

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



JULIANA DOMINGUES LIMA

**TRANSPORTE DE NITROGÊNIO E METABOLISMO
DA ASPARAGINA EM SOJA (*Glycine Max* L.) SOB
DEFICIÊNCIA NA ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Juliana Domingues Lima</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

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


Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 000
Nº CHAMADA T/UNICAMP
L628t
EX
TOMBO EC/ 50083
PROC 16.837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 30/07/02
Nº CPD

CM00171057-3

31B ID 248370

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L628t **Lima, Juliana Domingues**
Transporte de nitrogênio e metabolismo da asparagina
em soja (*Glycine Max* L.) sob deficiência na assimilação
do nitrogênio/Juliana Domingues Lima.–
Campinas, S.P:[s.n.], 2002.

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

1. Asparagina. 2. Soja. 3. Transporte. I. Sodek, Ladaslav.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

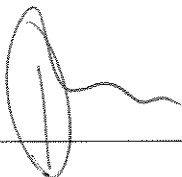
Data da defesa: 15/05/2002.

BANCA EXAMINADORA

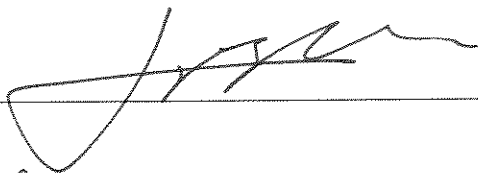
Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador)



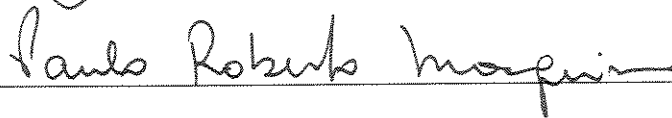
Prof. Dr. Paulo Mazzafera



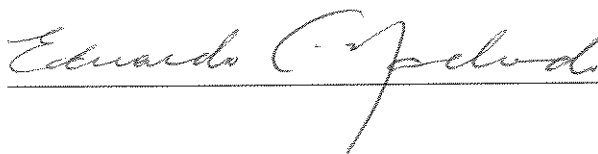
Prof. Dr. Jorge Vêta



Prof. Dr. Paulo Roberto Mosquim



Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Prof. Dr. Pedro Furlani

200234926

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me dado vida, força e sabedoria nas horas difíceis e alegria em muitos outros momentos;

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Professor Ladaslav Sodek, pela amizade, confiança e orientação;

Aos Professores Jorge Vega, Marlene Schiavinato e Paulo Mazzafera, pelo apoio, críticas e sugestões;

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos, atenção e amizade, que foram sempre constantes durante esses anos;

Ao professor Paulo Roberto Mosquim, pelo apoio e pela amizade;

Aos funcionários da UNICAMP, pelo auxílio na realização dos experimentos;

Às minhas irmãs e ao meu cunhado, pelo incentivo e pelo carinho;

Aos meus pais, Prentice e Darcy, pelo imenso amor, pelo apoio, pela educação e pelo incentivo; sei que certamente não teria como agradecer pelo sacrifício diário para que nada me faltasse e por tão valiosa presença em minha vida;

Ao Sr. Moraes e Dona Regina pela agradável convivência, pelo apoio e carinho incondicional;

Aos meus demais familiares e amigos, pelo incentivo prestado;

Ao Wilson pelo amor e carinho, pela compreensão e companheirismo sempre presentes e por tudo que conquistamos e compartilhamos nesses anos de convivência.

ÍNDICE

BANCA EXAMINADORA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	II
ÍNDICE.....	III
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
SUMMARY.....	XIII
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO 1. Otimização das condições de ensaio da asparagina sintetase em nódulo de soja e caracterização da atividade da asparaginase em raízes e nódulos.....	5
1. Introdução.....	7
2. Material e Métodos.....	9
2.2. Métodos Analíticos.....	9
2.2.1. Asparaginase.....	9
2.2.1.1. Métodos de extração e preparação.....	9
2.2.1.2. Ensaio enzimático padrão e estudo do requerimento de potássio.....	10
2.2.1.3. Método de quantificação dos produtos	10
2.2.2. Asparagina sintetase.....	12
2.2.2.1. Métodos de extração e preparação.....	12
2.2.2.2. Ensaio enzimático padrão.....	12
2.2.2.3. Otimização das condições de ensaio	13

2.2.2.4. Método de quantificação dos produtos.....	13
2.2.3. Dosagem de proteínas.....	13
2.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	13
3. Resultados e Discussão.....	14
4. Conclusão.....	20
CAPÍTULO 2. Efeito da transferência de soja não-nodulada para hidroponia sobre o transporte e metabolismo de nitrogênio.....	21
1. Introdução.....	23
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	25
2.2. Métodos Analíticos.....	26
2.2.1. Coleta da seiva do xilema.....	26
2.2.2. Coleta da seiva do floema.....	26
2.2.3. Coleta, extração e análise dos compostos nitrogenados de raízes e folhas.....	26
2.2.4. Dosagem de aminoácidos solúveis livres totais (ALT).....	27
2.2.5. Dosagem do NO_3^-	28
2.2.6. Separação de aminoácidos livres por HPLC.....	28
2.2.7. Determinação das atividades enzimáticas.....	28
2.2.7.1. Extração de enzimas.....	28
2.2.7.2. Dosagem da atividade da AAT.....	29
a) Sentido de formação do GLU (AAT).....	29
b) Sentido de formação de ASP (GOT).....	29
2.2.7.3. Dosagem da atividade da PEPcase.....	30

2.2.7.4. Dosagem da atividade da ASNase.....	31
2.2.7.5. Dosagem de proteínas.....	31
2.2.8. Nível de O ₂	31
2.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	31
3. Resultados e Discussão.....	32
3.1. Compostos nitrogenados da seiva do xilema em plantas não-noduladas transferidas para hidroponia em diferentes estádios de desenvolvimento.....	32
3.2. Compostos nitrogenados da seiva do xilema e floema, raízes e folhas de plantas não-noduladas transferidas para hidroponia	35
3.3. Atividade de enzimas do metabolismo de asparagina em raízes de plantas não-noduladas transferidas para hidroponia sem nitrogênio.....	42
3.4. Compostos nitrogenados na seiva do xilema e raízes de plantas não-noduladas transferidas para hidroponia com e sem nitrogênio, seguida da adição de solução com 5mM de nitrato em plantas que receberam solução sem nitrogênio.....	47
4. Conclusões.....	56
CAPÍTULO 3. Efeito da transferência de soja nodulada para hidroponia sobre o transporte de nitrogênio.....	57
1. Introdução.....	59
2. Material e Métodos.....	61
2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	61
2.2. Métodos analíticos.....	62
2.2.1. Coleta da seiva do xilema.....	62
2.2.2. Coleta da seiva do floema.....	62

2.2.3. Coleta, extração e análise dos compostos nitrogenados de raízes, nódulos e folhas.....	62
2.2.4. Dosagem de ALT.....	62
2.2.5. Dosagem de ureídeos totais (URE).....	63
2.2.6. Dosagem do NO_3^-	63
2.2.7. Separação de aminoácidos livres por HPLC.....	63
2.2.8. Determinação das atividades enzimáticas.....	64
2.2.8.1. Extração de enzimas.....	64
2.2.8.2. Dosagem da atividade da AAT.....	64
a) Sentido de formação do GLU (AAT).....	64
b) Sentido de formação de ASP (GOT).....	64
2.2.8.3. Dosagem da atividade da PEPcase.....	64
2.2.8.4. Dosagem da atividade da ASNase.....	65
2.2.8.5. Dosagem da atividade da AS.....	65
2.2.8.6. Dosagem de proteínas.....	65
2.3. Nível de O_2	65
2.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	65
3. Resultados e Discussão.....	66
3.1. Compostos nitrogenados da seiva do xilema em plantas noduladas transferidas para hidroponia em diferentes estádios de desenvolvimento.....	66
3.2. Compostos nitrogenados da seiva do xilema e floema, raízes e folhas de plantas noduladas transferidas para hidroponia	68
3.3. Atividade de enzimas do metabolismo de asparagina em nódulos de plantas transferidas para a hidroponia.....	76

3.4. Transferência de plantas noduladas para hidroponia sem nitrogênio, seguido do replantio em vermiculita.....	83
3.5. Transferência de plantas noduladas para hidroponia sem nitrogênio, seguida da adição de solução com 5mM de nitrato.....	94
4. Conclusões.....	107
CAPÍTULO 4. Efeito da transferência de diferentes espécies de plantas para hidroponia sem nitrogênio no transporte de nitrogênio na seiva do xilema.....	109
1. Introdução.....	111
2. Material e Métodos.....	112
2.1. Material Vegetal	112
2.2. Inóculo: origem, manutenção, multiplicação e inoculação das plantas.....	112
2.3. Condições de cultivo.....	113
2.4. Métodos Analíticos.....	115
2.4.1. Coleta da seiva do xilema.....	115
2.4.2. Dosagem dos compostos nitrogenados na seiva do xilema.....	115
2.4.2.1. Dosagem de ALT.....	115
2.4.2.2. Dosagem de NO_3^-	115
2.4.2.3. Dosagem de URE.....	115
2.4.2.4. Separação de aminoácidos livres por HPLC.....	115
2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	115
3. Resultados e Discussão.....	115
3.1. Efeito da transferência de leguminosas não-noduladas e noduladas para hidroponia sem nitrogênio no transporte de nitrogênio na seiva do xilema.....	116
3.1.1. Considerações Gerais.....	126

3.2. Efeito da transferência de plantas de girassol, tomate e milho para hidroponia sem nitrogênio.....	129
3.3. Transferência de cultivares de soja nodulada para hidroponia sem nitrogênio: influência de cultivar e estirpe.....	133
4. Conclusões.....	136
CAPÍTULO 5. Metabolismo e transporte de nitrogênio em soja durante a nodulação e o desenvolvimento da planta.....	137
1. Introdução.....	139
2. Material e Métodos.....	140
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	140
2.2. Métodos Analíticos.....	140
2.2.1. Dosagem de pigmentos foliares.....	140
2.2.2. Coleta da seiva do xilema.....	141
2.2.3. Coleta, extração e análise dos compostos nitrogenados de raízes e nódulos.....	141
2.2.4. Dosagem de ALT.....	141
2.2.5. Dosagem de URE.....	141
2.2.6. Separação de aminoácidos livres por HPLC.....	141
2.3. Delineamento experimental e análise estatística.....	141
3. Resultados e Discussão.....	142
4. Conclusão.....	152
CONCLUSÃO GERAL.....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

ABREVIATURAS

AAT	aspartato aminotransferase
ALT	aminoácidos livres totais
AMP	adenosina 5'-monofosfato
AS	asparagina sintetase
ASNase	asparaginase
AOA	ácido amino-oxiacético
ATP	adenosina trifosfato
DAS	dias após a semedura
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno-diamina-tetra-acético
GS	glutamina sintetase
GOGAT	glutamato sintase ou glutamato-oxoglutarato aminotransferase
°C	grau centígrado
GABA	ácido gama-aminobutírico
GOT	glutamato:oxalacetato aminotransferase
HAc	ácido acético
Hepes	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
H-N/H+N	hidroponia sem nitrogênio e hidroponia com nitrogênio
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
MDH	L-malato: NAD ⁺ oxidoreductase;
MF	matéria fresca
min	minuto (s)
NADH	β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NaOAc	acetato de sódio

OPA	orto-ftaldialdeído
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilase
PPi	pirofosfato
R-N	replântio em vermiculita sem nitrogênio
Tris	tris[hidroximetil]aminometano
URE	ureídeos totais

RESUMO

Foram conduzidos experimentos com plantas de soja e outras leguminosas em condições de casa-de-vegetação. Plantas noduladas e não-noduladas apresentaram aumento significativo do nível de ácido aspártico e redução da asparagina transportada na seiva do xilema sob condições que limitam a assimilação do nitrogênio. Em soja, a resposta foi revertida quando as condições ótimas para assimilação do nitrogênio foram restauradas. Plantas não-noduladas, crescidas em vasos contendo vermiculita, usando nitrato como fonte de nitrogênio, apresentaram este fenômeno quando transferidas para hidroponia em solução deficiente em nitrogênio. Subseqüentemente, quando nitrato foi novamente fornecido o efeito foi revertido. Plantas noduladas crescidas em vermiculita recebendo solução deficiente em nitrogênio e totalmente dependente da fixação do N_2 como fonte de nitrogênio apresentaram a mesma resposta quando transferidas para hidroponia com aeração. Neste caso, após a transferência para hidroponia os níveis de ureídeos na seiva do xilema decresceram significativamente sugerindo, com outras evidências, que a fixação do nitrogênio foi prejudicada nessas condições. Com o retorno destas plantas para vermiculita, ambos a razão ASP/ASN e o nível de ureídeos retornaram aos valores iniciais. Durante o crescimento e a nodulação de plantas de soja cultivadas em vermiculita em solução nutritiva deficiente em nitrogênio, o fenômeno foi observado durante curto período que corresponde à fase de "fome de N". Esta fase é caracterizada pelo transitório amarelecimento das folhas e ocorre quando as reservas são exauridas e a nodulação não está suficientemente desenvolvida para manter a planta com nitrogênio fixado. Seguindo os tratamentos descritos acima, a análise dos aminoácidos livres do floema, raízes e nódulos também revelou aumento da razão ASP/ASN mas, muito menos pronunciado do que o encontrado na seiva do xilema. A atividade da

asparagina sintetase foi investigada no sistema radicular para tentar elucidar os fatores envolvidos no fenômeno. A atividade da enzima nos nódulos sofreu uma queda nos tratamentos que elevaram a razão ASP/ASN como a transferência das plantas noduladas para hidroponia e a queda foi recuperada com o retorno das plantas para vermiculita quando a razão ASP/ASN atingiu o nível normal. Entretanto, houve insucesso na dosagem da atividade da asparagina sintetase nas raízes. Evidentemente, em termos qualitativos, o transporte de nitrogênio na seiva do xilema parece ser um indicador bastante sensível do *status* de nitrogênio da planta.

