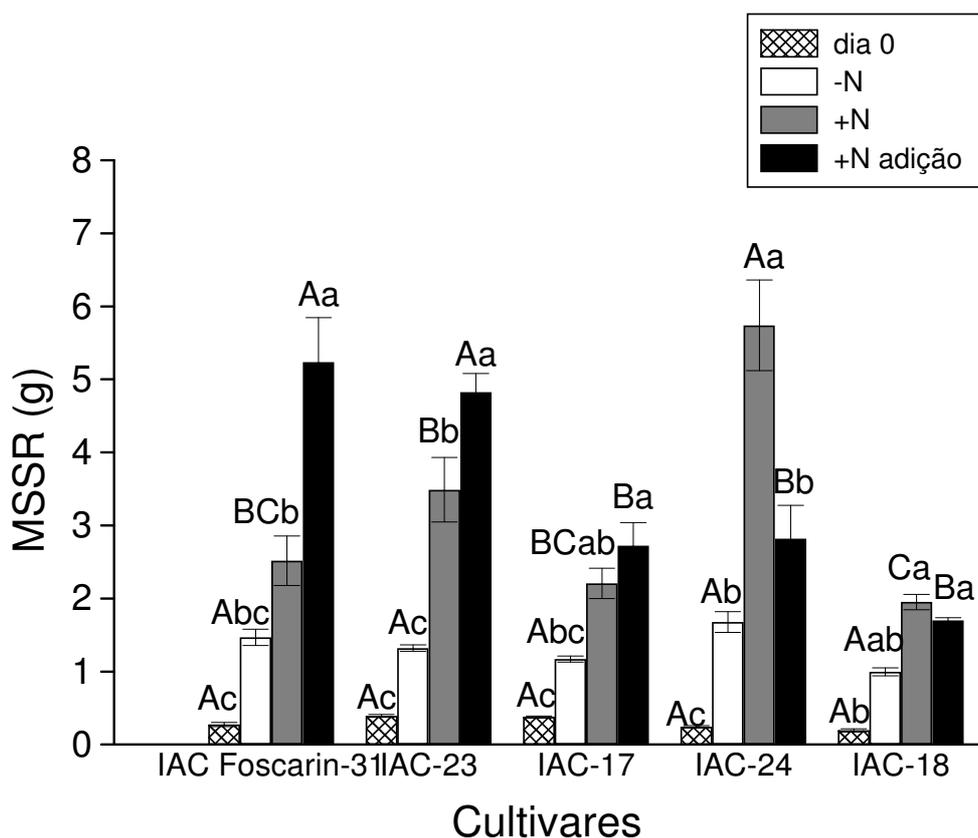


Figura 28. Massa seca do sistema radicular de cinco cultivares de soja submetidas ao alagamento do sistema radicular. Análises no dia 0 (XX) e alagadas sem nitrato “-N” (□), com nitrato “+N” (■) e com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição” (■) por 28 dias de experimento. As barras representam o erro padrão das médias e as letras, o teste Tukey a 1% de probabilidade. As letras maiúsculas indicam a comparação entre as cultivares para o mesmo tratamento e as letras minúsculas, a comparação entre os tratamentos para a mesma cultivar.

As plantas "+N" não diferiram na MSSR entre as cultivares IAC Foscarin-31, IAC-23 e IAC-17. A cultivar IAC-18 com valor médio de 2 g de MSSR não apresentou diferença das cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-17 neste parâmetro de desenvolvimento. As plantas "+N" da cultivar IAC-24 apresentaram o maior valor médio de MSSR (5,7 g) (Figura 28).

As plantas "+N adição" das cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-23 apresentaram as maiores MSSR com valores médios de 5 g. As cultivares IAC-17, IAC-24 e IAC-18 não apresentaram diferença na MSSR.

A cultivar IAC Foscarin-31 não apresentou diferença na MSSR entre o dia 0 e as plantas "-N", assim como não houve diferença entre as plantas "-N" e "+N". A adição de nitrato promoveu maior MSSR para esta cultivar, obtendo valores médios de 5 g.

A cultivar IAC-23 não apresentou diferença na MSSR entre as plantas no dia 0 e as plantas "-N", as quais apresentaram valores inferiores aos obtidos pelas plantas dos tratamentos "+N" e "+N adição", valores médios de 4 g (Figura 28).

Para a cultivar IAC-17 as plantas "-N" não diferiram das plantas "+N" e não houve diferença na MSSR entre os dois tratamentos com nitrato.

Na cultivar IAC-24, diferentemente das demais cultivares, as plantas "-N" tiveram aumento em média de 1 g em relação ao dia 0, não diferenciando das plantas "+N adição". O maior valor de MSSR para esta cultivar foi encontrado nas plantas "+N", chegando a 6,5 g (Figura 28).

A cultivar IAC-18 não apresentou diferença na MSSR entre as plantas no dia 0 e as plantas "-N", assim como não diferiu entre os três tratamentos no dia 28.

4.6.4. Alterações nos tecidos das plantas em função do estresse por alagamento.

As análises anteriores mostraram alterações nos parâmetros de desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular nas cultivares. Escolheu-se a cultivar IAC-23, para analisar histologicamente e compreender o que ocorreu nos tecidos das plantas, como forma de entender as variações no crescimento e na estrutura das mesmas. Esta cultivar foi escolhida, dentre as utilizadas neste estudo, por indicar tolerância ao alagamento. De acordo com as observações visuais realizadas durante o experimento verificou-se que em todas as cultivares ocorrem as modificações teciduais, porém em intensidades diferentes. Desta forma a análise de apenas uma cultivar nos permite inferir informações sobre as demais cultivares.

Para comparar as estruturas anatômicas avaliadas, no dia 0, foram mantidas as plantas da cultivar IAC-23 não alagadas em vasos, e após 28 dias, foram coletados o caule (5 mm acima e abaixo do nó cotiledonar), a raiz principal e as adventícias. E estas plantas foram denominadas controle.

O caule das plantas controle já se encontrava em estágio secundário de crescimento evidenciado pela formação de câmbio (ou faixa cambial), que produz floema secundário externamente e xilema secundário internamente, além da presença do início da instalação da periderme e lenticelas (Figura 29A).

Nas plantas alagadas, que também estavam em estágio secundário de crescimento, células parenquimáticas do córtex e possivelmente células do periciclo se dividiram intensamente formando um tecido com células parenquimáticas de arranjo muito frouxo, o aerênquima (Figuras 29 B,C,D)

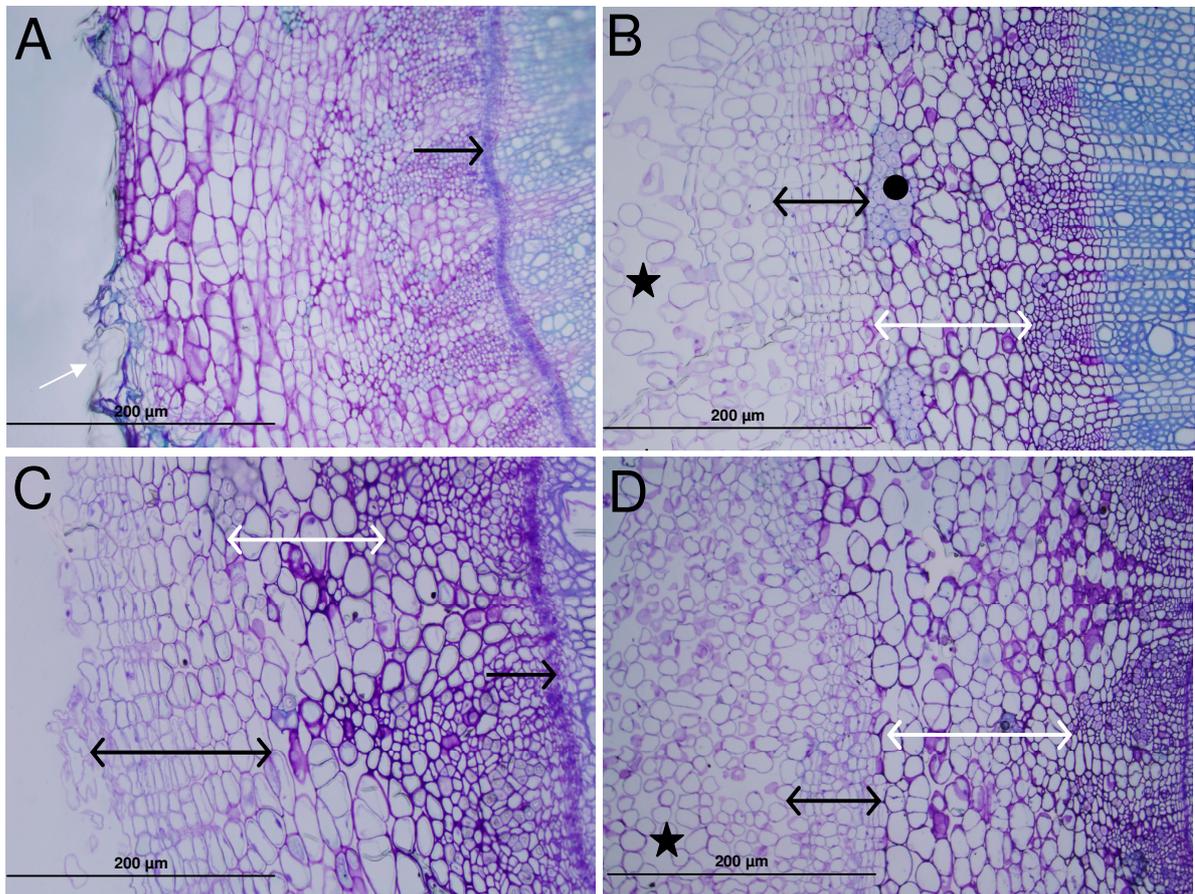


Figura 29. Seções transversais do caule de plantas de soja da cultivar IAC-23 alagadas durante 28 dias. (A) controle; (B) plantas alagadas sem nitrato “-N”; (C) plantas alagadas com nitrato “+N”; (D) plantas alagadas com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição”. A seta branca indica a lenticela e as setas pretas a faixa cambial. A região interna às setas duplas pretas mostra as células em divisão para formar o aerênquima e a região interna às setas duplas brancas indica o córtex. O círculo indica as fibras de esclerênquima e a estrela o aerênquima.

Nas plantas “-N” observou-se o desenvolvimento de fibras de esclerênquima no córtex próximas ao floema (Figura 29B), sendo que a instalação das células em divisão que formaram o aerênquima ocorreu externamente a estas fibras (Figura 29B), deslocando e/ou arrebatando partes do córtex.

Nas plantas “+N”, as células em divisão para formar o aerênquima estavam dispostas de maneira mais compacta e o aerênquima formado apresentava arranjo menos frouxo que o arranjo das plantas “-N”.

A adição de nitrato aparentemente forma aerênquima mais compacto, com maior número de células e espaços intercelulares, embora estes espaços sejam menores que nas plantas sem nitrato (Figuras 29A-D).

A raiz principal, assim como o caule, estava em estágio secundário de crescimento (Figura 30A), constatado pela formação de xilema e floema secundários. Na planta controle, o córtex estava colapsado devido ao atrito com a vermiculita (Figura 30A).

Assim como no caule, o alagamento promoveu a formação de aerênquima a partir de células parenquimáticas do córtex e possivelmente também do periciclo como pode ser observado na Figura 28C. O aerênquima formado com a adição de nitrato, assim como no caule, apresentou células de arranjo mais compacto que nas plantas sem adição de nitrato (Figura 30A-D).

Na raiz adventícia formada após a instalação do alagamento do sistema radicular observou-se as mesmas características que na raiz principal para todos os tratamentos (Figura 31B,C,D), com células de arranjo mais compacto e aerênquima nas plantas “+N adição” (Figura 31C,D). Esses resultados indicam que as modificações na estrutura das plantas (formação de aerênquima) para suportar a

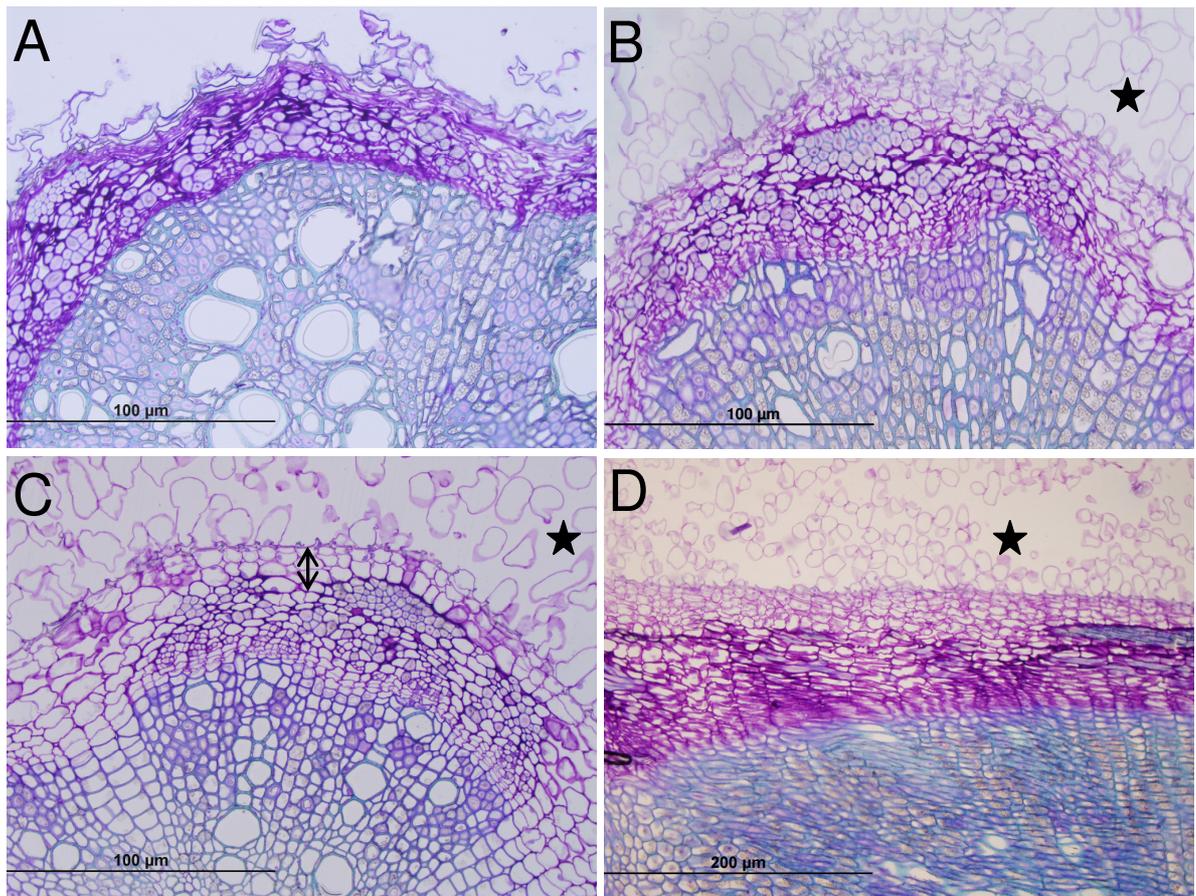


Figura 30. Seções transversais da raiz principal de soja da cultivar IAC-23 alagadas durante 28 dias. (A) controle; (B) plantas alagadas sem nitrato “-N”; (C) plantas alagadas com nitrato “+N”; (D) plantas alagadas com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição”. A região interna à seta dupla preta compreende células em divisão para formar o aerênquima, e a estrela o aerênquima.