SUMMARY

Experiments with soybean plants and other legumes were conducted under greenhouse conditions. Both nodulated and non-nodulated plants were found to present substantially increased aspartic acid levels and lower asparagine in the xylem bleeding sap under conditions that limit nitrogen assimilation. In soybean, the response was reversed when optimum conditions for nitrogen assimilation were restored. Non-nodulated plants, grown in pots with vermiculite using nitrate as sole source of nitrogen, presented this phenomenon when transferred to N-deficient water-culture. Subsequent return to nitrate reversed the effect. Nodulated plants grown in vermiculite with N-deficient nutrient solution and totally dependent on N_2 -fixation as a source of nitrogen presented the same response when transferred to aerated water-culture. In this case xylem ureide levels also fell substantially suggesting, along with other evidence, that nitrogen fixation was impaired under these conditions. On return of plants to vermiculite, both the Asp/Asn ratios and ureide levels returned to initial values. During growth and nodulation of soybean plants cultivated in vermiculite with N-deficient nutrient solution, the phenomenon was observed over a short period corresponding to the "N-hunger" phase. This phase is characterised by transient yellowing of the leaves and occurs when reserves are depleted and nodulation is not yet sufficiently developed to maintain the plant with fixed nitrogen. Following the above-described treatments, an analysis of free-amino acids in the phloem, roots and nodules also revealed some increase in the Asp/Asn ratios but these were much less pronounced than those found for the xylem. Asparagine synthetase activity was investigated in the root system in an attempt to elucidate the factors underlying the phenomenon. Activity in the nodules was found to fall during treatments which elevated the Asp/Asn ratio such as transfer of nodulated plants to water-culture and the fall in activity reversed on return of the plants to vermiculite when ratios returned to normal.

However, measurement of asparagine synthetase activity in the roots was unsuccessful. Evidently, in qualitative terms, nitrogen transport in the xylem appears to be very sensitive to the nitrogen status of the plant.

INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio (N) é componente fundamental de proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e outras moléculas essenciais da célula. Requerido em grande quantidade constitui cerca de 2 a 5% da matéria seca dos tecidos vegetativos da planta quando cultivada em condições ótimas (Benton Jones *et al.*, 1991). As principais fontes fornecedoras de N são a decomposição da matéria orgânica, os fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica do dinitrogênio (Evans & Burris, 1992). É encontrado no solo em quantidades inferiores àquelas necessárias ao crescimento e desenvolvimento da planta, sendo freqüentemente apontado como fator limitante da produtividade (Hák & Nátr, 1987).

Leguminosas como soja, têm a capacidade de adquirir N de duas fontes distintas; N inorgânico, na forma de (nitrato) NO_3^- ou íons amônio, presentes na solução do solo e N atmosférico por meio da simbiose com *Rhizobium* spp. (Blumenthal *et al.*, 1997).

A importância econômica do cultivo da soja no país é bem conhecida, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais desta leguminosa. Do ponto de vista agrônomo, as leguminosas como a soja gera grande interesse pelo fato de poder ser cultivada na ausência de adubação nitrogenada. Isto ocorre em função da associação simbiótica entre bactérias do solo e as leguminosas, que permite a planta utilizar, ao invés do N mineral, o N do ar. Atualmente, o processo de fixação de N permite que o cultivo da soja no país atinja alta produtividade sem a aplicação de adubos nitrogenados no solo, resultando na economia de bilhões de dólares por safra em fertilizantes (Dobereiner, 1997).

Os processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na fixação de N têm sido intensivamente estudados, bem como a absorção, redução e assimilação do NO_3^- . Em soja nodulada os principais produtos da fixação de N são os ureídeos (Layzell & Larue, 1987; Rainbird *et al.*, 1984). Os ureídeos representam cerca de 80% do N translocado via xilema e

soja nodulada. Soja não-nodulada, dependente do NO_3^- como fonte de N e transporta apenas traços de ureídeos, de forma que a presença desses compostos na seiva do xilema pode ser usada para avaliar a fixação de N na planta (McClure *et al.*, 1980; Herridge & Peoples, 1990; Sodek & Silva, 1996). Em soja não-nodulada, o aminoácido asparagina (ASN) predomina como forma de transporte de N no xilema (Matsumoto *et al.*, 1977; McClure & Israel, 1979). Mesmo em plantas em simbiose, ASN representa a principal forma de transporte depois dos ureídeos (Streeter, 1979).

De modo geral, o transporte de N na forma de aminoácidos tem recebido pouca atenção em função da importância dos ureídeos e a sua associação com o processo de fixação de N. Estudos recentes mostraram que, além dos ureídeos, os aminoácidos sofrem mudanças drásticas no sistema de transporte quando plantas de soja são submetidas a alguns tipos de estresse ou mudanças nas condições de crescimento (Puiatti & Sodek, 1999). O cultivo em hidroponia é uma técnica fácil, que pode facilmente simular a condição de alagamento, observada em solos com má drenagem. Nessa condição, mesmo quando a solução nutritiva é aerada, parece ocorrer limitação na disponibilidade de oxigênio para alguns processos. Quando o oxigênio é limitante, ocorrem decréscimos na atividade da nitrogenase e na atividade metabólica do nódulo (Bergersen, 1971; Layzell *et al.*, 1990). Em síntese, ao transferir plantas de soja para um sistema de hidroponia, ou encharcar o sistema radicular, ocorrem mudanças no metabolismo da ASN no sistema radicular. Desse modo o teor de ácido aspártico (ASP) no sistema de transporte aumenta sensivelmente enquanto o da ASN diminui (Puiatti & Sodek, 1999). Não se sabe completamente o significado de tais alterações para assimilação do N e outros processos metabólicos da planta.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar o transporte de N e metabolismo da ASN em soja (*Glycine max* L.) sob deficiência na assimilação do N.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO DA ASPARAGINA SINTETASE EM NÓDULO DE SOJA E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ASPARAGINASE EM RAÍZES E NÓDULOS

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho surgiu das observações de Puiatti & Sodek (1999), de que a transferência de soja para a hidroponia sem N tem reflexos profundos na razão Asp/Asn na seiva do xilema. Elucidar as mudanças metabólicas envolvendo estes dois aminoácidos foi um dos principais objetivos deste estudo.

São duas as enzimas envolvidas na interconversão destes dois aminoácidos, a asparagina sintetase (AS) e a asparaginase (ASNase) responsáveis, respectivamente, pela biossíntese e degradação da ASN.

A biossíntese de ASN é catalisada pela AS, que promove a transferência do grupo amino do ASP a partir da GLN ou amônia, com hidrólise simultânea do ATP para AMP (Lea *et al.*, 1990; Richards & Schuster, 1992). GLN é apontada como principal substrato para AS em plantas, sendo neste caso denominada de L-aspartato: L-glutamina amido ligase (ASN sintetase; E.C. 6.3.5.4.), conforme a reação proposta por Lea & Fowden (1975) e Shi *et al.* (1997):



A enzima foi encontrada em cotilédones de leguminosas pós-germinados (Lea & Fowden, 1975; Rognes, 1975; Rognes, 1980; Pike & Beevers, 1982), raízes de plântulas de milho (Stulen & Oaks, 1977), nódulos de soja (Huber & Streeter, 1984, 1985) e de tremço (Scott *et al.*, 1976; Shelp & Atkins, 1984).

A distribuição limitada das enzimas que degradam a ASN nos tecidos vegetais, é uma das razões de ser considerada um composto estável para armazenamento e transporte. Entretanto, em tecidos em rápido crescimento, como folhas e sementes em desenvolvimento,

esta rota é metabolicamente ativa, fornecendo N para a síntese de outros aminoácidos (Joy & Ireland, 1990). A principal rota para utilização da ASN envolve primeiramente a desaminação por meio da ASNase (E.C. 3.5.1.1.; L-asparagina amido hidrolase), conforme a reação (Joy & Ireland, 1990):



O ASP liberado nesta reação pode ser reutilizado diretamente ou sofrer reação de transaminação, enquanto que amônia pode ser incorporada no tecido por meio de outra reação enzimática. A ASNase foi descoberta (Atkins *et al.*, 1975) e purificada (Lea *et al.*, 1978) em sementes imaturas de tremoço, mostrando-se independente do íon potássio. Outra forma dependente do íon potássio foi encontrada em sementes imaturas de ervilha (Sodek *et al.*, 1980). Foi também encontrada em folhas de ervilha (Lloyd & Joy, 1978), *Lupinus albus* (Atkins *et al.*, 1983) e em raízes de espécies de tremoço (Chang & Farnden, 1981).

Diante da importância destas enzimas no transporte, mobilização e armazenamento da ASN, foram realizados alguns estudos preliminares sobre suas características, visando a posterior observação do seu papel no controle da razão ASP/ASN na seiva do xilema. Verificou-se o requerimento do íon K^+ na atividade da ASNase em raízes e nódulos de plantas de soja, a possibilidade de determinar a atividade da AS em raízes, e otimizou-se as condições de ensaio da AS em nódulos de soja.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Plantas de soja (*Glycine max* (L.) cv. IAC-17) noduladas (inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe 463 (=SEMIA 5019) e não-noduladas, foram cultivadas em vasos com vermiculita, em casa-de-vegetação sob condições naturais de luz e temperatura.

As plantas inoculadas receberam solução nutritiva -N (0 mM N-NO₃⁻) e 0,15 mM de N-NO₃⁻ apenas no período de deficiência de "N". Para obtenção de plantas não-noduladas foi fornecida solução nutritiva "+N" (15 mM N-NO₃⁻).

As soluções nutritivas "+N" e "-N" foram preparadas baseando-se na solução de Hoagland & Arnon (1950). A aplicação de solução nutritiva foi feita duas vezes por semana, sendo distribuídos 250 mL de solução nutritiva por vaso. Irrigações, quando necessárias, foram realizadas com água de torneira.

2.2. Métodos Analíticos

2.2.1. Asparaginase

2.2.1.1. Métodos de extração e preparação

A extração e o ensaio da ASNase foram realizados, conforme Sodek & Lea (1993). Raízes (soja não-nodulada) e nódulos (soja nodulada) foram coletados, lavados com água deionizada, secos com papel absorvente, pesados e homogeneizados em almofariz previamente resfriado, com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 1 mM de DTT, 50 mM de KCl (opcional) e 10 % de glicerol (v/v), na proporção de 2 mL/g (raízes) ou 2,8 mL/g (nódulos). Os extratos foram centrifugados 40000 g por 20 min a 4°C e, em seguida, dessalinizados em coluna PD10 (Sephadex G-25 M) equilibrada com tampão de extração correspondente a 4°C.

A concentração de proteína no extrato foi determinada de acordo com Bradford (1976).

2.2.1.2. Ensaio enzimático padrão e estudo do requerimento de potássio

O meio de reação continha 10 mM de ASN, 50 mM de KCl (opcional), Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, 500 µL (raízes ou nódulos) de extrato enzimático dessalinizado, em volume final de 600 µL. Foram montados 4 ensaios:

Ensaio 1: 200 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8, 200 µL de ASN 30 mM e 200 µL de extrato protéico dessalinizado em G25 M sem KCl

Ensaio 2: 200 µL de Tris-HCl 50 mM pH 8, 200 µL de ASN 30 mM e 200 µL de extrato protéico dessalinizado em G25 M com KCl

Ensaio 3: 200 µL de KCl 150 mM, 200 µL de ASN 30 mM e 200 µL de extrato protéico dessalinizado em G25 M sem KCl

Ensaio 4: 200 µL de KCl 150 mM, 200 µL de ASN 30 mM e 200 µL de extrato protéico dessalinizado em G25 M com KCl

O meio de reação foi incubado por 60 min, a 35°C. A reação foi paralisada com 100 µL de ácido sulfossalicílico (200 mg/mL), em seguida, feita centrifugação da mistura por 3 min a 20000 g para precipitação das proteínas, filtração do sobrenadante, diluição com água deionizada, ajuste do pH para 7,0 com NaOH (Joy & Ireland, 1990), derivação de uma alíquota com OPA-Borato (Benson & Hare 1975; Jarrett, 1986; Marur *et al.* 1994) e análise em HPLC.

2.2.1.3. Método de quantificação dos produtos

A separação e análise da ASN e ASP, substrato e produto da reação da ASNase, foram conduzidas com base na derivação com OPA, seguida da separação e quantificação em HPLC

(Benson & Hare 1975; Jarrett *et al.*, 1986; Marur *et al.*, 1994).

A concentração de aminoácidos do ensaio foi ajustada para 0,2 a 1,0 $\mu\text{mol/mL}$ através de diluição com água. Uma alíquota de 10 μL foi misturada com 70 μL do reagente OPA (50 mg OPA dissolvidos inicialmente em 1 mL de metanol, depois acrescidos de 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 e, no dia de uso, mais 60 μL de 2-mercaptoetanol). Após 2 min de reação com OPA, uma alíquota de 10 μL foi injetada no HPLC. Os produtos da derivação foram separados em coluna ODS-2 Suprapac (tipo C18, 250 x 4,6 mm), sendo eluídos com fluxo de 0,8 mL/min, em gradiente formado por quantidades crescentes de metanol 65 % (=“B”) em relação ao tampão fosfato, pH 7,2 (=“A”: fosfato de sódio 50 mM, acetato de sódio 50 mM, 1,5 mL de ácido acético, tetrahydrofurano 20 mL, e metanol 20 mL em 1 L de água). O gradiente foi programado para aumentar a proporção de “B” em relação à “A” de 20 a 60 % nos primeiros 20 min, seguido de um aumento de 60 a 75 % durante o período de 20 e 25 min e finalmente de 75 a 100 % entre 25 e 35 min, por meio de 2 bombas (A e B) da marca LKB mod.2150, controladas por um gerador de gradiente da marca LKB mod. 2152.

Os aminoácidos eluídos foram monitorados por um detector de fluorescência (Shimadzu modelo RF350) ajustado em 250nm (luz de excitação) e 480nm (emissão de fluorescência). O sinal do monitor foi processado por um integrador (LKB, modelo 2221).

Cada um dos aminoácidos do ensaio foi identificado pelo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, tomando-se por base o padrão de aminoácidos Sigma AAS-18, que contém 18 aminoácidos protéicos, ao qual foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA. A concentração de cada aminoácido foi determinada pela área do seu respectivo pico, comparando-se com o pico do mesmo aminoácido no padrão utilizado, cuja concentração era de 250 nmol/mL.