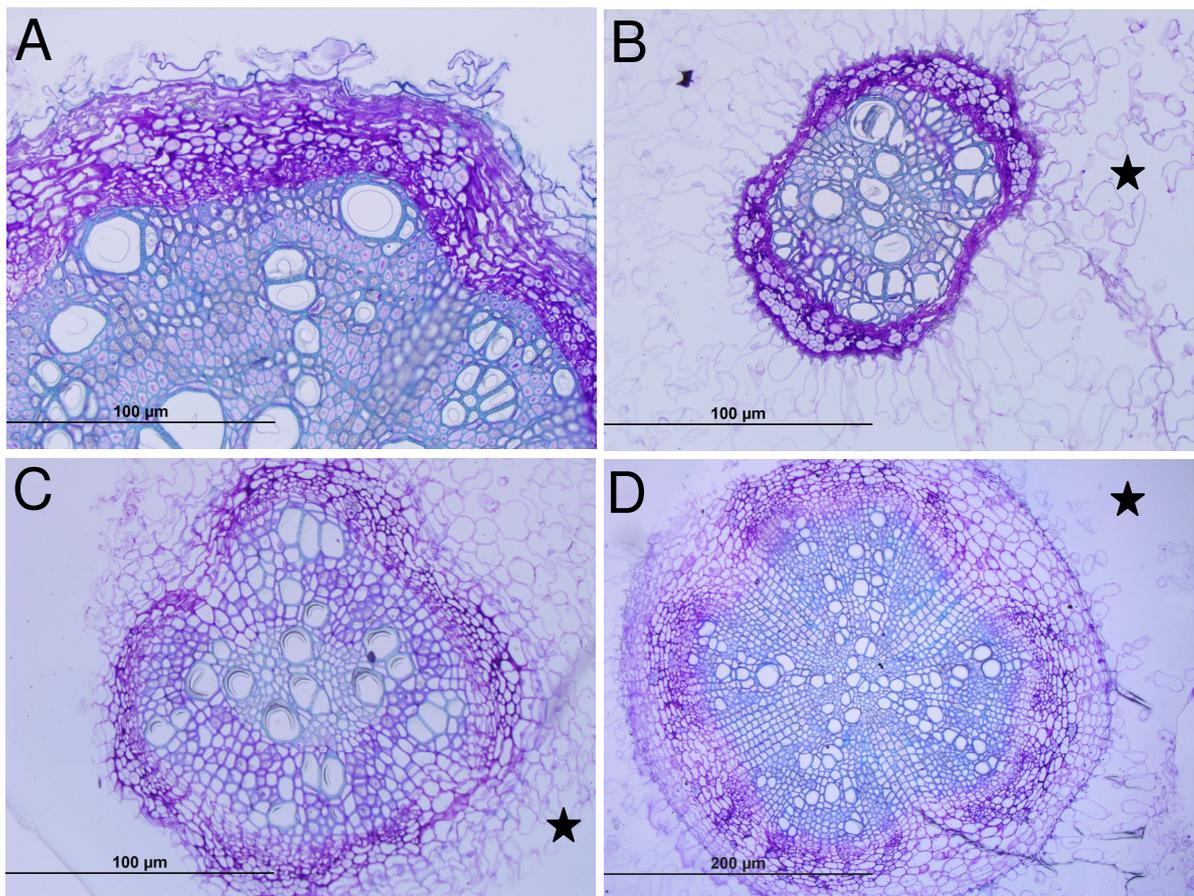


Figura 31. Seções transversais de raiz adventícia de soja da cultivar IAC-23 após alagamento do sistema radicular. (A) controle; (B) plantas alagadas sem nitrato “-N”; (C) plantas alagadas com nitrato “+N”; (D) plantas alagadas com nitrato adicionado no dia 7 “+N adição”. A estrela indica o aerênquima.

falta de oxigênio, ocorrem de forma semelhante desde a região do caule, onde a planta foi alagada, até a raiz principal ou adventícia que está em crescimento.

Observações visuais durante o experimento mostraram maior formação de raízes adventícias nos tratamentos “+N” e “+N adição”, chegando a constituir externamente mais de 75% de todo sistema radicular da planta no dia 28, e cobrindo praticamente toda lâmina d’ água do vaso (dados não mostrados). Nas plantas “-N”, as raízes adventícias constituíram de 50 a 75% neste mesmo período sugerindo forma de obtenção de oxigênio e retardo na formação de aerênquima.

Em relação à formação de aerênquima, também por observações visuais, observou-se tecido branco esponjoso nas plantas “+N” e “+N adição”, no dia 28 (Figura 32). Esse tecido ocupava de 25 a 50% da região entre o nó cotiledonar e a zona apical da raiz principal. Nas plantas “-N” esse tecido ocupava de 50 a 75% (dados não mostrados). O tecido observado foi caracterizado como aerênquima, com base nas análises histológicas.



Figura 32. Exemplo do sistema radicular de uma planta de soja da cultivar IAC-23 com valores entre 50 e 75% de aerênquima. As setas indicam o tecido esponjoso considerado como aerênquima.

5. DISCUSSÃO

5.1. Utilização do nitrato por plantas de soja durante o alagamento do sistema radicular.

Inicialmente, estudou-se o efeito da hipoxia em plantas não noduladas. Não houve diferença no consumo de nitrato da solução do vaso, que foi de 80% tanto em normoxia quanto em hipoxia. Esperava-se encontrar um consumo de nitrato um pouco maior nas plantas em hipoxia, assim como observado em soja por Brandão (2005), mas como o consumo está relacionado a condições abióticas, como, por exemplo, temperatura e luminosidade, e não dispúnhamos de controle destas condições na casa de vegetação, leves alterações abióticas podem explicar os resultados observados. De qualquer forma, pode-se concluir que o consumo de nitrato em hipoxia é da mesma ordem daquele em normoxia.

Os dados referentes aos produtos do metabolismo do nitrato deixam evidente que o metabolismo do nitrato em hipoxia é muito diferente do metabolismo em normoxia. Em primeiro lugar, apenas nas plantas em hipoxia e com nitrato foi encontrado o nitrito na solução do vaso. Em hipoxia a quantidade de nitrito acumulado no vaso foi em torno de 0,9 a 1,3 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, e a quantidade de nitrato consumido, em torno de 4,6 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ (ver Fig. 5). Esses resultados indicam que aproximadamente 29% do nitrato consumido acumulou na forma de nitrito. Em outro experimento (ver figuras 1 e 2) cálculo semelhante revelou que em torno de 40% do nitrato consumido do vaso acumulou no meio, na forma de nitrito. O acúmulo de nitrito já foi observado em outros estudos com hipoxia (Lee, 1978; Reggiani *et al.*, 1985; Botrel *et al.*, 1996). De acordo com Caunes (2002) a produção de nitrito ocorre

devido à ação de bactérias presentes no meio. No entanto, Morard *et al.* (2004) sugerem que a produção de nitrito seja devida ao metabolismo de nitrato das raízes das plantas, uma vez que ocorre sua produção mesmo em solução nutritiva estéril com raízes *in vitro*, ou seja, sem a presença de bactérias do meio. Brandão (2005) utilizando o antibiótico cloranfenicol, verificou menor conteúdo de nitrito na solução do vaso quando este composto estava presente e as plantas de soja estavam em hipoxia. Entretanto, o antibiótico não inibiu por completo a produção de nitrito, sugerindo que a sua produção pode envolver dois processos, um por ação bacteriana e outro resultante do metabolismo do nitrato nas raízes. Provavelmente, a eliminação do nitrito da raiz e do nódulo para o meio ocorra devido à toxicidade do nitrito para as plantas (Glaab & Kaiser, 1993). O fato de boa parte do nitrito formado não ser reduzida à amônia e depois assimilada é coerente, tendo em vista a necessidade de oxigênio para a redução do nitrito (Lee, 1978; 1979).

Na planta, os compostos do metabolismo de nitrogênio também foram bastante alterados em condições de hipoxia, consistente com caminhos de metabolismo distintos do nitrato sob normoxia e hipoxia. Em hipoxia, o conteúdo de nitrato reduziu nas plantas e o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou apenas nas raízes e na seiva do xilema, assim como verificado por Barta (1987) em *Medicago sativa* L. e em *Lotus corniculatus*, por Sousa & Sodek (2002) e Brandão (2005) em soja. A diminuição do nitrato endógeno nas raízes durante a hipoxia foi quase total. A mobilização do nitrato endógeno das raízes é um processo associado à deficiência de N, como pode ser visto na Fig. 7, com as plantas transferidas do meio contendo nitrato para um meio livre de N mineral (tratamento -N+ar). Portanto, com relação ao nitrato endógeno das raízes, a planta em hipoxia com nitrato

presente respondeu como uma planta em deficiência de N, ou seja, com a assimilação do nitrato bastante prejudicada pela falta de substrato. Mobilização do nitrato endógeno sob hipoxia pode explicar o menor teor de N total nas raízes de plantas submetidas a 2 dias de hipoxia em relação à normoxia (Fig. 20).

Se houve diminuição do nitrato endógeno das raízes sob hipoxia o teor de aminoácidos livres mostrou o contrário, talvez devido à degradação de proteínas. Este aumento dos aminoácidos é mais complexo para interpretar. Além dos aminoácidos serem produtos da assimilação do nitrato, outra fonte importante é o transporte da parte aérea via floema, componente da chamada reciclagem de aminoácidos pela planta (Pate *et al.*, 1981). De fato, queda no teor de aminoácidos nas folhas de plantas sob hipoxia, embora mais discreta nas plantas noduladas, pode evidenciar uma mobilização de nitrogênio da parte aérea para as raízes. Porém, o fato do teor de aminoácidos nas raízes sob hipoxia ser maior na presença do nitrato do que na ausência pode indicar que alguma assimilação de nitrato de fato ocorreu sob hipoxia. Outra evidência para alguma forma de absorção e metabolismo do nitrato na planta sob hipoxia é um discreto, mas significativo aumento no transporte de nitrato e aminoácidos no xilema, fenômeno este também observado por Brandão (2005).