2.2.2. Asparagina sintetase

2.2.2.1. Métodos de extração e preparação

A extração e ensaio da AS foi feita baseando-se nos trabalhos realizados por Huber & Streeter (1985) e Romagni & Dayan (2000). Raízes (soja não-nodulada) e nódulos (soja nodulada) foram coletados das plantas lavados com água deionizada e secos com papel absorvente, pesados e homogeneizados em almofariz previamente resfriado, com tampão Hepes 100 mM, pH 8,5, 0,1 mM de EDTA, 10 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de DTT, 25 % de glicerol (v/v) e 67 mM de 2-mercaptoetanol, adicionado na hora do uso do tampão, na proporção de 2,5 mL/g (raízes) ou 4 mL/g (nódulos). Os extratos foram centrifugados a 40000 g por 20 min a 4°C. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 0,5 μ L/mL de 2-mercaptoetanol coletados e as proteínas precipitadas com 42 % de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ por 30 min no gelo. O precipitado foi coletado por centrifugação a 20000 g por 10 min a 4°C e, solubilizado em 2,5 mL de tampão de extração. A seguir, foi feita a dessalinização do extrato em coluna PD10 (Sephadex G-25M) equilibrada com tampão de extração a 4°C.

2.2.2.2. Ensaio enzimático padrão

A atividade foi determinada em meio de reação constituído de 5 mM de GLN, 10 mM de ATP, 10 mM de ASP, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT e 0,1 mM de EDTA, Hepes 50 mM pH 7,75 e 400 μ L do extrato dessalinizado, em volume total de 500 μ L. A reação foi iniciada com a adição do extrato dessalinizado, seguida de incubação a 30°C por 60 min. A reação foi paralisada com 100 μ L de ácido sulfossalicílico (200 mg/mL) e seguidos os mesmos procedimentos para quantificação dos produtos da ASNase.

2.2.2.3. Otimização das condições de ensaio

GLN foi testada a 0; 0,01; 0,1; 0,5; 1, 5 e 10 mM. ASP foi testado a 0; 0,1; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 mM. ATP foi testado a 0; 0,1; 0,5; 1,0; 5; 10 e 30 mM. AS foi incubada em intervalos de 30 a 240 min. Foi estudado também o efeito do AOA na taxa de síntese da ASN.

2.2.2.4. Método de quantificação dos produtos

Realizada conforme quantificação dos produtos da ASNase.

2.2.3. Dosagem de proteínas

Na determinação de proteínas utilizou-se o reagente de Bradford (1976), preparado pela dissolução de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol 95 %, ao qual foram acrescentados 100 mL de ácido orto-fosfórico 85 % p/v, o volume completado para 1L com água deionizada. A mistura foi filtrada a vácuo, em papel de filtro. A cada 0,1 mL do extrato ou padrão de albumina soro bovino (10-100 µg) foram misturados 5,0 mL do reagente de Bradford. Os tubos foram agitados e as absorbâncias lida a 595nm, sendo feitas três repetições para padrão e extratos protéicos.

2.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os dados apresentados representam a média de quatro repetições (vaso com três plantas cada). Os dados foram submetidos a análise de variância e, quando o Teste F foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste Tukey (Gomes, 1990).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os efeitos da presença de K^+ na extração e no ensaio da ASNase em raízes soja. Como se observa, não houve diferença nas atividades da enzima quando se realizou a extração e o ensaio, na ausência e presença de K^+ . Isso significa que a atividade da enzima em raízes é independente de K^+ . A mesma independência foi observada em nódulos (Tabela 2).

Na forma dependente de potássio, o íon K^+ é responsável provavelmente por algum tipo de alteração conformacional que permite sua atividade catalítica (Sodek *et al.*, 1980). Sieciechowicz & Ireland (1989) citam o efeito ativador e estabilizador do íon K^+ . Ocorreu requerimento de K^+ em *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Phaseolus multiflorus*, *Zea*, *Hordeum* e algumas cultivares de *Lupinus* (Joy & Ireland, 1990), enquanto que em sementes de *Lupinus polyphyllus* (Sodek *et al.*, 1980), *L. arboreus* e *L. angustifolius* (Change & Farnden, 1981) a enzima foi independente de K^+ .

O fato das formas de ASNase de raízes e nódulos de soja mostrarem independência de K^+ , significa que *in vivo* o K^+ não é ativador da enzima e, portanto, sua concentração não regula a atividade da enzima. Por outro lado, não permite evitar a interferência desta enzima nos ensaios de AS com a exclusão de K^+ do ensaio.

Estudos com AS apontam dificuldades devido à sua instabilidade (Huber & Streeter, 1985), presença de inibidores estáveis ao calor e dializáveis no extrato cru (Joy *et al.*, 1983), e contaminação com atividade da ASNase (Tsai & Coruzzi, 1990). Como resultado, somente tem sido alcançada a purificação parcial da enzima (Huber & Streeter, 1985) e muitos estudos têm optado por utilizar técnicas moleculares para sua caracterização (Küster, *et al.* 1997; Kim *et al.*, 1999; Osuna *et al.*, 1999).

Tabela 1. Efeito do íon K^+ na atividade da ASNase de raízes de soja (cultivar IAC17,) não-nodulada, cultivada em vermiculita com nitrato. Atividade expressa em nmol ASP/g MF min. Extração e ensaio da enzima em presença e ausência deste íon.

Extração sem K^+		Extração com K^+	
Ensaio sem K^+	Ensaio com K^+	Ensaio sem K^+	Ensaio com K^+
2,29 a	2,28 a	2,30 a	2,26 a

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 2. Efeito do íon K^+ na atividade da ASNase de nódulos de soja (cultivar IAC17 nodulada) cultivada em vermiculita sem nitrato. Atividade expressa em nmol ASP/g MF . min. Extração e ensaio da enzima em presença e ausência deste íon.

Extração sem K^+		Extração com K^+	
Ensaio sem K^+	Ensaio com K^+	Ensaio sem K^+	Ensaio com K^+
20,99 a	20,44 a	19,47 a	19,79 a

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Baseado nestas informações e na baixa atividade da enzima em ensaios feitos com nódulos, procurou-se atingir as melhores condições de extração e ensaio para a enzima em nódulos e, posteriormente, aplicar as mesmas para raízes, cuja atividade *in vitro* é bem mais baixa. Inicialmente, foi definido um protocolo para a determinação da atividade baseado nos trabalhos de Huber & Streeter (1985), porém um novo trabalho publicado por Romagni & Dayan (2000), forneceu-nos novas informações que poderiam resultar num protocolo mais adequado e, conseqüente, aumento da atividade da enzima no ensaio *in vitro*.

A primeira modificação feita no protocolo já estabelecido, foi a não utilização do PVPP (polivinil polipirrolidona) durante a maceração do tecido. Isto porque sua adição não

resultava em aumento significativo da atividade e poderia causar perda do extrato que fica aderido ao precipitado formado. Para assegurar que com esse procedimento não houvesse ação de fenóis sobre a enzima, a concentração de 2-mercaptoetanol foi aumentada de 50 para 67 mM (Romagni & Dayan, 2000).

Os testes feitos com raízes de soja não-nodulada mostraram uma atividade muito baixa da enzima, valores que não são confiáveis. Diante disto, foi investigada a interferência de inibidores. Primeiro utilizando-se EGTA no tampão de extração que poderia evitar a inibição por Ca^{+2} (Rognes, 1975; Joy & Ireland, 1990), porém, não houve diferenças nas atividades na presença e ausência deste quelante no tampão de extração. Noutro teste foi feita uma mistura do extrato de nódulos, com atividade razoável, com o extrato de raízes, com atividade muito baixa. A quantidade de ASN produzida na mistura foi um pouco inferior à produzida no extrato de nódulo mas, não o bastante para demonstrar presença de inibidores no extrato de raízes.

O maior problema observado foi a quantidade de proteínas totais das raízes que é muito mais baixa do que no nódulo (cerca de 5 vezes). Romagni & Dayan (2000) concentraram o extrato dessalinizado por filtração em membrana, usando o "Concentrador" Centricon 30 da Amicon, o que facilitou a determinação da atividade da enzima em extratos de cotilédones de tremoço e soja. Em raízes de plântulas de milho, Stulen & Oaks (1977), também encontraram baixa atividade da AS.

Os testes feitos não podem ser considerados conclusivos no que diz respeito à ocorrência de inibição no extrato de raízes. Também não foi feita concentração do extrato ou adoção de outra metodologia para detecção e quantificação da ASN produzida na reação. Segundo Romagni & Dayan (2000), a detecção da atividade da AS por meio de radio-HPLC é mais quantitativa do que pelo método TLC (Richards & Schuster, 1998). Além disso, esta técnica tem maior segurança na identificação dos substratos e produtos formados durante o

ensaio, sendo capaz de monitorar a síntese *de novo* da ASN melhor do que medições indireta com ensaio da ASNase (Dembinski *et al.*, 1996) ou medidas da liberação de PPi (Hughes *et al.*, 1997).

No caso de nódulos, no princípio obteve-se atividades bastante baixas, mas que com otimização do ensaio puderam ser estimadas com segurança. Na Figura 1 estão apresentados os efeitos das concentrações de substratos (ATP, ASP e GLN), bem como tempo de incubação na atividade da AS em nódulos de soja.

Na mais alta concentração de ATP houve maior atividade da enzima, porém o comportamento da curva mostra que nessa concentração ainda não havia saturação completa da enzima (Figura 1A). Rognes (1975, 1980) utilizou 5 mM de ATP no ensaio da AS em cotilédones de tremoço; Huber & Streeter (1985) utilizaram a mesma concentração no ensaio da enzima em nódulo de soja. Entretanto, estas dosagens geralmente foram feitas em extratos que passaram por alguns passos de purificação (Rognes 1975, 1980; Huber & Streeter, 1985).

Neste trabalho, inicialmente, utilizou-se 5 mM de ATP no ensaio, depois 10 mM conforme sugeriu o trabalho de Romagni & Dayan (2000). Nesta condição, houve aumento da atividade da AS, indicando que a enzima ainda não estava saturada com ATP. Diante disso optou-se por utilizar 10 mM no ensaio padrão da otimização, ao invés de 5 mM. O aumento da atividade da AS em concentração de ATP acima de 10 mM observado na Figura 1, foi inesperado porque acima desta concentração, Romagni & Dayan (2000) verificaram efeito negativo do substrato na atividade da enzima. Uma explicação para isso é que ATP pode ser hidrolisado pela enzima ATPase presente no extrato. Ainda, ATP pode funcionar como ponto de regulação da atividade da enzima *in vivo* no nódulo. O K_m da enzima para o complexo Mg-ATP, determinado por Huber & Streeter (1985), foi de 0,076 mM, valor este muito mais baixo do que o K_m para ASP e GLN que foram, respectivamente, 1,24 e 0,16 mM.

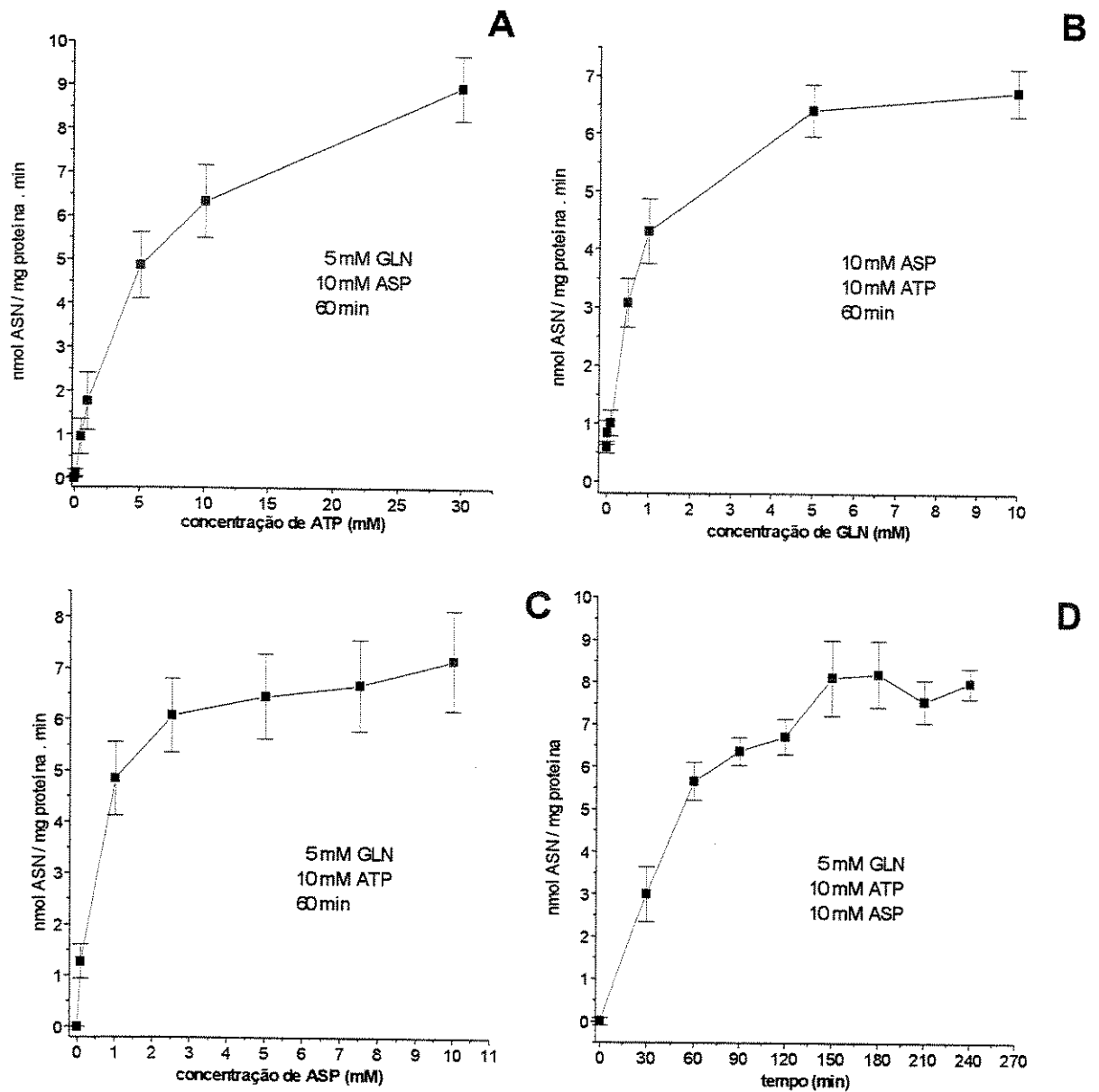


Figura 1. Atividade da AS (ASN nmol/mg proteína/min) em extrato de nódulos de soja (cultivar IAC 17) em ensaio em condições padrão (conforme descrito no Material e Métodos), exceto o efeito de (A) 0-30 mM de ATP; (B) 0-10 mM de GLN e (C) 0-10 mM ASP e (D) efeito do tempo de incubação.