Uma preocupação com relação aos experimentos iniciais conduzidos neste estudo foi com a possibilidade de que parte do nitrato consumido sob hipoxia pudesse ter acontecido nas primeiras horas do experimento quando a hipoxia estava sendo induzida. Depois que a aeração do sistema hidropônico é suspensa e a superfície coberta com óleo mineral, a respiração do sistema radicular continua na sua taxa normal durante várias horas até que o nível de oxigênio seja insuficiente

para suportar a mesma taxa de respiração (Sousa & Sodek, 2003). É só neste momento que o sistema entra em hipoxia. Para contornar este problema foi conduzido um experimento (Expto. II) no qual a planta foi transferida para uma solução livre de N mineral um dia antes de induzir a hipoxia. O nitrato foi adicionado no dia seguinte, usando uma solução concentrada de nitrato, introduzida por baixo da camada de óleo mineral. Neste experimento, houve a mesma resposta com a presença do nitrato observada no experimento anterior, ou seja, grande consumo do nitrato, acúmulo de nitrito no meio, queda menor no teor de nitrato das raízes, e aumento no teor de aminoácidos nas raízes e no xilema. Este tratamento também promoveu maior conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes e menor nas folhas das plantas não noduladas, em relação aos demais tratamentos em hipoxia, inclusive com nitrato. Não foi verificada nenhuma influência no transporte do nitrato pelo xilema.

Nos experimentos realizados inicialmente utilizou-se plantas não noduladas, no entanto, a presença de nitrato endógeno não permitiu inferir se o metabolismo observado é resultado do nitrato endógeno, do nitrato adicionado no meio ou de ambos, uma vez que as plantas não noduladas são nutridas com nitrato durante todo o seu desenvolvimento. Para verificar o real efeito do nitrato adicionado foi realizado o experimento com plantas noduladas, cultivadas na ausência de nitrato no meio e livres de nitrato endógeno. No experimento com as plantas noduladas foi possível verificar a mesma queda brusca de nitrato na solução do vaso sob hipoxia conforme observado para as não noduladas. As análises para nitrato e os produtos do seu metabolismo revelaram um quadro semelhante ao observado com as plantas não noduladas, e algumas questões ficaram mais evidentes. Ocorreu acúmulo de nitrato

nas raízes de plantas noduladas sob hipoxia, embora em quantidade aproximadamente cem vezes menor que a encontrada numa planta nodulada cultivada com nitrato em normoxia (cf. Fig. 11A e 7A). Portanto, é irrefutável a evidência de que o nitrato, embora em quantidades bastante reduzidas, é absorvido pelas raízes sob hipoxia. Um fato que corrobora com isso é que a adição de nitrato um dia depois que o sistema experimental entrou em hipoxia, anulou a possibilidade de que a absorção do nitrato pudesse ter ocorrido durante na fase inicial do tratamento, quando o sistema ainda não havia atingido a hipoxia. O aumento de nitrato na seiva do xilema durante a hipoxia também reforça esta evidência, pois no caso das plantas noduladas o nitrato absorvido do meio é a única fonte de nitrato disponível para transporte no xilema. Também com as plantas noduladas foi observado o efeito positivo do nitrato no meio. Nestas plantas o teor de aminoácidos aumentou nas raízes sob hipoxia, bem como na seiva do xilema, o que demonstra que o fenômeno é resultado direto do nitrato absorvido e não uma consequência da mobilização do nitrato endógeno da raiz.

É importante salientar que a adição de nitrato acarreta a inativação dos nódulos, fazendo com que as plantas utilizem o nitrato disponível em detrimento ao gasto de energia para fixar o nitrogênio atmosférico via bactérias, conforme já descrito na literatura (Amarante & Sodek, 2006). No caso dos tratamentos envolvendo alagamento do sistema radicular (hipoxia), independente da presença ou não do nitrato, a falta de oxigênio também leva à inativação dos nódulos quase que imediatamente (Amarante & Sodek, 2006). Consequentemente, as plantas noduladas só podem assimilar o nitrogênio via assimilação do nitrato. Os dados demonstram que isto de fato ocorre, porém em escala bastante reduzida.

Houve forte influência da hipoxia na composição de aminoácidos, principalmente nas raízes e na seiva do xilema, com alterações significativas na presença do nitrato. Conforme observado em trabalhos anteriores (Puiatti & Sodek, 1999; Sousa & Sodek, 2003) a hipoxia leva à formação de grandes quantidades de alanina na raiz e na seiva do xilema. Por outro lado, nos nódulos e nas folhas os nossos dados mostram alterações de alanina bastante discretas ou nulas. Alanina é formada na raiz sob hipoxia a partir de piruvato, como uma reação alternativa à fermentação alcoólica (Ricard *et al.*, 1994) e a produção intensa de alanina nestas condições transborda para o transporte à parte aérea via xilema (Sousa & Sodek, 2003). A presença do nitrato fez aumentar ainda mais a produção de alanina e, portanto, pode significar a assimilação do nitrato para este servir como fonte de nitrogênio neste processo. O fato deste aumento em alanina ser também bastante evidente na ausência do nitrato significa que a síntese de alanina não depende apenas da assimilação do nitrato para fornecer nitrogênio e devem existir outras fontes. Isto ficou bastante claro no experimento com plantas noduladas onde não havia nem o nitrato endógeno presente na raiz para servir como possível fonte, e mesmo assim, houve o característico aumento em alanina. Entretanto, o fato do nitrato elevar ainda mais o teor de alanina, tanto nas raízes como no xilema, e tanto em plantas noduladas como não noduladas, indica que o nitrato está sendo metabolizado sob hipoxia e assim fornecendo nitrogênio para este processo. Esta hipótese foi confirmada pelos dados obtidos com o nitrato marcado com ^{15}N , discutidos mais adiante.

Rocha *et al.* (2010), ao estudarem uma espécie tolerante ao alagamento (*Lotus japonicus*), sugerem que em condições de hipoxia há estímulo para a síntese de Ala e acúmulo de succinato que gera produção extra de ATP.

A elevação de alanina na composição de aminoácidos das raízes e da seiva sempre vem acompanhada por um decréscimo do ácido aspártico e/ou asparagina. Foi sugerido que o ácido aspártico (um produto metabólico da asparagina) é um precursor importante na síntese de alanina sob hipoxia, como fornecedor do nitrogênio da alanina via reações de transaminação (Sousa & Sodek, 2002a). Quando o nitrato é a fonte de nitrogênio neste processo, o caminho metabólico mais provável é a redução e assimilação do nitrato em glutamina e glutamato via o ciclo GS/GOGAT (Buchanan *et al.*, 2001) seguido por transaminação entre glutamato e piruvato para formar alanina (Sousa & Sodek, 2002a). Esta alteração na composição também foi vista em plantas de soja por Puiatti & Sodek (1999), Sousa & Sodek (2002) e Thomas (2004).

Na ausência de nitrogênio em plantas de soja, Lima & Sodek (2003) observaram redução da Asn e aumento de Asp, assim como verificado nas plantas não noduladas e noduladas. Segundo estes autores, a biossíntese de Asn é regulada pelo “status” de N e C na planta ou pela razão C:N, de forma que quando esta razão é alta (falta de N) diminui a síntese da Asparagina sintetase responsável pela síntese de Asn, resultando em menor conversão de Asp em Asn, sendo que parte do Asp vem via floema.

A hipoxia causou o maior conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes e nos nódulos. Com adição de nitrato houve maior conteúdo de proteína nas folhas. Nos nódulos, não houve diferença no conteúdo de proteínas solúveis totais entre os

tratamentos com nitrato. Horchani & Aschi-Smiti (2010) observaram, em plantas de tomate sob hipoxia, redução no conteúdo de proteínas nas raízes devido à sua alta degradação.

A adição de nitrato promoveu maior conteúdo de ureídeos nas raízes e nas folhas e não houve diferença nos nódulos e na seiva do xilema. Dordas (2009) acredita que o nódulo tem influência na tolerância das plantas à hipoxia e sugere uma rota com atuação das hemoglobinas não simbióticas presente no nódulo em plantas de soja que aumenta a tolerância por redução do nitrato e acúmulo de óxido nítrico (NO).

O metabolismo do nitrato inicia-se pelo passo catalizado pela enzima redutase de nitrato. Embora os dados discutidos até agora indiquem que o processo de assimilação do nitrato seja bastante reduzido, as atividades mais altas da redutase do nitrato encontradas aqui em raízes sob hipoxia indicam que a redução do nitrato não é o passo limitante. Por outro lado, em estudo anterior, Brandão (2005) encontrou uma queda na atividade de redutase do nitrato em raízes de soja submetidas à hipoxia. O motivo dessa discrepância é desconhecido. Porém, todos os trabalhos na literatura sobre redutase do nitrato e hipoxia mostram um aumento da atividade dessa enzima sob hipoxia, incluindo os de plantas de ervilha (Glaab & Kaiser, 1993), de cevada (Botrel & Kaiser, 1997) e de tomate (Allégre *et al.*, 2004). O acúmulo de quantidades elevadas de nitrito, produto da redução do nitrato catalisada pela enzima redutase do nitrato, indica que a baixa atividade dessa enzima não pode ser responsável pela baixa assimilação de nitrato sob hipoxia. É conhecido que o oxigênio é necessário para a redução do nitrito (Lee, 1978;1979), o que pode explicar o impedimento da assimilação do nitrato sem restrição à formação do nitrito. Fica,

portanto, a dúvida quanto à função metabólica deste aumento de RN durante a hipoxia. Possivelmente, durante a hipoxia a redução de nitrato possa funcionar como um dreno alternativo para elétrons, assim substituindo a transformação de piruvato em etanol (fermentação) neste papel. Tal hipótese ganhou destaque na literatura, pois poderia explicar o efeito benéfico do nitrato na tolerância de plantas à hipoxia. Entretanto, os dados na literatura trouxeram pouco apoio para a hipótese de que este processo possa funcionar como um dreno alternativo para elétrons, exceto para plantas de arroz. Nestas plantas, o nitrato reduziu a produção de etanol (Fan *et al.*, 1997), exatamente como esperado pela hipótese. Entretanto, em raízes destacadas de plantas de cevada (Lee, 1978) e de milho (Reggiani *et al.*, 1985) mais etanol foi produzido em condições de anoxia na presença do nitrato. Portanto ainda existe controvérsia a respeito desta hipótese para o papel do aumento de RN em hipoxia, principalmente porque plantas de arroz são consideradas um caso à parte, por serem totalmente adaptadas a condições de hipoxia (Reggiani *et al.*, 1993a).

Uma nova e promissora linha de investigação envolve uma reação secundária da RN que leva à produção de NO a partir do nitrito (Kaiser *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2002). É aparentemente contraditório que o aumento da RN sob anoxia seja acompanhado por uma diminuição na taxa de redução do nitrato, o que coloca em dúvida o papel fisiológico do aumento de atividade nessas condições (Kaiser & Huber, 2001). Tendo em vista a maior diminuição da redução do nitrito comparada com a do nitrato, o nitrito acumula favorecendo a produção de NO (Rockel *et al.*, 2002). O NO tem despertado grande interesse em função do seu possível papel em diversos processos fisiológicos como a interação planta-patógeno e outras situações de estresse como a anoxia (Magalhães *et al.*, 2002). Entretanto, o quanto a RN

contribui para a produção de NO para sinalizar uma condição de estresse não é conhecido (Kaiser & Huber, 2001).

Outras evidências claras de que o nitrato é absorvido pela raiz sob condições de hipoxia podem ser encontradas nos dados obtidos com $^{15}\text{NO}_3^-$. O fato do ^{15}N ter sido encontrado em todas as partes da planta (raízes, folhas, nódulos) demonstra que o nitrato do meio é absorvido pela planta em condições de hipoxia e, como esperado, em normoxia também. O maior enriquecimento de N em normoxia, com raras exceções, indica que a absorção de nitrato do meio é bem mais lenta em condições de hipoxia. Portanto, a hipoxia prejudica o processo, mas não o anula. Outro ponto interessante é o fato de que o ^{15}N foi encontrado tanto nas folhas como nas raízes, o que indica que o transporte do nitrato absorvido da raiz para a parte aérea também ocorre em hipoxia. Como é de se esperar, o grau de enriquecimento nas raízes, o ponto de entrada do mineral, foi maior do que nas folhas. Nas plantas noduladas os nódulos também foram enriquecidos, porém em grau bem menor do que as raízes ou as folhas, tanto em normoxia como hipoxia. Isto está de acordo com outros estudos que mostram uma capacidade bastante limitada dos nódulos em absorver e metabolizar o nitrato (Sprent *et al.*, 1987).

O ^{15}N do nitrato incorporado com grande eficiência nos aminoácidos demonstra claramente que o nitrato não foi apenas absorvido pelas raízes, mas também metabolizado em condições de hipoxia. Mostra ainda que sob hipoxia pelo menos uma parte do nitrato seguiu o metabolismo normalmente encontrado nas plantas em normoxia, ou seja, assimilação em aminoácidos. O enriquecimento dos aminoácidos foi de modo geral maior que o enriquecimento do N total, tanto em normoxia como hipoxia. Isto pode ser explicado, pois de todos os metabólitos de N,

os aminoácidos estão mais próximos do metabolismo do nitrato e assim receberão o ^{15}N primeiro. De fato, os produtos imediatos da assimilação do nitrato foram os mais enriquecidos, como Asp, Glu e Ala, Asn e Gln também, embora não tenham sido encontrados em quantidades suficientes para análise de ^{15}N em todas as amostras. É interessante notar que nas raízes das plantas em normoxia e hipoxia os citados aminoácidos foram enriquecidos em grau semelhante. Talvez os aminoácidos cujas sínteses aumentam em condições de hipoxia, Ala e Ser, tenham sido enriquecidos mais sob hipoxia em comparação com o Asp e o Glu, precursores da síntese de Ala. Tais dados estão compatíveis com a conclusão tirada acima de que a absorção do nitrato em hipoxia é bem mais lenta do que em normoxia. Possivelmente, a duração do experimento tenha sido longa o suficiente para que a absorção do nitrato em hipoxia entrasse em equilíbrio com a sua assimilação em aminoácidos. Para comprovar isto, seria necessário realizar experimentos de cinética de absorção, com menores períodos de incubação com o isótopo. No caso das folhas, o grau de enriquecimento dos aminoácidos foi menor em hipoxia. De qualquer forma, estes dados permitem outra conclusão importante, pois o elevado grau de enriquecimento de aminoácidos, produtos da assimilação de nitrato, indica claramente que o processo de assimilação de nitrato de fato ocorre sob hipoxia.

O único estudo encontrado na literatura envolvendo a utilização de $^{15}\text{NO}_3$ em condições de hipoxia foi realizado pelo grupo de Reggiani (Reggiani *et al.*, 1995; Reggiani *et al.*, 1997) com plântulas de arroz. Resultados obtidos por estes autores demonstram incorporação de ^{15}N em alguns aminoácidos, incluindo Ala e Glu. Reggiani *et al.* (1997) concluíram que não existe nenhum bloqueio no caminho de assimilação de nitrato sob hipoxia. Embora os nossos dados com plantas de soja

também demonstrem o funcionamento do caminho de assimilação do nitrato durante a hipoxia, a nossa conclusão foi de que este processo está bastante limitado nessas condições. Entretanto, em termos de estudos sobre a hipoxia ou anoxia, as plantas de arroz são consideradas um caso à parte (Reggiani *et al.*, 1993), pois essa é uma espécie que tem capacidade de germinar em ambientes anaeróbicos, sendo plenamente adaptada a condições de anoxia. A plena adaptação desta espécie ao alagamento permite que a assimilação de nitrato seja aumentada em anoxia (Reggiani *et al.*, 1993; 1993a; Kemp & Small, 1993), uma situação evidentemente diferente daquela encontrada para as plantas de soja.

5.2. Efeito do nitrato no desenvolvimento e na morfoanatomia de cinco cultivares de soja durante o alagamento prolongado do sistema radicular.

Para comparação do comportamento de cinco cultivares produzidas no estado de São Paulo, quanto à sua tolerância ao alagamento e aos efeitos do nitrato sobre o desenvolvimento das mesmas, foram avaliados cinco parâmetros de desenvolvimento em que plantas estavam com o sistema radicular alagado durante 28 dias.

Após o alagamento prolongado (28 dias) observou-se em todas as cultivares o desenvolvimento da planta bem superior na presença de nitrato que em sua ausência.

Não houve variação na área foliar e na MSPA em cada uma das cultivares IAC-23, IAC-17 e IAC-18 com nitrato, durante os 28 dias de experimento. Esses dados indicam que o tratamento de adição de nitrato permitiu que a plantas se recuperassem, e atingissem o mesmo crescimento da parte aérea que as plantas

que tinham nitrato disponível desde o início, uma vez que independente do tratamento imposto não houve variação nestes parâmetros. Dados diferentes foram obtidos para as outras cultivares. A cultivar IAC Foscarin-31, teve maior crescimento em plantas com nitrato adicionado, enquanto as plantas da cultivar IAC-24 não conseguiram suprir o período de ausência do nitrato, apresentando menor crescimento nas plantas submetidas ao tratamento com adição de nitrato. O aumento da massa seca da parte aérea com a adição de nitrato condiz com o observado nas plantas de soja da cultivar FT- Abyara, quando estas foram alagadas durante 72 horas (Sa, 2005). O aumento na área foliar também foi verificado por Mello Júnior (1992) em plantas de trigo supridas por duas fontes de nitrogênio quando o solo foi alagado.

O incremento da área foliar com a adição de nitrato provavelmente está relacionado ao retardamento da senescência foliar, e este pode ser atribuído ao teor de clorofila das folhas submetidas à inundação. De acordo com Sa (2005), plantas de soja da cultivar FT- Abyara que receberam nitrato, quando comparadas com as que não o receberam durante o alagamento do sistema radicular, apresentaram coloração das folhas mais intensa, coloração esta que, segundo Meurer *et al.* (1981) deve-se ao suprimento adequado de nitrogênio durante o crescimento vegetativo. Esta coloração também foi observada neste experimento (dados não mostrados).