A concentração de GLN ótima foi de 10 mM, havendo completa saturação, tanto que não se observa diferença na quantidade da ASN produzida pela enzima quando se usou 5 ou 10 mM (Figura 1B). Rognes (1975; 1980) e Huber & Streeter (1985) utilizaram 10 mM, Joy & Ireland (1990) recomendaram apenas 5 mM. Todavia, Romagni & Dayan (2000) observaram efeito negativo da GLN sobre atividade da AS em concentrações acima de 1 mM.

A atividade da AS a 10 mM de ASP foi ligeiramente superior que a 7,5 mM (Figura 3C). Na literatura, a concentração de ASP utilizada no ensaio é bastante variada, indo de 2,5 a 10 mM (Huber & Streeter, 1985; Joy & Ireland, 1990).

A quantidade de ASN produzida pela enzima em função do tempo (Figura 1D) mostra que até 60 min a velocidade de reação foi próxima da linearidade. Depois de 60 min, o aumento do tempo resultou em pouco aumento na quantidade de ASN produzida. Isto pode indicar limitação de algum substrato.

Quando 1 mM de AOA foi adicionado no meio de reação não houve diferença na atividade da AS, quando comparado com o ensaio sem AOA (dados não apresentados). Este composto tem a capacidade de inibir a ação de aminotransferases, neste caso, a aspartato aminotransferase, que remove o ASP disponível para biossíntese da AS, desviando-o para outras rotas biossintéticas, como a do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Richards & Schuster 1998; Ireland & Lea, 1999). Assim, pode-se dizer que não houve competição entre enzimas que utilizam ASP como substrato.

Foi feita também uma comparação entre a atividade da enzima de nódulos recém coletados das plantas e após o congelamento com N líquido e armazenamento a -70°C por 10 dias. Não houve diferença na atividade da enzima, permitindo o armazenamento dos nódulos durante esse período (dados não apresentados).

Como resultado final dos ensaios realizados, recomenda-se utilizar na dosagem de AS 30 mM de ATP, 10 mM de GLN e 10 mM de ASP e tempo de incubação de 60 min.

4. CONCLUSÕES

A enzima ASNase em raízes e nódulos de soja mostrou-se independente de K^+ .

A atividade da AS detectada nas raízes foi muito baixa.

Em nódulos, o estudo feito permitiu determinar condições mais próximas da ótima, para o ensaio da enzima AS e como consequência, valores mais altos de atividade.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA TRANSFERÊNCIA DE SOJA NÃO-NODULADA PARA HIDROPONIA SOBRE O TRANSPORTE E METABOLISMO DE NITROGÊNIO

1. INTRODUÇÃO

Leguminosas como soja, têm a capacidade de adquirir N de duas fontes distintas: N inorgânico, presente na solução do solo e N_2 atmosférico por meio da simbiose com rizóbios (Blumenthal *et al.*, 1997).

Quando a fonte de N inorgânico é NO_3^- , o mesmo é absorvido pelas raízes, armazenado nos vacúolos ou translocado para a parte aérea para redução ou armazenamento também no vacúolo. O primeiro passo para redução ocorre no citossol, por meio da enzima redutase do nitrato (NR) produzindo NO_2^- , que entra nos plastídeos (cloroplastos na parte aérea) e em seguida, é reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase (NIR). O NH_4^+ é fixado pelo sistema GS/GOGAT em aminoácidos (GLN/GLU), que servem como substratos para reações de transaminação para biossíntese de todos os outros aminoácidos protéicos (Tischner, 2000).

Em soja não-nodulada, o aminoácido ASN predomina como forma de transporte de N no xilema (Matsumoto *et al.*, 1977; McClure & Israel, 1979). Para a biossíntese de ASN é necessário ASP, sintetizado via ação da aspartato aminotransferase (AAT), que produz ASP a partir de GLU e oxalacetato (Reynolds *et al.*, 1981). ASP é em seguida amidado em ASN, via AS, em reação de transamidação usando o N na forma de amida da GLN (Lea & Fowden, 1975; Lea & Ireland, 1999). ASN, portanto, constitui um dos produtos primários da assimilação do NO_3^- , pois a AS atua em sequência ao sistema GS/GOGAT.

Estudos feitos anteriormente (Puiatti & Sodek, 1999) mostraram que a transferência de plantas não-noduladas, cultivadas em vermiculita com NO_3^- , para hidroponia sem NO_3^- , causa um forte aumento na razão ASP/ASN na seiva do xilema. Os objetivos do estudo realizado neste capítulo foram: verificar se este aumento resultava em alteração na composição de compostos nitrogenados da seiva do floema, raízes e folhas da planta; verificar se a redução é consequência da alteração das atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AAT/GOT),

fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) e asparaginase (ASNase); verificar se as alterações enzimáticas podem ser relacionadas com a composição da seiva do xilema e das raízes da planta; avaliar o efeito da transferência da plantas para hidroponia com NO_3^- ; e verificar se a concentração normal de ASN e ASP poderia ser recuperada com a adição de NO_3^- à solução nutritiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação em condições naturais de luz e temperatura. Para tal, sementes de soja (*Glycine max* (L.) cv. IAC-17) foram colocadas para germinar diretamente em vasos plásticos contendo 3 L de vermiculita exaustivamente lavada em água corrente. Após a emergência foi feito o desbaste de plântulas, conduzindo-se a partir daí, três plantas por vaso. Foram colocados pratos sob os vasos que serviram para reter pequena quantidade de água ou solução nutritiva.

Para obtenção de plantas não-noduladas foi fornecida solução nutritiva “+N” (15 mM de N-NO_3^-). As soluções nutritivas “+N” e “-N” foram preparadas baseando-se na solução de Hoagland & Arnon (1950), uma formulada com 15 mM de N-NO_3^- (solução “+N”) e a outra desprovida de N (solução “-N”).

Durante o cultivo, duas vezes por semana, foram fornecidos 250 mL da solução nutritiva “+N”. Quando necessário foram feitas irrigações com água de torneira.

Plantas não-noduladas no estágio vegetativo V2, V3, V6 ou V8 (Fehr *et al.*, 1971) foram transferidas para um sistema de hidroponia. Para este fim, o sistema radicular foi lavado cuidadosamente com água para remover o excesso de vermiculita e três plantas acomodadas em vasos com 3 L de solução nutritiva. O sistema foi mantido sob aeração contínua, por meio de um tubo flexível ligado à tubulação de um compressor de ar.

No período no qual as plantas foram mantidas em hidroponia, somente foram feitas trocas de solução quando houve alteração da concentração do NO_3^- de 0 para 5 mM. O volume inicial da solução no vaso foi restabelecido diariamente com a adição de água destilada. O pH da solução foi monitorado com um pHmetro portátil e ajustado para valores de $6,0 \pm 0,2$, com solução H_2SO_4 1 N.

2.2. Métodos analíticos

2.2.1. Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada entre 11:00 e 13:00 horas. A coleta foi feita conforme proposto por McClure & Israel (1979), sendo o caule seccionado com bisturi logo abaixo do nó cotiledonar, o local do corte lavado com água deionizada e enxugado com papel de filtro. Em seguida, o exsudado foi coletado por meio de tubo capilar e transferido para frascos mantidos no gelo. Após a coleta, as amostras foram armazenadas a 20°C para as análises posteriores.

2.2.2. Coleta da seiva do floema

Primeiramente, a parte aérea das plantas do vaso foi aspergida com água. Em seguida, foi feito o seccionamento do caule com bisturi logo abaixo do nó cotiledonar, separando-se o sistema radicular da parte aérea. O local do corte lavado com água deionizada e enxugado com papel absorvente. O caule foi novamente cortado sob solução de fosfato de sódio/dissódio 5 mM e EDTA 5 mM, a pH 6,0 (Neo & Layzell, 1997), e rapidamente transferido para frascos contendo 5 mL da mesma solução. A parte aérea foi coberta com saco plástico e o conjunto, transferido para sala escura. Decorridas três horas após o início da coleta (das 11:30 às 14:30 horas) os frascos foram recolhidos e armazenados no freezer, a -20°C.

2.2.3. Coleta, extração e análise dos compostos nitrogenados de raízes e folhas

As raízes foram coletadas, lavadas e secas em papel absorvente. Em seguida, foi feita a remoção da parte mais grossa da raiz principal e coletada uma amostra para análise. Depois o material foi picado com tesoura, pesado, congelado com N líquido, macerado em almofariz, e armazenado a -20°C. No caso de folhas, foi feita a remoção apenas da nervura principal e os outros procedimentos foram os mesmos feitos para raízes.

Para extração, foi utilizado MCW (metanol:clorofórmio:água) na proporção de 12:5:3 (Bielecki & Turner, 1966). Feitas três extrações intercaladas por centrifugações a 4000 g para remoção dos aminoácidos do tecido (1^a: 20 min, 2^a: 10 min e 3^a: 10 min), e os sobrenadantes de cada uma das centrifugações foram reunidos. Para cada 4 mL do extrato adicionou-se 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada. Após intensa agitação, fez-se a centrifugação da mistura a 2000 g por 10 min para acelerar a separação das fases. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, foi retirada a fração aquosa-metanólica, que foi ainda submetida a banho-maria a 40°C durante 2 horas para completa eliminação do resíduo de clorofórmio. Finalmente, determinou-se o volume final em proveta. A partir desta solução foram determinadas as concentrações de ALT (Yemm & Cocking, 1955), NO₃⁻ (Cataldo, 1975) e a composição de aminoácidos em HPLC (Jarrett, 1986; Marur *et al.*, 1994).

2.2.4. Dosagem de aminoácidos solúveis livres totais (ALT)

ALT foram determinados pelo método de Yemm & Cocking (1955). Foi colocado 1 mL de cada amostra (seiva do xilema ou extrato adequadamente diluído com água) ou do padrão leucina (0-200 nmol) em tubos de ensaio, e em seguida foi adicionado 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 0,2 mL do reativo de ninhidrina 5% em metil-celossolve (éter monometílico de etilenoglicol), mais 1 mL de KCN 2% (v/v) em metil-celossolve, sendo a solução de KCN preparada a partir de uma solução 0,01 M de KCN em água. Os tubos de ensaio foram cobertos com bolas de gude e colocados em banho-maria a 100°C por 20 min. Em seguida, os tubos foram transferidos para o escuro, até a temperatura ambiente, depois foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60 % (v/v) e feita agitação dos tubos. A absorbância do padrão, amostras e extrato foram medidas a 570nm, sendo que para cada uma delas foram feitas três repetições.

2.2.5. Dosagem do NO₃⁻

O procedimento utilizado foi o de Cataldo *et al.* (1975). Foi misturado 0,1 mL de cada amostra (seiva do xilema ou extrato adequadamente diluído com água) e do padrão NO₃⁻ de potássio (0-500 nmol de NO₃⁻) a 0,4 mL do reagente de ácido salicílico (ácido salicílico 5 % p/v em ácido sulfúrico concentrado), deixando-se a mistura em repouso por 20 min à temperatura ambiente, após agitação. Posteriormente, foram acrescentados, lentamente, 9,5 mL de hidróxido de sódio 2 N. A absorbância a 410nm foi lida após o resfriamento à temperatura ambiente, sendo feitas três repetições para padrão, amostras de seiva ou extratos.

2.2.6. Separação de aminoácidos livres por HPLC

Idem ao Capítulo 1 item 2.2.1.3.

2.2.7. Determinação das atividades enzimáticas

2.2.7.1. Extração de enzimas

Para extração de enzimas, primeiramente as raízes foram lavadas com água para retirar a vermiculita, e secas com papel absorvente. Foi retirada uma amostra porção mediana das raízes, que após a pesagem, foi levada para câmara fria (4°C), onde foi feita maceração em almofariz utilizando-se 5 mL de tampão de extração. O extrato foi transferido para tubos de centrifuga resfriados e feita a centrifugação a 40000 g por 20min a 2°C. Coletou-se o sobrenadante, do qual parte do volume foi dessalinizado em Sephadex G-25M (PD-10, Pharmacia). O extrato protéico dessalinizado foi utilizado para dosagem das atividades enzimáticas. Para todas as enzimas foram feitos ensaios de otimização da atividade.

2.2.7.2. Dosagem da atividade da AAT

A enzima conhecida como AAT (EC 2.6.1.1), é também denominada de glutamato:oxalacetato aminotransferase (GOT; denominação mais comum na literatura animal) ou aspartato:2-oxoglutarato aminotransferase (Ireland & Lea, 1999b). Esta enzima catalisa a reação:



a) Sentido de formação do GLU (AAT)

A atividade da aspartato aminotransferase foi estimada pelo acoplamento de duas reações, a reação da enzima, na direção de formação do GLU e AOA (AAT), e reação de transformação do AOA em malato, através da enzima malato desidrogenase (MDH; L-malato: NAD⁺ oxidoreductase; EC 1.1.1.37), utilizando-se NADH como doador de elétrons, conforme proposto por Ireland & Joy (1990). A extração da enzima foi feita em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 2,5 mM de DTT e glicerol 20 % (v/v). O volume total do meio de reação foi 1 mL, sendo constituído de 11,5 mM de ASP, 11,5 mM de 2-oxoglutarato, 5 unidades de MDH, 1 mM de NADH, Tris-HCl 50 mM e pH 7,5, e 150 µl de extrato protéico dessalinizado. As cubetas contendo o meio de reação, com exceção da enzima MDH e o do extrato proteico, foram mantidas em banho-maria a 30°C. O início da reação se deu com a adição da MDH, seguida da adição do extrato protéico, sendo que após 15 segundos foi feita a transferência da cubeta para o espectrofotômetro e feitas leituras da absorbância a 540nm, em intervalos de 15 segundos.

b) Sentido de formação de ASP (GOT)

A atividade da AAT/GOT no sentido de formação do ASP e 2-oxoglutarato (GOT) foi determinada em extrato protéico de raízes, a partir de adaptação feita da metodologia de

Ireland & Joy (1990). O extrato utilizado foi obtido da mesma maneira para AAT. A atividade foi estimada pela quantidade de ASP produzida. O volume total do meio de reação foi 0,5 mL, sendo constituído de 11,5 mM de GLU, 11,5 mM de AOA, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e 150 µl de extrato protéico dessalinizado. O meio de reação foi incubado por 10 min a 30°C, e a reação paralisada com adição de 100 µl de ácido sulfossalicílico 200 mg/mL. Em seguida, a mistura foi preparada para injeção em HPLC, conforme procedimentos apresentados no item 2.2.1.2. do Capítulo 1.