Altos valores de massa seca da parte aérea quando as plantas foram alagadas com nitrato também foram observados em plantas de feijão da cultivar IAPAR-31 quando alagadas com solução de Hoagland durante seis dias (Nascimento *et al.*, 2004).

O aumento do diâmetro do caule reflete a hipertrofia do caule e indica o quanto a planta alagada sofreu alterações anatômicas e morfológicas para suportar este estresse, sendo desta forma, um dos principais indicadores de alagamento do sistema radicular de acordo com Pires *et al.* (2002). A cultivar IAC-23 apresentou o caule de maior diâmetro, quando o nitrato foi adicionado, já nas cultivares IAC-18, IAC-17 e IAC Foscarin-31 não houve diferença entre os tratamentos com nitrato. No entanto, na cultivar IAC-24 com a adição de nitrato ocorreu redução no diâmetro do caule.

A planta durante o seu desenvolvimento compartilha energia entre a parte aérea e o sistema radicular, e esta partição pode ser determinada de acordo com a disponibilidade de nutrientes, como a de nitrogênio. Em condições de alagamento, e conseqüentemente, hipoxia, a partição de energia é alterada, sendo comum encontrar artigos que citam que, na ausência de N o sistema radicular tende a se expandir como forma de buscar o nutriente a maiores profundidades para explorar maior volume de solo. No entanto, para algumas espécies não é o que ocorre. Em algumas forrageiras, tais como, capim-tanzânia, capim-massai e capim-xaraés o nitrogênio não é translocado para ao sistema radicular prioritariamente, mas para a deposição de massa seca da parte aérea, e desta forma a parte aérea funciona com dreno mais evidente do que a raiz (Santos *et al.*, 2006; Martuscello *et al.*, 2009).

O volume do sistema radicular é o espaço que as raízes ocupam e o seu aumento ou redução pode estar relacionado com as modificações morfológicas no sistema radicular, como formação de aerênquima, formação de raízes adventícias e estas informações podem ser relacionadas às medidas da MSSR nas mesmas condições.

Análises do volume do sistema radicular apresentaram para a cultivar IAC Foscarin-31 maiores valores quando houve adição de nitrato. Não houve diferença entre os tratamentos com nitrato para as cultivares IAC-23, IAC-18 e IAC-17. O menor valor para o VSR foi obtido pela cultivar IAC-24 quando o nitrato foi adicionado. Estas observações foram muito semelhantes ao observado na massa seca do sistema radicular, exceto para a cultivar IAC-23, que apresentou maiores valores quando houve adição de nitrato. As cultivares IAC-18 e IAC-17 conseguiram suprir o período de ausência do nitrato apresentando crescimento semelhante ao das plantas cultivadas com nitrato, ao contrário da cultivar IAC-24.

As plantas são capazes de perceber o teor de N tanto interna como externamente, e modificar seu metabolismo (Sakakibara, 2006). Algumas das respostas ao N são locais, restritas apenas às raízes diretamente expostas ao sinal nutricional, enquanto outras são sistêmicas, implicando em intrincadas rotas de percepção e sinalização de N (Forde, 2002).

Estudos com magnoliopsidas caracterizaram quatro adaptações morfológicas relacionadas à disponibilidade de N, sendo elas: efeito estimulatório local do N sobre o alongamento de raízes laterais; o efeito sistêmico inibitório de altas concentrações de N sobre a ativação de meristemas laterais de raiz; a supressão da iniciação de raízes laterais por alta razão C:N da planta e a inibição do crescimento da raiz primária e estímulo à produção de raízes laterais por teores externos de L-glutamato (L-Glu) (Zhang *et al.*, 2007)

Silva e Delatorre (2009) observaram que o íon nitrato atua diretamente no aumento em número e comprimento de raízes laterais e pêlos radiculares, quando a raiz que está sob limitação encontra regiões do solo ricas em N, fato este

comprovado por Zhang & Forde (2000) que estudando mutantes deficientes na enzima RN obtiveram este mesmo resultado. Estes mesmos autores propuseram que o transportador de nitrato de dupla afinidade NRT1.1 é o responsável pela sinalização inicial da presença de nitrogênio no ápice da raiz.

Respostas opostas ao mesmo nutriente indicam que as plantas adaptam-se à disponibilidade do nutriente em um ambiente em constante mudança. A inibição do desenvolvimento é reversível e induzida pelo teor de nitrato nos tecidos (Zhang *et al.*, 1999). Essa seria uma regulação à distância, buscando estimular a partição de recursos entre a parte aérea e o sistema radicular, uma vez que N suficiente seria obtido via fluxo de massa.

Há evidências de que a sinalização de N em longa distância se dê principalmente via citocininas (síntese no meristema apical de raízes), pois ocorre alta correlação entre conteúdo de citocininas e disponibilidade de N em diversas espécies (Wagner & Beck, 1993; Takei *et al.*, 2001). Recentemente, o ácido giberélico (GA) foi associado às mudanças de partição devido à relação C:N da planta. O GA interagiria com as rotas respiratórias e a taxa amino/nitrato para regular a partição de biomassa entre raiz e parte aérea (Pellny *et al.*, 2008). É possível que mais de um sistema de sinalização seja utilizado, considerando as diversas respostas à disponibilidade de N e a interação deste com o carbono.

Algumas plantas não apresentam grandes variações no comprimento da raiz principal sob deficiência de N e sim alterações na densidade de raízes laterais, as quais variam com a espécie em estudo (Zhang *et al.*, 1999; Zhang & Forde, 2000; Linkohr *et al.*, 2002). Por outro lado, há grande variação no comprimento das raízes laterais. Zhang & Forde (2000) observaram aumento de 300% no crescimento das

raízes laterais de *arabidopsis* quando reduziram a concentração de NO_3^- de 1 para $0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$. O aumento do alongamento e do número de raízes laterais e da densidade de pêlos radiculares sob deficiência de N podem incrementar significativamente a massa seca de raízes, como observado por Anandacoomaraswamy *et al.* (2002) em plantas de chá (*Camellia sinenses*) e por Horchani & Aschi-Smiti (2010) em plantas de tomate alagadas por três semanas.

Os resultados obtidos indicam que o nitrato é nutriente importante para o desenvolvimento de plantas de soja não noduladas, e que em sua ausência sob condições de alagamento as plantas apresentam reduzido crescimento. Já, a presença do nitrato permite que a planta se desenvolva em condições de alagamento. A priorização do desenvolvimento ou da parte aérea ou do sistema radicular, ou a não priorização varia entre as cultivares, inclusive em intensidade e, parece ter relação com o estresse por hipoxia.

Observou-se que as cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-24 não priorizam nenhuma parte específica sob condições de alagamento, apresentando crescimento maior das plantas como um todo quando receberam adição de nitrato. As plantas da cultivar IAC-23 não priorizaram crescimento da parte aérea, e apresentaram consideráveis modificações morfológicas nas raízes que foram comprovadas pela baixa MSSR, principalmente com alagamento com nitrato. Uma expressiva priorização da parte aérea foi encontrada na cultivar IAC-17, uma vez que o grande volume do sistema radicular observado para essa cultivar foi convertido em aerênquima e raízes adventícias, não se traduzindo em MSSR. A cultivar IAC-18, independentemente do tratamento, manteve os mesmos valores de VSR e de MSSR

e apresentou variação apenas nos parâmetros de parte aérea conforme os tratamentos impostos.

De acordo com Sairam *et al.* (2008), ocorre formação de raízes adventícias em plantas alagadas devido à produção de etileno que fica acumulado no solo alagado e estimula a formação de raízes. Além disso, o etileno está intimamente relacionado com a formação de aerênquima (Visser *et al.*, 1997), o que foi comprovado em estudos com inibidores de etileno, nos quais não houve a formação de aerênquima (Drew *et al.*, 1981).

Bragina *et al.* (2003) estudando plântulas de milho em hipoxia verificaram acelerada produção de etileno e ativação das enzimas que destruíram as paredes das células nas raízes adventícias e mudaram o padrão de crescimento, sendo esta uma importante resposta adaptativa à hipoxia.

Thomas *et al.* (2005) observaram a formação de aerênquima, inicialmente no córtex, e posteriormente substituído por aerênquima secundário, derivado de células parenquimáticas e possivelmente do periciclo. Neste experimento só foi observada a formação do aerênquima secundário a partir também de células parenquimáticas e do periciclo.

O aerênquima é um tecido com amplo espaço intercelular que permite a baixa resistência interna para a troca de gases entre o caule aeróbico e a raiz anaeróbica (Sairam *et al.*, 2008). O aumento do VSR nas cultivares de soja pode ajudar a explicar o desenvolvimento bem maior e mais rápido na presença de nitrato da planta.