2.2.7.3. Dosagem da atividade da PEPcase

O extrato protéico para determinação da PEPcase (EC 4.1.1.31) foi obtido da mesma maneira que para AAT. A atividade foi determinada em extrato protéico de raízes por meio do acoplamento da reação $PEP + HCO_3^- \rightarrow AOA + Pi$, com acoplamento da reação de transformação do AOA em malato, através da enzima malato desidrogenase (MDH; L-malato: NAD⁺ oxidoreductase; EC 1.1.1.37), utilizando-se NADH como doador de elétrons, conforme Ashton *et al.* (1990). O volume total do meio de reação era de 1 mL, sendo constituído de 5 mM de PEP, 1 mM de K₂CO₃, 5 mM de MgCl₂, 2 mM de DTT, 2 unidades de MDH, 0,1 mM de NADH, Tris-HCl 25 mM e pH 8,0 e 200 µl de extrato protéico dessalinizado.

As cubetas contendo o meio de reação, com exceção da enzima MDH e o do extrato protéico, foram mantidas em banho-maria a 30°C. O início da reação enzimática se deu com a adição da MDH, seguida da adição do extrato protéico. Após 15 segundos foi feita a transferência da cubeta para o espectrofotômetro e feitas leituras da absorbância a 540nm, em intervalos de 15 segundos (Ashton *et al.*, 1990).

2.2.7.4. Dosagem da atividade da ASNase

A enzima ASNase (E.C. 3.5.1.1.) foi extraída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 1 mM de DTT, 50 mM de KCl (opcional) e 10 % de glicerol (v/v) (Sodek & Lea, 1993). A atividade foi estimada em extrato de raízes, determinando-se a quantidade de ASP produzida na reação $ASN \rightarrow ASP + NH_4^+$, ao final do tempo de incubação, por meio do HPLC. O meio de reação continha 15 mM de ASN, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, 500 μ L de extrato protéico dessalinizado, em volume final de 600 μ L. O meio de reação foi incubado por 60 min, a 35°C, e a reação paralisada com 120 μ L de ácido sulfossalicílico 200 mg/mL. Em seguida, a mistura foi preparada para injeção em HPLC, conforme item 2.2.1.2. do Capítulo 1.

2.2.7.5. Dosagem de proteínas

Idem ao Capítulo 1 item 2.2.3.

2.2.8. Nível de O₂

Os níveis de saturação de oxigênio nas soluções nutritivas foram medidos por meio de medidor portátil de oxigênio dissolvido (JENWAY, modelo 9071).

2.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Idem a Capítulo 1 item 2.3.

O controle dos experimentos foi sempre plantas em vermiculita.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compostos nitrogenados da seiva do xilema em plantas não-noduladas transferidas para hidroponia em diferentes estádios de desenvolvimento

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de um experimento preliminar realizado com o objetivo de selecionar o estágio de desenvolvimento da soja não-nodulada mais adequado, em termos de resposta na alteração das concentrações de ASP e ASN, para uso no sistema experimental deste estudo, ou seja, a transferência das plantas para hidroponia.

Ao contrário dos demais, no primeiro estágio analisado (V1) ainda não havia sido fornecida solução nutritiva com NO_3^- para as plantas. Observou-se neste estágio altas concentrações de ASN, GLN, ASP, e em especial de VAL e TYR e de ALT (Tabela 1). Estes aminoácidos representam o N remobilizado das reservas dos cotilédones, tendo em vista a ausência de fontes externas de N.

A partir de V1 as plantas passaram a receber solução com NO_3^- e quando atingiram os estádios V2, V3, V6 e V8 foram transferidas para hidroponia sem N (H-N) com aeração, por um período de 4 dias. A análise da seiva do xilema das plantas em H-N não mostrou grandes variações na concentração de ALT, quando comparada com a seiva do xilema de plantas mantidas em vermiculita (V+N). O declínio da concentração de ALT em H-N foi somente significativo em V3 e V6 (Tabela 1). Por outro lado, a concentração de NO_3^- sofreu grande redução em todos os estádios em que a transferência foi realizada (Tabela 1). Apesar da concentração de ALT nem sempre ser afetada, a composição de aminoácidos na seiva do xilema variou nas plantas transferidas para H-N, quando comparada com as plantas mantidas em V+N. Em todos os estádios de desenvolvimento foi possível observar aumento acentuado na concentração de ASP com a transferência das plantas. Ao mesmo tempo, notou-se decréscimo acentuado na concentração de ASN na seiva do xilema destas plantas (Tabela 1).

A alteração menos marcante na concentração de ALT pode indicar que em termos quantitativos, a exportação de aminoácidos das raízes para parte aérea não foi grandemente afetada. Daí surgiu o interesse em investigar se a concentração varia com o aumento do tempo de permanência na hidroponia e como é a concentração no sistema radicular.

O declínio da concentração do NO_3^- na seiva das plantas transferidas H-N é provavelmente uma consequência da menor taxa de absorção do NO_3^- , já que o mesmo não estava presente na solução nutritiva (Tabela 1). Quando as plantas foram transferidas no estágio V6 e V8, ao final do período em hidroponia, observou-se uma ligeira clorose nos trifólios mais novos da planta, revelando visualmente a condição de deficiência.

Independente do estágio de desenvolvimento em que as plantas não-noduladas se encontravam, a ASN sempre foi o aminoácido encontrado em maior quantidade na seiva do xilema. Em função da facilidade em obter plantas mais jovens escolheu-se o estágio V3 para os experimentos futuros.

A hipótese foi reforçada pelo fato de que plantas não-noduladas quando transferidas para hidroponia com solução nutritiva com N (N-NO_3^-) não apresentaram aumento na concentração ASP na seiva do xilema (Puiatti, 1997).

Tabela 1. Composição de aminoácidos, ALT e NO_3^- na seiva do xilema de soja não-nodulada da cultivar IAC 17, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em vermiculita com NO_3^- (V+N) e transferidas ou não para H-N por um período de quatro dias.

	V1	V2		V3		V6		V8	
	V + H_2O^*	V+N V+N	V+N H -N	V+N V+N	V+N H -N	V+N V+N	V+N H -N	V+N V+N	V+N H -N
(mol %)									
ASP	5,01	2,87	21,15	4,02	31,18	1,12	28,16	4,79	30,22
GLU	0,27	0,56	0,42	1,16	1,71	0,59	2,18	1,15	1,78
ASN	60,18	63,76	48,68	65,69	33,75	75,58	38,15	70,96	36,6
SER	2,01	5,78	3,16	5,87	3,52	5,25	3,72	6,75	3,86
GLN	8,71	4,16	3,01	2,56	2,89	5,74	3,25	4,75	3,12
HIS	2,35	3,03	2,71	2,88	3,32	1,35	2,19	1,71	2,25
GLY	0,51	0,56	0,63	0,7	0,18	0,63	1,19	0,38	1,89
THR	1,33	1,68	1,70	1,66	3,27	1,25	3,22	0,83	2,00
ARG	1,43	2,63	2,58	1,53	1,54	0,92	1,47	0,7	1,87
ALA	0,36	2,12	2,49	1,75	2,40	0,87	1,79	0,79	3,93
TYR	4,41	0,32	0,70	0,44	0,90	0,33	0,63	0,27	1,76
MET	0,58	0,53	0,87	1,3	0,41	0,75	0,95	0,56	0,68
VAL	5,31	3,03	3,44	2,59	3,68	0,26	3,75	1,07	1,11
PHE	1,27	0,96	1,34	1,18	2,00	0,71	1,01	0,52	0,68
ILE	1,71	2,13	1,82	1,72	1,91	0,82	2,15	0,48	1,17
LEU	1,13	1,79	1,74	1,53	2,54	0,63	1,78	0,39	1,09
LYS	1,26	0,89	1,06	0,97	1,46	0,79	0,99	0,64	0,66
GABA	0,43	1,54	1,65	1,99	2,18	0,82	1,96	1,25	3,18
Outros	1,74	1,66	0,85	0,46	1,16	1,59	1,46	2,01	2,15
(μmol/mL)									
ALT	11,98	8,25 a	7,73 a	4,93 a	4,19 b	5,86 a	3,52 b	4,19 a	3,36 a
NO_3^-	nd	12,49 a	2,30 b	9,35 a	4,93 b	15,16 a	2,54 b	17,96 a	1,56 b

V representa o estágio de desenvolvimento vegetativo das plantas (Fehr *et al.*, 1971) no qual a transferência foi realizada

* Plantas mantidas em vermiculita, sem adição de solução nutritiva, aos 11 DAS

nd - não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

3.2. Compostos nitrogenados da seiva do xilema e floema, raízes e folhas de plantas não-noduladas transferidas para hidroponia

Utilizando plantas não-noduladas no estágio V3, a investigação do comportamento dos aminoácidos no sistema experimental foi estendida para os demais tecidos da planta, como primeiro passo na tentativa de explicar os motivos da alteração na razão ASP/ASN na seiva do xilema. Nas Tabelas 2, 3 e 4 estão apresentados os teores de ALT na seiva do xilema, floema, raízes e folhas de plantas não-noduladas em estágio V3, mantidas em vermiculita com NO_3^- (V+N) e quatro dias após a transferência para hidroponia com aeração contínua e solução sem NO_3^- (H-N).

Na seiva do xilema de plantas em H-N confirmou-se a ocorrência de forte aumento de ASP e reduções nas concentrações de ASN, ALT e NO_3^- constatada nos experimentos anteriores. Observou-se, também, redução na concentração de GLN, juntamente com pequenos aumentos nas concentrações de GLU, SER, ALA e GABA. Na seiva do floema, ao contrário da seiva do xilema, verificou-se redução na concentração de ASP, acompanhada por intensa redução da ASN e do GLU. SER, GLN e ALA tenderam a aumentar em plantas mantidas em H-N, enquanto GABA teve sua concentração pouco afetada com a transferência (Tabela 2). Uma vez que ASP tende a diminuir com a transferência das plantas para H-N provavelmente não é a reciclagem para raízes a grande responsável pelo grande aumento na concentração deste aminoácido na seiva do xilema.

Nas raízes, verifica-se pequeno aumento do teor de ASP, e forte redução da ASN. GLU, SER, GLN, ALA, GABA, aumentaram discretamente com a transferência das plantas para H-N quando comparados com plantas mantidas em V+N (Tabela 3).

Tabela 2. Composição de aminoácidos, teores de ALT e NO_3^- na seiva do xilema e floema de soja não-nodulada da cultivar IAC 17 em V3, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em V+N e transferidas ou não para H-N, por um período de quatro dias.

	Xilema		Floema	
	V+N	V+N	V+N	V+N
	V+N	H -N	V+N	H -N
(mol %)				
ASP	4,67	32,30	25,27	20,37
GLU	0,37	1,67	18,60	11,27
ASN	70,60	31,47	18,07	6,20
SER	2,20	4,23	8,50	16,27
GLN	6,80	3,57	0,90	1,97
ALA	0,80	1,80	3,47	5,03
GABA	0,63	3,27	5,43	4,73
Outros	13,93	21,69	19,77	34,17
($\mu\text{mol/mL}$)				
ALT	4,04 a	1,36 b	nd	nd
NO_3^-	11,84 a	0,68 b	nd	nd

nd - não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 3. Composição de aminoácidos, teores de ALT e NO₃⁻ nas raízes de soja não nodulada da cultivar IAC 17 em V3, após a transferência para hidroponia. Planta cultivadas em V+N e transferidas ou não para H-N, por um período de quatro dias.

	Raízes	
	V+N	V+N
	V+N	H-N
	(mol %)	
ASP	15,78	18,35
GLU	13,16	15,36
ASN	27,63	9,98
SER	5,85	8,57
GLN	6,26	8,23
ALA	6,52	9,72
GABA	5,74	8,59
Outros	19,06	21,20
	(μmol g/MF)	
ALT	0,21 a	0,19 a
NO₃⁻	31,75 a	4,78 b

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 4. Composição de aminoácidos, ALT e NO₃⁻ nas folhas de soja não-nodulada da cultivar IAC 17 em V3, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em V+N e transferidas ou não para H-N, por um período de quatro dias.

	Folha 2		Folha 3	
	V+N	V+N	V+N	V+N
	V+N	H -N	V+N	H -N
(mol %)				
ASP	9,31	7,89	5,95	5,24
GLU	4,98	3,38	2,74	3,15
ASN	12,88	0,56	18,02	5,36
SER	4,39	4,80	4,57	6,16
GLN	8,30	1,72	5,61	3,07
ALA	6,12	4,73	6,24	6,17
GABA	42,11	63,54	42,46	57,95
Outros	11,90	13,38	14,40	12,90
(μmol/mL)				
ALT	15,07 a	6,59 b	14,96 a	6,23 b
NO₃⁻	59,92 a	0,61 b	51,27 a	0,77 b

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Nas plantas não-noduladas a principal fonte de N foi o NO_3^- presente na solução nutritiva “+N” (15 mM de NO_3^-) adicionada a vermiculita. Após ter sido absorvido pela planta, NO_3^- pode estar sujeito à redução imediata e assimilação à forma orgânica no tecido radicular, ou transportados através do xilema para as folhas. NO_3^- também pode ser armazenado em vacúolos, antes da redução ou transporte. Aminoácidos podem ser sintetizados em raízes e transportado pelo xilema para parte aérea em desenvolvimento, ou sintetizados no tecido foliar e transportados pelo floema para os drenos, como sementes ou ápice em desenvolvimento (Lea & Ireland, 1999). A concentração de NO_3^- encontrada na seiva do xilema foi cerca de 3 vezes superior à concentração de ALT encontradas na seiva do xilema das plantas não-noduladas mantidas em vermiculita recebendo solução nutritiva com NO_3^- (Tabela 2), indicando que boa parte do NO_3^- seria reduzido posteriormente na parte aérea da planta. Soja e outras espécies leguminosas tropicais, tendem a conduzir uma proporção substancial e constante da assimilação do seu NO_3^- (aproximadamente 60 %) na parte aérea independente da concentração externa de NO_3^- (Andrews, 1986).