6. CONCLUSÕES

Os dados permitiram concluir que em condições de hipoxia, embora em quantidades bastante reduzidas e num processo mais lento, o nitrato é absorvido pela raiz, sendo, parte, convertido a aminoácidos e menos de 40% convertida a nitrito o qual é eliminado para o meio. A redução do nitrato, via RN, passo inicial de sua metabolização, não é um passo limitante, uma vez que há produção de nitrito, produto da atividade da enzima.

A adição de nitrato na solução do vaso de cinco cultivares de soja demonstrou diferentes priorizações para suprir a ausência de nitrogênio e manter o desenvolvimento das plantas em condições de alagamento. As cultivares IAC Foscarin-31 e IAC-24 apresentaram crescimento geral da planta, sendo maior o crescimento observado na cultivar IAC Foscarin-31. A cultivar IAC-23 priorizou o crescimento do sistema radicular e a cultivar IAC-17 o crescimento da parte aérea, assim como a IAC-18. A adição de nitrato também promoveu maior formação de aerênquima no caule, raiz principal e adventícia, além de grande quantidade de raízes adventícias, o que pode explicar a melhor tolerância ao estresse de alagamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allègre, A., Silvestre, J., Morard, P., Kallerhoff, J. & Pinelli, E. 2004. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. *Journal of Experimental Botany*. 55:2625-2634.
- Amarante, L. & Sodek, L. 2006. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. *Biologia Plantarum*. 50(3):405-410.
- Anandacoomaraswamy, A., De Costa, W.A.J.M., Tennakoon, P.L.K. & van der Werf, A. 2002. The physiological basis of increased biomass partitioning to roots upon nitrogen deprivation in young clonal tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz). *Plant and Soil*. 238(1):1-9.
- Appenroth, K.J., Mecxo, R., Jourdan, V. & Lillo, C. 2000. Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Science*. 159:51-56.
- Armstrong, W., Brandle, R. & Jackson, M.B. 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*. 43:307-358.
- Aslam, M., Oaks, A. & Huffaker, R.C. 1976. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiology*. 58:588-591.
- Aslam, M., Travis, R.L. & Rains, D.W. 2001. Enhancement of nitrate reductase activity and metabolic nitrate concentration by methionine sulfoximine in barley roots. *Plant Science*. 161:133-142.
- Bailey-Serres, J. & Voesenek, L.A.C.J. 2008. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*. 59:313-339.

- Barrie, A. & Prosser, S.J. 1996. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: T. W. Boutto and S. Yamasaki, Eds. Mass Spectrometry of Soils, pp. 01-46.
- Barta, A.L. 1987. Supply and partitioning of assimilates to roots of *Medicago sativa* L. and *Lotus corniculatus* L. under anoxia. Plant Cell and Environment. 10:151-156.
- Benson, J.R. & Hare, P.E. 1975. Ortho-phthalaldehyde-fluorogenic detection of primary amines in picomole range - Comparison with fluorescamine and ninhydrin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 72(2):619-622.
- Bielecki, R.L. & Turner, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. Analytical Biochemistry. 17:278-293.
- Botrel, A., Magné, C. & Kaiser, W.M. 1996. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. Plant Physiology and Biochemistry. 34:645-652.
- Botrel, A. & Kaiser, W.M. 1997. Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. Planta. 201:496-501.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.
- Bragina, T.V., Rodionova, N.A. & Grinjeva, G.M. 2003. Ethylene production and activation of hydrolytic enzymes during acclimation of maize seedlings to partial flooding. Journal Plant Physiology. 50:794-798.

- Brandão, A.D. 2005. Papel da redutase do nitrato em soja [*Glycine max* (L.) Merr. cv IAC-17] sob condições de hipóxia do sistema radicular. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, tese de Mestrado.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. 2001. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 3 ed. American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA. 1367p.
- Campbell, W.H. 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. Cellular and Molecular Life Sciences. 58:194-204.
- Caumes, E. 2002. Contribution a l'étude des mécanismes d'adaptation de la tomate a l'asphyxie racinaire. Thesis INP Toulouse fr. 110p.
- 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. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 6:71-80.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2010. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2010/ Companhia Nacional de abastecimento. - Brasília: Conab.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2011. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2011/ Companhia Nacional de abastecimento. - Brasília: Conab.
- Chung, H.L., Sehnke, P.C. & Ferl, R.J. 1999. The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. Plant Science. 4:367-371.
- De la Haba, P., Aguera, E., Benítez, L. & Maldonado, J.M. 2001. Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. Plant Science. 161:231-237.

- Dell'amico, J., Torrecillas, A., Rodrigues, P., Morales, D. & Sanche-Blanco, M.J. 2001. Differences in the effects of flooding the soil early and late in the photoperiod on the water relations of grown tomato plants. *Plant Science*. 160(3):481-487.
- Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G. & Peacock, W.J. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*. 51(342):89-97.
- Dobereiner, J. 1985. *Biotecnologia em São Paulo: Recomendações para uma política*. Imprensa Oficial do Estado, São Paulo, pp.75-80.
- Dobereiner, J. 1989. *Ciência, tecnologia e desenvolvimento nacional*. *Ciência e Cultura*. 41:213-228.
- Dordas, C. 2009. Nonsymbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. *Plant Science*. 176:433-440.
- Drew, M.C., Jackson, M.B., Gifford, S.C. & Campbell, I.R. 1981. Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of *Zea mays* L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency. *Planta*. 153:217-224.
- Fan, T.W-M., Higashi, R.M., Frenkiel, T.A. & Lane, A.N. 1997. Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. *Journal of Experimental Botany*. 48:1655-1666.
- Feder, N. & O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany*. 55(1):123-142.
- Ferrari, T.E., Yoder, O.C. & Filner, P. 1973. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. *Plant Physiology*. 51:423-431.

- Forde, B.G. 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology*. 53:203-224.
- Garcia-Novo, F. & Crawford, R.M.M. 1973. Soil aeration, nitrate reduction and flooding tolerance in higher plants. *New Phytologist*. 72:1031-1039.
- Glaab, J. & Kaiser, W.M. 1993. Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots. *Planta*. 191:173-179.
- Godber, I.M. & Parsons, R. 1998. Translocation of amino acids from stem nodules of *Sesbania rostrata* demonstrated by GC-MS in planta ^{15}N isotope dilution. *Plant Cell Environment*. 21:1089-1099.
- Hageman, R.H. & Reed, A.J. 1980. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*. 69:270-280.
- Heller, R., Esnault, R. & Lance, C. 1998. *Physiologie végétale: nutrition*. 6^a ed., Paris: Dunod.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station*. 347:1-39.
- Horchani, F. & Aschi-Smiti, S. 2010. Prolonged root hypoxia effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato plants. *Plant Signal Behavior*. 1:5(12). [Epub ahead of print]
- Huber, S.C., Bachmann, M. & Huber, J.L. 1996. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. *Plants Science*. 1:432-438.
- Jarret, H.W., Cooksy, K.D., Ellis, B. & Anderson, J.M. 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of aminoacids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. *Analytical Biochemistry*. 153:189-198.

- Johansen, D. 1940. Plant Microtechnique, New York, McGraw-Hill.
- Kaiser, W.M. & Huber, S.C. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*. 52:1981-1989.
- Kaiser, W.M. Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C.B, Rockel, P., Sonoda, M. & Planchet, E. 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany*. 53:875-882.
- Kanamaru, K., Wang, R., Su, W. & Crawford, N.M. 1999. Ser-543 in the hinge-1 region of Arabidopsis: nitrate reductase is conditionally required for binding 14-3-3 proteins and in vitro inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. 274:4160-4165.
- Kemp, K. & Small, J.G.C. 1993. Nitrate and nitrate reductase in *Erythrina caffra* seeds: enhancement of induction by anoxia and possible role in germination. *Planta*. 189:298-300.
- Lea, U., Hoopen, F., Provan, F., Kaiser, W.M., Meyer, C. & Lillo, C. 2004. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta*. 219:59-65.
- Lee, R.B. 1978. Inorganic nitrogen metabolism in barley roots under poorly aerated conditions. *Journal of Experimental Botany*. 29:693-708.
- Lee, R.B. 1979. The release of nitrite from barley roots in response to metabolic inhibitors, uncoupling agents and anoxia. *Journal of Experimental Botany*. 30:119-133.
- Lima, J.D. & Sodek, L. 2003. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. *Plant Science*. 165:649-656.

- Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H. & Leyser, O. 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of arabidopsis. *Plant Journal*. 29(6):751-760.
- 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. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 8:11-17.
- Majerowicz, N., França, M.G.C., Peres, L.E.P., Médici, L.O. & Figueiredo, S.A. 2003. *Fisiologia Vegetal - Curso Prático, Âmbito Cultural Edições Ltda., Rio de Janeiro*.
- Malavolta, E. 1954. Studies on the nitrogenous nutrition of rice. *Plant Physiology*. 29:98-99.
- Martinoia, E., Heck, U. & Wiemken, A. 1981. Vacuoles as storage compartment for nitrate in barley leaves. *Nature*. 289:292-294.
- Martuscello, J.A., Faria, D.J.G., Cunha, D.N.F.V. & Fonseca, D.M. 2009. Adubação nitrogenada e partição de massa em plantas de *Brachiaria brizantha* cv. xaraés e *Panicum maximum x Panicum infestum* cv. massai. *Ciência e Agrotecnologia*. 33(3):663-667.
- Marur, C.J., Sodek, L. & Magalhães, A.C. 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 6(2):103-108.
- Mattana, M., Brambilla, I., Bertani, A. & Reggiani, R. 1996. Expression of nitrogen assimilating enzymes in germinating rice under anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry*. 34:653-657.
- McClure, P.R. & Israel, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology*. 64:411-416.

- Mello Júnior, A.V. 1992. Funções de resposta do trigo (*Triticulum aestivum* L.) à níveis de irrigação e de nitrogênio. Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, tese de Mestrado.
- Meurer, E.J., Wang, G.M. & Wang, S.R. 1981. Função dos nutrientes e sintomas de deficiências. In: A soja no Brasil (S. Miyasaka & J. C. Medina), cap.4, Campinas: ITAL, pp.156-167.
- Missão, M.R. 2006. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. Revista de Ciências Empresariais. 3(1):7-15.
- Morard, P., Silvestre, J., Lacoste, L., Caumes, E. & Lamaze, T. 2004. Nitrate uptake and nitrite release by tomato roots in response to anoxia. Journal of Plant Physiology. 161:855-865.
- Nascimento, R., Amarante, L. & Colares, D.S. 2004. Partição de biomassa entre parte aérea e raízes de plantas de feijão submetidas a alagamento. IN: XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro de Pós-Graduação da UFPel: Pelotas, Brasil, resumos.
- Norris, D.O. & Date, R.A. 1976. Legume bacteriology. In: Tropical Pastures Research; Principles and Methods (N. H. Shaw, W. W. Bryan, eds) Commonwealth Bureal of pastures and Field Crops, Bull. 51 Hurley, England, pp. 134 -174.
- Pate, J.S., Atkins, C.A., Herridge, D.F. & Layzell, D.B. 1981. Synthesis, storage, and utilization of amino compounds in white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant Physiology. 67:37-42.
- Pellny, T.K., Aken, O.V., Dutilleul, C., Wolff, T., Groten, K., Bor, M., De Paepe, R., Reyss, A., Breusegem, F.V., Noctor, G. & Foyer, C.H. 2008. Mitochondrial

- respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. *The Plant Journal*. 54:976-992.
- Pires, J.L.F., Soprano, E. & Cassol, B. 2002. Adaptações morfofisiológicas da soja em solo inundado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(1):41-50.
- Puiatti, M. & Sodek, L. 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*. 37:767-773.
- Reggiani, R., Brambilla, I. & Bertani, A. 1985. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots-II Fermentative activity and adenylate energy charge. *Journal of Experimental Botany*. 36:1698-1704.
- Reggiani, R., Mattana, M., Aurisano, N. & Bertani, A. 1993. Utilization of stored nitrate during the anaerobic germination of rice seeds. *Plant Cell Physiology*. 34:379-383.
- Reggiani, R., Mattana, M., Aurisano, N. & Bertani, A. 1993a. The rice coleoptile: an example of anaerobic nitrate assimilation. *Plant Physiology*. 89:640-643.
- Reggiani, R., Bertini, F. & Mattana, M. 1995. Incorporation of nitrate into amino acids during the anaerobic germination of rice. *Amino Acids*. 9:385-390.
- Reggiani, R., Bertini, F. & Mattana, M. 1997. Incorporation of nitrate nitrogen in rice seedlings transferred to anaerobic conditions. *Amino Acids*. 13:183-188.
- Ricard, B., Couée, I., Raymond, P., Saglio, P.H., Saint-Ges, V. & Pradet, A. 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiology Biochemistry*. 32:1-10.

- Ritchie, S., Hanway, J.J. & Thompson, H.E. 1982. How a soybean plant develops. Ames, Iowa State University of Science and Technology, Coop. Ext. Serv. 20p. (Special Report, 53) (José Tadashi Yorinori, Embrapa Soja, Londrina. 1996).
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R. & Van Dongen, J.T. 2010. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*. 152:1501-1513.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. & Kaiser, W.M. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*. 53:103-110.
- Sa, J.S. 2005. Influência do manejo do nível freático e doses de nitrogênio em culturas sob hipoxia do solo. Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil, tese de Doutorado.
- Sairam, R.K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P.S. & Srivastava, G.C. 2008. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biologia Plantarum*. 52(3):401-412.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57:431-449.
- Santos, P.M., Corsi, M., Pedreira, C.G.S. & LIMA, C.G. 2006. Tiller cohort development and digestibility in Tanzania guinea grass (*Panicum maximum* cv. Tanzania) under three levels of grazing intensity. *Tropical Grasslands*. 40(2):84-93.

- Silva, A.A. & Delatore, C.A. 2009. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 8(2):152-163.
- Silvester, W.P., Parsons, R. & Watt, P.W. 1996. Direct measurement of release and assimilation of ammonia in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis. *New Phytologist*. 132(4):617-625.
- Sousa, C.A.F. & Sodek, L. 2002. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 14:83-94.
- Sousa, C.A.F. & Sodek, L. 2002a. Metabolic changes in soybean plants in response to waterlogging in the presence of nitrate. *Physiology and Molecular Biology of Plant*. 8(1):97-104.
- Sousa, C.A.F. & Sodek, L. 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environmental and Experimental Botany*. 50(1):1-8.
- Sprent, J.I., Giannakis, C. & Wallace, W. 1987. Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. *Journal of Experimental Botany*. 38:1121-28.
- Streeter, G. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 7:1-23.
- Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M. & Sugiyama, T. 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology*. 42(1):85-93.

- Thomas, A.L. 2004. Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine Max*) com sistemas radiculares sob deficiência de O₂. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Thomas, A.L., Guerreiro, S.M.C. & Sodek, L. 2005. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. *Annals of Botany*. 96:1191-1198.
- Thomas, A.L. & Sodek, L. 2005. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17(3):291-297.
- Thomson, C.J. & Greenway, H. 1991. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. *Plant Physiology*. 96:1294-1301.
- Tournaire-Roux, C., Sufka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.T., Bligny, R. & Maurel, C. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxia stress through gating of aquaporins. *Nature*. 425:393-397.
- Visser, E.J.W., Nabben, R.H.M., Blom, C.W.P.M. & Voesenek, L.A.C.J. 1997. Elongation by primary lateral roots and adventitious roots during conditions of hypoxia and high ethylene concentration. *Plant Cell Environment*. 20:647-653.
- Vogels, G.D. & van der Drift, C. 1970. Differential analysis of glyoxilato derivatives. *Analytical Biochemistry*. 33:143-157.
- Wagner, B.M. & Beck, E. 1993. Cytokinins in the perennial herb *Urtica-dioica* L. as influenced by its nitrogen status. *Planta*. 190(4):511-518.
- Weiner, H. & Kaiser, W.M. 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Letters*. 455:75-78.

- Weiner, H. & Kaiser, W.M. 2000. Binding to 14-3-3 protein is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Letters*. 480:217-220.
- Weiner, H. & Kaiser, W.M. 2001. Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine-543 and its binding to 14-3-3 proteins. *Journal of Experimental Botany*. 52(359):1165-1172.
- Woo, K.L. & Lee, D.S. 1995. Capillary gas chromatographic determinations of proteins and biological amino acid as N(O)-tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of Chromatography B*. 665:15-25.
- Yemm, E.M. & Cocking, E.C. 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Analyst*. 80:209-213.
- Zenzen, I.L., Amarante, L., Colares, D.S., Oliveira, M.L., Bernardi, E., Costa, E.L.G. & Nascimento, J.S. 2007. Área foliar e volume do sistema radicular em plantas de soja inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* e submetidas ao alagamento. *Revista Brasileira de Biociências*. 5(2):1092-1094.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W. & Forde, B.G. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96:6529-6534.
- Zhang, H.M. & Forde, B.G. 2000. Regulation of arabidopsis root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*. 51(342):51-59.
- Zhang, H., Rong, H. & Pilbeam, D. 2007. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 58:2329-2338.

Zhen, R.G., Koyro, H.W., Leigh, R.A., Tomos, A.D. & Miller, A.J. 1991.
Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-
selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta*. 185:356-361.