Após a transferência para H-N a concentração de NO_3^- e ALT na seiva do xilema das plantas foi reduzida, sugerindo o esgotamento do NO_3^- no sistema (Tabela 2).

Nas plantas mantidas em V+N a ASN sempre foi o aminoácido transportado em maior quantidade na seiva do xilema das plantas (Tabela 2). O teor de ASP na seiva do xilema aumentou após a transferência das plantas H-N. Ao mesmo tempo, houve redução nas concentrações de ASN e de GLN, apesar da concentração de GLN encontrada ser muito baixa. McClure & Israel (1979) também observaram que em plantas de soja dependente de NO_3^- como fonte de N o teor de GLN encontrado no xilema também foi baixo. Ocorreram, também, pequenos aumentos nas proporções de ALA e GABA na seiva do xilema de plantas em H-N quando comparadas com plantas em V+N.

A concentração de ALT das raízes foi pouco alterada com o tratamento, enquanto a concentração de NO_3^- sofreu redução (Tabela 3). Com relação ao teor de ASP, pode-se inferir que a mudança no xilema seria reflexo da alteração da proporção de aminoácidos das raízes.

Observou-se que na seiva do xilema e floema e nas raízes ocorreu um incremento na razão ASP/ASN entretanto, apenas na seiva do floema esta mudança não foi acompanhada pelo aumento de ASP (Tabelas 2 e 3).

A idéia de que parte do ASP presente na seiva do xilema das plantas em H-N pudesse ser retranslocado para raízes via floema, ou seja, não ser originado diretamente do metabolismo das raízes ou nódulos, parece improvável, porque em plantas tratadas a proporção de ASP no floema tendeu a diminuir em plantas não-noduladas (Tabela 2).

Na Tabela 4 estão apresentados a composição e teor de ALT e NO_3^- da 2ª e 3ª folha a partir da base de plantas não-noduladas em V+N e em plantas transferidas para H-N por quatro dias. ASP, GLU e ALA sofreram poucas alterações nas duas folhas após a transferência para hidroponia. ASN e GLN sofreram reduções nos seus teores enquanto que, GABA sofreu aumento acentuado após a transferência para H-N.

Ocorreram decréscimos nos teores de ALT e NO_3^- das folhas das plantas transferidas para hidroponia quando comparadas com folhas de plantas mantidas em vermiculita recebendo solução com N mineral (15 mM N- NO_3^-) (Tabela 4), aparentemente um reflexo das alterações no fornecimento de N pela seiva do xilema.

É importante considerar que o aumento de GABA foi apenas em proporção, uma vez que a concentração de ALT caiu pela metade, significando que em termos absolutos GABA também diminuiu, mas bem menos que os outros aminoácidos (Tabela 4).

Quando se compara o efeito da transferência das plantas não-noduladas para H-N, nas folhas (Tabela 4) e na seiva do xilema (Tabela 2), observou-se que o aumento de GABA nas folhas pode ser explicado em parte pela redução das amidas, ASN e GLN, o que concorda com

a redução destes aminoácidos na seiva do xilema das plantas após a transferência para H-N. Por outro lado, ASP diminuiu nas folhas com a transferência para H-N, enquanto ASP tendeu a aumentar acentuadamente na seiva com a transferência das plantas para H-N.

É difícil de explicar a alta proporção de GABA (cerca de 42 % nas duas folhas encontrada nas plantas controle, uma vez que este aminoácido não é incorporado em proteínas (Vance & Heichel, 1991). Além disso, a maioria dos relatos feitos sobre este aminoácido apontam sua relação com condições de estresse, tais como: hipoxia (Reggiani *et al.*, 1988) baixa temperatura (Wallace *et al.*, 1984), choque térmico (Johnson *et al.*, 1995), aplicação de ácido abscísico (Reggiani *et al.*, 1993) e pH (Carrol *et al.*, 1994). A concentração de GABA no xilema foi em média 0,6 %, de ASN 70 %, de GLN 10 %, de GLU de 0,4 % e de ASP 5 % (Tabela 2). No floema encontrou-se em média 5,4 % de GABA, 18,06 % de ASN, 0,9 % de GLN, 18,6 % de GLU e de 25 % de ASP (Tabela 2). Assim muito pouco GABA chega na folha via xilema e pouco GABA é remobilizado para raízes, via floema. Em folhas de tremoço (McNeil, 1979) e tomate (Die, 1963) também foi encontrada grande quantidade de GABA, que também não pôde ser relacionado com os exsudatos do xilema e floema.

Os resultados obtidos permitiram comparações das alterações da seiva do xilema com a seiva do floema, raízes e nódulos, e mostraram que o aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema após a transferência para hidroponia foi devido ao aumento de ASP e redução da ASN apenas nas raízes. Na seiva do floema e folhas ocorreram apenas reduções dos teores de ASN. Portanto, uma mudança no metabolismo de ASN nas raízes parece ser a explicação mais provável para o aumento na razão ASP/ASN na seiva do xilema.

3.3. Atividade de enzimas do metabolismo de asparagina em raízes de plantas não-noduladas transferidas para hidroponia sem nitrogênio

Tendo em vista a provável contribuição das raízes nas alterações no transporte de ASP e ASN na seiva do xilema em condições de deficiência de N em hidroponia, o próximo passo foi verificar a atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo destes aminoácidos. Foram estudadas as enzimas AAT, GOT, PEPcase e ASNase (Figura 1). A enzima AS também foi estudada, porém a atividade desta enzima foi muito baixa nas raízes (Capítulo 1).

As atividades da AAT e GOT representam a atividade da AAT/GOT em dois sentidos, formação do GLU e ASP, respectivamente. A enzima catalisa a transaminação reversível do ASP e 2-oxoglutarato para formar oxalacetato e GLU. Os substratos da AAT estão centralizados no metabolismo do carbono/nitrogênio das células (Stephens *et al.*, 1998) e, portanto, possuem numerosas funções metabólicas. Na assimilação da amônia, a enzima AAT é responsável pela produção de ASP a partir do GLU produzido pelo sistema GS/GOGAT (Ireland & Joy, 1990). O ASP formado pode dar origem a outros aminoácidos protéicos pela ação de outras transaminases ou servir de substrato para biossíntese de ASN. Para síntese de ASP, além de GLU é necessário AOA, que é produzido pela PEPcase, por meio da carboxilação C/N, produzindo esqueletos carbônicos para síntese de aminoácidos.

A asparaginase é outra enzima chave no metabolismo de ASN, sendo responsável pela hidrólise de ASN em ASP e NH_4^+ (Ireland & Joy, 1990).

As atividades de AAT e GOT sofreram reduções nas raízes de plantas transferidas para H-N em relação às plantas em V+N (Figuras 1A e 1B). A atividade da AAT sofreu redução somente no terceiro dia após a transferência, enquanto que a atividade da enzima GOT sofreu redução logo no segundo dia (Figuras 1A e 1B).

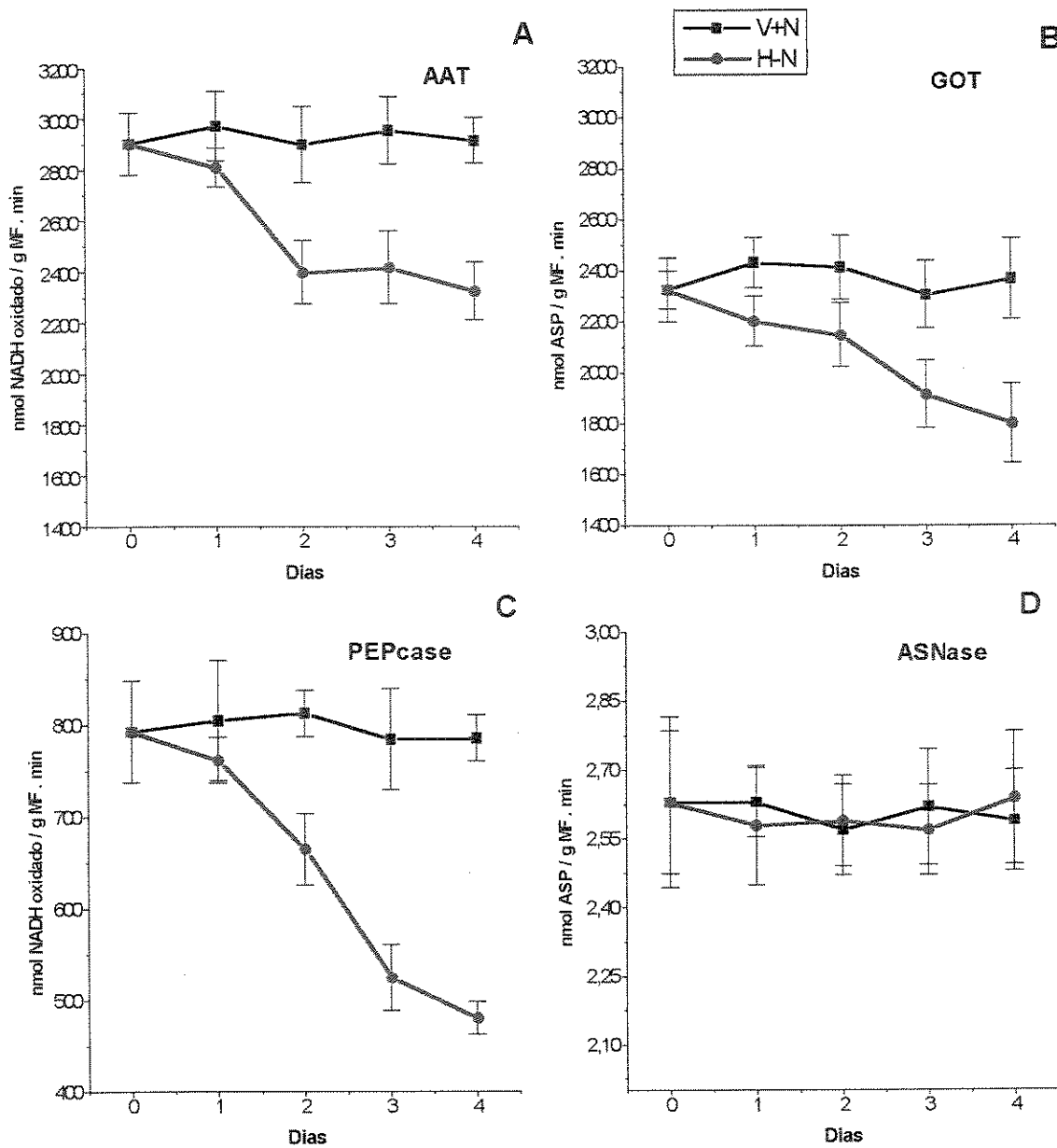


Figura 1. Atividade das enzimas (A) AAT, (B) GOT, (C) PEPcase e (D) ASNase em extrato de raízes de soja não-nodulada (cultivar IAC 17 em V3), cultivada em V+N e após a transferência ou não para H-N. Barras = Erro padrão, n=4.

A enzima PEPcase em raízes também apresentou decréscimo na atividade em plantas transferidas para H-N quando comparadas com plantas mantidas em V+N (Figura 1C). Entretanto, essa redução foi observada somente no terceiro dias após a transferência.

A atividade da enzima ASNase (Figura 1D) em raízes não se alterou após a transferência das plantas para H-N.

Conclui-se que nenhuma dessas enzimas parece ser responsável pelas alterações no transporte de ASP e ASN pelo xilema. Pelo contrário, a queda na atividade de PEPcase deveria prejudicar a formação de ASP em função da menor produção de AOA.

Os dados referentes ao transporte de compostos nitrogenados na seiva do xilema das mesmas plantas usadas no estudo com enzimas estão apresentados na Tabela 5. A mudança na razão ASP/ASN na seiva do xilema, quatro dias em H-N, está de acordo com os experimentos anteriores e mostra repetibilidade do sistema experimental. Neste experimento os dados sobre a composição em aminoácidos vão além dos experimentos anteriores e acrescentam informações sobre sua evolução no tempo. A transferência das plantas para H-N causou alterações gradativas na proporção de ASN e ASP, iniciadas a partir do segundo dia da transferência das plantas (Tabela 5). Uma cinética semelhante foi observada para concentrações de NO_3^- (Figura 2A) e de ALT (Figura 2B) na seiva do xilema das plantas, ou seja, reduções ocorreram 2 dias após a transferência das plantas para H-N. Redução gradativa do NO_3^- transportado na seiva do xilema pode representar a mobilização e esgotamento de NO_3^- armazenado nas raízes da planta. Desta forma, a mudança na razão ASP/ASN inicia com os primeiros sinais de esgotamento do NO_3^- endógeno.

Tabela 5. Composição de aminoácidos da seiva do xilema de soja não-nodulada da cultivar IAC 17 no estágio V3, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em vermiculita V+N e transferidas ou não para H-N durante quatro dias.

	1 dia		2 dias		3 dias		4 dias	
	V +N	H -N	V +N	H -N	V +N	H -N	V +N	H -N
(mol %)								
ASP	2,44	4,30	1,63	10,27	1,55	15,73	3,49	35,85
GLU	1,18	2,40	1,00	2,76	2,33	1,23	1,48	2,67
ASN	72,49	72,45	79,05	54,53	74,39	41,76	75,48	33,25
SER	1,12	2,73	0,90	3,69	1,68	4,79	1,09	3,85
GLN	9,58	3,75	9,10	4,58	7,18	5,13	5,74	2,70
ALA	0,74	0,93	0,49	2,46	0,59	2,05	0,86	1,55
GABA	0,70	1,00	0,83	5,58	0,80	1,10	0,52	2,56
Outros	11,76	12,43	7,00	16,13	11,49	28,21	11,35	17,58

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

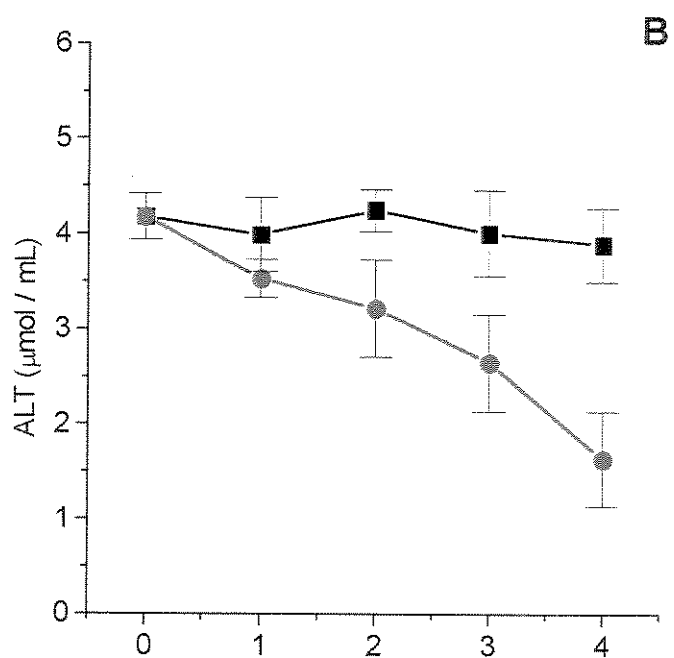
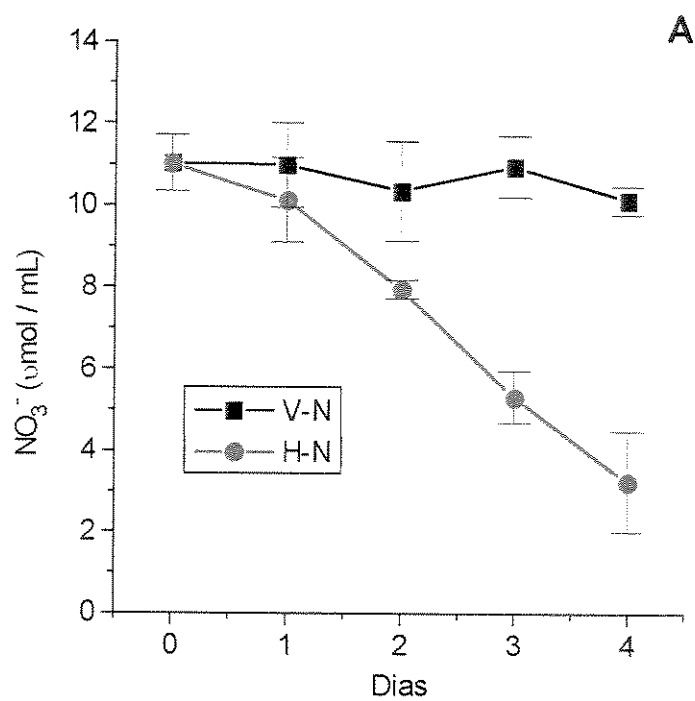


Figura 2. Concentrações de NO_3^- (A) e ALT (B) na seiva do xilema de soja não-nodulada da cultivar IAC 17 no estágio V3, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em V+N e transferidas ou não para H-N durante quatro dias. Barras = Erro padrão, $n=4$.

3.4. Compostos nitrogenados na seiva do xilema e raízes de plantas não-noduladas transferidas para hidroponia com e sem nitrogênio, seguida da adição de solução com 5 mM de NO_3^- em plantas que receberam solução sem nitrogênio

Com o objetivo de verificar se a planta de soja não-nodulada após passar por período com baixa concentração de ASN (H-N) e alta concentração de ASP no xilema, poderia recuperar a concentração de ASN no xilema, foi feita adição de 5 mM de NO_3^- (solução “+N” 1/3 diluída) na solução nutritiva das plantas mantidas em hidroponia quatro dias sem N. Ao mesmo tempo, como controle, plantas removidas da V+N foram transferidas para hidroponia contendo 5 mM de NO_3^- (H+N), e a solução renovada após quatro dias. Com isto, pretendia-se verificar se a alteração da razão ASP/ASN na seiva do xilema é causada pela mudança no sistema de cultivo. Os resultados obtidos para composição da seiva do xilema são apresentados na Tabela 6. São três tratamentos, o primeiro, V+N, diz respeito às plantas mantidas em vermiculita cultivadas com 15 mM de NO_3^- , o segundo, H-N/H+N, plantas transferidas para hidroponia sem N e depois adicionado 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva e o terceiro, H+N, plantas transferidas diretamente para hidroponia em solução com 5 mM de NO_3^- .

Como pode ser observado (Tabela 6, H-N), o aumento de ASP foi gradativo, e só começou a ocorrer no segundo dia após a transferência das plantas da hidroponia sem N. Ao final de quatro dias na hidroponia sem N, as plantas apresentavam cerca de 33 % ASP contra 21 % de ASN no xilema. Um dia após a adição do NO_3^- (Tabela 6, H-N/H+N 5 dias) houve plena recuperação da concentração de ASN, que aumentou para 67 % enquanto a concentração de ASP decresceu para 8 %. ASP continuou decrescendo com o tempo, após a adição do NO_3^- .

Tabela 6. Composição de aminoácidos (mol %) na seiva do xilema de soja não-nodulada da cultivar IAC 17 no estágio V3, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em vermiculita V+N e transferidas ou não para H-N.

	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias
	V +N	V +N	V +N	V+N	V+N	V +N	V +N	V +N
ASP	2,77	3,54	3,25	5,15	4,33	3,12	4,98	3,47
GLU	1,07	0,99	1,20	0,56	0,98	1,05	0,95	0,89
ASN	69,05	68,75	70,72	69,50	71,25	69,78	70,12	69,78
SER	8,50	6,32	7,35	5,55	4,69	5,20	4,36	5,63
GLN	5,84	3,24	4,72	4,60	3,25	4,61	3,16	4,65
ALA	0,89	1,40	1,20	0,61	2,10	1,02	2,01	1,75
GABA	0,45	0,60	0,80	0,65	1,00	0,87	0,78	0,64
Outros	11,42	15,16	10,76	13,38	12,40	14,35	13,64	13,19
	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias
	H -N	H -N	H -N	H -N	H +N	H +N	H +N	H +N
ASP	5,35	11,19	13,81	33,17	8,06	7,24	5,12	3,49
GLU	2,78	2,57	4,69	7,27	1,75	1,30	0,96	0,40
ASN	70,27	58,77	48,08	21,00	67,44	54,17	59,86	66,58
SER	1,47	1,94	4,20	5,63	2,66	2,05	1,17	0,97
GLN	1,67	2,49	2,43	1,95	2,05	5,93	9,61	7,18
ALA	0,96	1,44	3,12	3,12	0,97	1,20	0,95	0,59
GABA	2,03	4,50	8,09	8,92	1,47	2,29	1,55	1,02
Outros	15,48	17,10	15,57	18,94	15,60	25,82	20,80	19,76
	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias
	H +N	H +N	H +N	H +N	H +N	H +N	H +N	H +N
ASP	2,09	1,78	2,22	1,78	2,10	1,57	1,93	2,11
GLU	1,17	1,25	1,12	1,26	1,63	1,65	1,12	1,32
ASN	80,15	82,33	79,95	81,63	80,75	81,68	80,63	78,63
SER	0,65	1,23	0,78	0,90	0,89	0,94	0,67	0,72
GLN	1,39	1,36	1,20	0,96	1,13	1,40	1,23	1,15
ALA	0,66	0,75	0,69	1,20	0,63	0,78	0,86	0,92
GABA	1,01	1,20	1,15	0,69	0,65	0,69	0,72	0,93
Outros	12,89	10,10	12,89	11,58	12,22	11,29	12,84	14,22

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

Quando plantas foram transferidas H+N não se verificou aumento de ASP e redução da ASN na seiva do xilema, como quando é feita transferência para H-N. Ao contrário, verifica-se que ASN tendeu a aumentar e ASP tendeu a diminuir, quando essas plantas são comparadas com plantas controle (Tabela 6). O que afeta as concentrações destes aminoácidos é a presença ou não do NO_3^- na solução nutritiva. Outro dado importante é que no sistema hidropônico utilizado, mantido sob aeração contínua, foram encontrados valores suficientemente altos de saturação O_2 , capazes de manter bom nível de O_2 disponível para raízes da planta (83,4 e 84,2 %, para solução sem N e com N, respectivamente). Por esses valores pode-se observar que a presença ou ausência de NO_3^- na solução nutritiva não afeta a saturação de O_2 .

A concentração de NO_3^- na seiva do xilema das plantas transferidas para H-N declinou rapidamente até o terceiro dia após a transferência, mantendo-se constante no quarto dia (Figura 3A), provavelmente em função da ausência do NO_3^- na solução nutritiva. Após a adição do NO_3^- , houve um rápido aumento do NO_3^- na seiva do xilema das plantas, mas somente depois de dois dias a concentração do NO_3^- atingiu a concentração de V+N.

No tratamento H+N, nos primeiros quatro dias após a transferência, a concentração de NO_3^- na seiva do xilema foi superior às concentrações em V+N (Figura 3A). É possível que a disponibilidade de NO_3^- no sistema hidropônico tenha sido inicialmente maior do que na vermiculita, embora isto não refletir no teor de NO_3^- nas raízes (Figura 4A).

A composição de aminoácidos nas raízes de plantas dos tratamentos V+N, H-N/H+N e H+N estão apresentadas na Tabela 7. No tratamento H-N/H+N, ocorreu aumento de ASP e uma diminuição do teor de ASN das raízes das plantas durante o período da ausência de NO_3^- . A redução do teor de ASN iniciou-se no terceiro dia após a transferência, contrário do xilema (Tabela 6), cuja redução ocorreu já no segundo dia da transferência. Após adição de NO_3^- ocorreu aumento imediato do teor de ASN e decréscimo do teor de ASP, atingindo os níveis

de V+N logo no primeiro dia (Tabela 7), semelhante aos dados para recuperação na seiva do xilema (Tabela 6).

No tratamento H+N o teor de ASN manteve-se mais alto que em V+N nos dois primeiros dias após a transferência, talvez em função da maior absorção de NO_3^- , indicada pelos dados do xilema (Tabela 7). Depois, o teor de ASN manteve-se próximo de V+N. O teor de ASP neste tratamento não sofreu alterações.

O teor de NO_3^- das raízes no tratamento H+N não diferiu do controle (V+N) em nenhum dos tempos estudados (Figura 4A). No tratamento H-N/H+N, no período de ausência de NO_3^- na solução nutritiva (H-N), houve queda gradativa e acentuada do teor de NO_3^- das raízes e no primeiro dia após o retorno do NO_3^- na solução nutritiva (H-N/H+N 5d), houve praticamente completa recuperação do teor deste composto nas raízes (Figura 4A).

Os teores de ALT das raízes não apresentaram nenhuma variação claramente associada aos tratamentos além disso, as grandes variações com o tempo dificultam uma interpretação mais segura (Figura 4B).

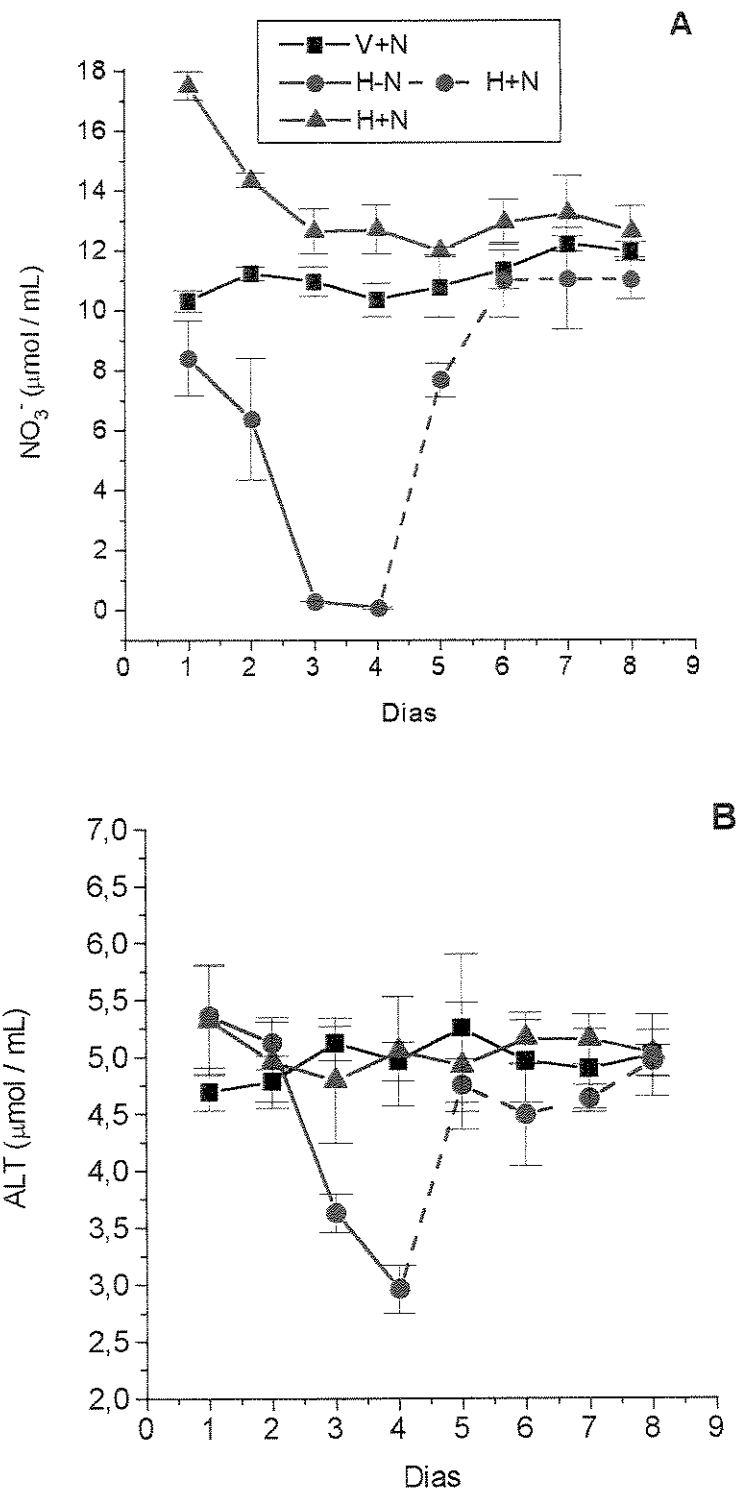


Figura 3. Concentração de NO_3^- (A) e ALT (B) na seiva do xilema de soja não-nodulada da cultivar IAC 17 no estágio V3, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em V+N, transferidas ou não para H-N e com solução com NO_3^- (H+N). Barras = Erro padrão, n=4.

Coletivamente, baseado nas atividades enzimáticas e nos teores dos compostos nitrogenados na seiva do xilema pode-se levantar uma hipótese para a forte redução da concentração de ASN e aumento de ASP. Com a redução gradativa dos teores de NO_3^- nas raízes e das concentrações de ALT e NO_3^- na seiva do xilema das plantas após a transferência para hidroponia sem N, é possível que ocorra decréscimo na assimilação da amônia oriunda da redução do NO_3^- e NO_2^- . Tal situação é plausível, mesmo não tendo ocorrido redução significativa do teor de ALT nas raízes. Isto porque mesmo nas plantas controle, os teores destes compostos são muito baixos, indicando que os produtos da assimilação de NO_3^- são rapidamente transferidos para o xilema. O discreto aumento no teor de ASP e diminuição da ASN nas raízes das plantas em H-N, comparados com as alterações marcantes na seiva do xilema também indicam um processo seletivo e eficiente na transferência de aminoácidos para o xilema. Pelos dados obtidos do floema (Tabela 2), a contribuição da reciclagem de aminoácidos da parte aérea parece ser mínima, o que reforça a importância do fenômeno no processo assimilatório nas raízes. Os dados das enzimas PEPcase e GOT (ambas relacionadas com a síntese ASP) mostram uma queda nas atividades em condições onde ASP aumenta, sugerindo que este aumento em ASP não é simplesmente resultante de aumento na formação de ASP. São duas as alternativas básicas para explicar o aumento na razão ASP/ASN pela alteração no metabolismo de ASN: menor síntese ou maior degradação. Como a atividade da ASNase não mudou, sugere que não envolva degradação. Infelizmente, evidências diretas para menor síntese não foram obtidas, pois não foi possível quantificar a atividade da AS nas raízes devido sua baixa atividade (Capítulo 1), embora no nódulo tal declínio tenha sido observado (Capítulo 3). Talvez seja necessário recorrer a técnicas de biologia molecular para obter informações sobre AS nas raízes, pois alterações na expressão do gene para síntese de AS de raízes de soja já foram verificadas através de tais técnicas (Hughes *et al.*, 1997).

Os resultados também nos mostram que todas as alterações ocorridas nas raízes e seiva do xilema são recuperadas rapidamente após a reposição do NO_3^- , sugerindo que as alterações enzimáticas também desapareçam da mesma maneira.

As pequenas alterações ocorridas na planta após a transferência para hidroponia indicam que o simples fato de transferir plantas não-noduladas para hidroponia com NO_3^- não causou nenhum impacto negativo no metabolismo do N das plantas.

4. CONCLUSÕES

ASN foi o principal aminoácido transportado na seiva do xilema das plantas de soja não-noduladas, cultivadas em vermiculita com NO_3^- .

O aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema após a transferência das plantas não-noduladas para H-N foi relacionado com a deficiência de N, com mudanças nestes aminoácidos nas raízes, mas pouco ou nada relacionado com a reciclagem de aminoácidos, e possivelmente, por eliminação de alternativas, com a síntese de ASN a partir de ASP via AS nas raízes.

Houve completa recuperação dos teores de ASN nas raízes e na seiva do xilema rapidamente após adição de NO_3^- à solução nutritiva.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA TRANSFERÊNCIA DE SOJA NODULADA PARA HIDROPONIA SOBRE O TRANSPORTE E METABOLISMO DE NITROGÊNIO

1. INTRODUÇÃO

Leguminosas, como soja, têm a capacidade de adquirir N de duas fontes distintas: N inorgânico, presente na solução do solo, e N₂ atmosférico, por meio da simbiose com rizóbios. (Blumenthal *et al.*, 1997).

Na simbiose entre leguminosas e rizóbios ocorre uma complexa interação na qual a bactéria infecta as células da planta dentro de um tecido central de um órgão especializado, o nódulo. A bactéria oxida açúcares fornecidos pela planta para fixar N₂, transferindo a NH₄⁺ produzida para o citossol das células infectadas da planta (Atkins *et al.*, 1992), onde é incorporada a aminoácidos, e estes podem, dependendo do tipo de planta, ser transformados em ureídeos.

Em soja, cerca de 70-90 % do N fixado pelo nódulo é transportado na seiva do xilema para parte aérea na forma de ureídeos, ácido alantoico e alantoína (McClure & Israel, 1979; Streeter, 1979). URE são formados a partir da oxidação das bases purinas, xantina e hipoxantina, que são derivadas da síntese *de novo* dos nucleotídeos purínicos (Atkins *et al.*, 1980b). O restante do N transportado via xilema em grande parte via xilema na forma de ASN. GLN também pode ser transportada em quantidades relativamente grandes na seiva do xilema de plantas noduladas (McClure & Israel, 1979).

Foi observado que a transferência de plantas noduladas cultivadas em vermiculita sem N (V-N) para hidroponia (H-N) causa um forte aumento na razão ASP/ASN e redução na concentração de URE na seiva do xilema (Puiatti & Sodek, 1999). Os objetivos deste estudo foram: verificar se o aumento da razão ASP/ASN está relacionado com a eficiência da fixação de N; verificar se está associado a alterações nos compostos nitrogenados da seiva do floema, raízes, nódulos e folhas da planta; verificar se o aumento, é consequência da alteração das atividades de enzimas, AAT, PEPcase, ASNase e AS; verificar se as alterações enzimáticas

estão relacionadas com a composição da seiva do xilema, das raízes e dos nódulos da planta; e verificar se os teores de ASN e ASP podem ser recuperados com os tratamentos de replantio em vermiculita e adição de NO_3^- .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação em condições naturais de luz e temperatura. Para tal, sementes de soja (*Glycine max* (L.) cv. IAC-17) foram colocadas para germinar diretamente em vasos plásticos contendo 3 L de vermiculita. Foram colocados pratos sob os vasos, para reter pequena quantidade de água ou solução nutritiva.

As plântulas foram inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 (=SEMIA 5019), mantida originalmente pelo Instituto Agronômico de Campinas e multiplicado posteriormente no nosso laboratório em condições adequadas, utilizando-se o meio de cultura Norris & Date (1976). As inoculações foram feitas três vezes seguidas, a cada dois dias, com 2 mL de meio líquido em torno do colo da planta, a partir de V0 (Fehr *et al.*, 1971), sendo que logo em seguida, foram distribuídos 50 mL de água deionizada por vaso para espalhar o inóculo.

As soluções nutritivas sem N (-N) e com N (+N) foram preparadas baseadas na solução de Hoagland & Arnon (1950). Durante o cultivo, foram fornecidos 250 mL da solução nutritiva -N, duas vezes por semana. No período de deficiência de N (do amarelecimento da planta até início do "enverdecimento"), as plantas receberam 0,15 mM de NO_3^- (10 mL de solução +N por L de solução -N).

Irrigações, quando necessárias, foram realizadas com água de torneira.

No período de outono/inverno, as plântulas, foram mantidas até 14 DAS sob fotoperíodo longo (18 horas luz / 6 horas escuro) para evitar o florescimento precoce. No período do verão, as plântulas a partir do estágio V0 permaneceram 6 dias sob fotoperíodo curto (8 horas luz / 16 horas escuro), para adiantar a indução do florescimento.

Plantas no estágio reprodutivo R2 ou R3 (Fehr *et al.*, 1971) e com nodulação abundante foram transferidas para um sistema de hidroponia. Para este fim, o sistema radicular foi lavado cuidadosamente com água para remover o excesso de vermiculita, três plantas acomodadas em vasos de 3 L, inicialmente com solução nutritiva -N₁ e o sistema mantido sob aeração contínua, por meio de um tubo flexível ligado à tubulação de um compressor de ar.

No período no qual as plantas foram mantidas em hidroponia, somente foram feitas trocas de solução quando houve alteração na concentração do NO₃⁻ de 0 para 5 mM. O volume inicial da solução no vaso foi restabelecido diariamente com a adição de água destilada. O pH da solução foi monitorado com um pHmetro portátil e ajustado para valores de $6,0 \pm 0,2$, com solução H₂SO₄ 1 N.

2.2. Métodos analíticos

2.2.1. Coleta da seiva do xilema

Idem ao item 2.2.1 do Capítulo 2.

2.2.2. Coleta da seiva do floema

Idem ao item 2.2.2 do Capítulo 2.

2.2.3. Coleta, extração e análise dos compostos nitrogenados de raízes, nódulos e folhas

Idem ao item 2.2.3 do Capítulo 2, executando os mesmos procedimentos para o nódulo.

2.2.4. Dosagem de ALT

Idem ao item 2.2.4 do Capítulo 2.

2.2.5. Dosagem de URE totais (URE)

A determinação da concentração de URE na seiva do xilema e dos teores de extrato de raízes, nódulos e folhas foram feitas conforme proposto por Vogels & Van Der Drift (1970). Foi misturado 0,75 mL de cada amostra (seiva do xilema ou extrato adequadamente diluído com água) ou do padrão alantoína (0-100 nmol), em tubos de ensaio, a 0,25 mL de hidróxido de sódio. Os tubos foram agitados, tampados com bolinha de gude e colocados em banho-maria a 100°C por 8 min. Após o resfriamento foram acrescentados 0,25 mL de HCl 0,65 N os tubos agitados, tampados com bolas de gude e colocados novamente em banho-maria a 100°C, por 4 min. Após resfriamento em bancada, adicionou-se 0,25 mL de tampão fosfato 0,4 M, pH 7,0, 0,25 mL de fenilhidrazina 0,33 %, e os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 5 min. Posteriormente, os tubos foram resfriados a 0°C por 5 min, e adicionado: 1,25 mL de HCl concentrado, previamente resfriado a 0°C, e feita agitação dos tubos. Acrescentaram-se, então, 0,25 mL de ferricianeto de potássio e fez-se nova agitação dos tubos. Após 15 min de repouso foi feita a leitura da absorbância a 535nm, sendo feitas três repetições para cada padrão, amostras de seiva ou extrato.

2.2.6. Dosagem de NO₃⁻

Idem ao item 2.2.5 do Capítulo 2.

2.2.7. Separação de aminoácidos livres por HPLC

Idem ao item 2.2.1.3 do Capítulo 1.

2.2.8. Determinação das atividades enzimáticas

2.2.8.1. Extração de enzimas

Para extração de enzimas, primeiramente os nódulos foram lavados com água para retirar a vermiculita, secos com papel absorvente e feita uma seleção com objetivo de evitar utilizar nódulos muito pequenos, ou em senescência (com coloração marron). Após a pesagem, os nódulos foram levados para câmara fria (4°C), onde foi feita maceração com tampão de extração, conforme os procedimentos definidos no item 2.2.7.1 do Capítulo 2.

2.2.8.2. Dosagem da atividade da AAT

Idem ao item 2.2.7.2 do Capítulo 2.

a) Sentido de formação do GLU (AAT)

Idem ao item 2.2.7.2 a do Capítulo 2, utilizando-se nódulos e 50 µL de extrato protéico dessalinizado no ensaio.

b) Sentido de formação de ASP (GOT)

Idem ao item 2.2.7.2 b do Capítulo 2, utilizando-se nódulos e 50 µL de extrato protéico dessalinizado no ensaio.

2.2.8.3. Dosagem da atividade da PEPcase

Idem ao item 2.2.7.3 do Capítulo 2, utilizando-se nódulos e 75 µL de extrato protéico dessalinizado no ensaio.

2.2.8.4. Dosagem da atividade da ASNase

Idem ao item 2.2.7.4 do Capítulo 2, utilizando-se nódulos e 500 μ L de extrato protéico dessalinizado no ensaio.

2.2.8.5. Dosagem da atividade da AS

A extração foi feita conforme definido no item 2.2.2.1 do Capítulo 1.

A dosagem da atividade da enzima AS seguiu os procedimentos do item 2.2.2.2 do Capítulo 1, entretanto com modificações no meio de reação que passou a ser constituído de 10 mM de GLN, 30 mM de ATP, 10 mM de ASP, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT e 0,1 mM de EDTA, Hepes 50 mM pH 7,75, 400 μ L do extrato dessalinizado, em volume total de 500 μ L.

2.2.8.6. Dosagem de proteínas

Idem ao Capítulo 1 item 2.2.3.

2.3. Nível de Oxigênio

Idem ao item 2.2.8 do Capítulo 2.

2.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Idem a Capítulo 1 item 2.3.

O controle dos experimentos foi sempre plantas mantidas em vermiculita.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Compostos nitrogenados da seiva do xilema em plantas noduladas transferidas para hidroponia em diferentes estádios de desenvolvimento

Com objetivo de estabelecer o estágio mais adequado para se transferir plantas noduladas para hidroponia sem N, foi feito um experimento no qual as plantas foram transferidas para hidroponia em dois estádios reprodutivos distintos, R2 e R3 (Fehr *et al.*, 1971). Neste caso, optou-se por utilizar plantas no estágio reprodutivo porque obedecendo ao sistema de cultivo estabelecido no item 2.1, a planta no estágio reprodutivo já tinha atingido a plena fixação do N.

ASN, seguida de GLN, foram os aminoácidos encontrados em maior concentração na seiva do xilema das plantas noduladas (V-N). A transferência das plantas para hidroponia (H-N) resultou no aumento da concentração de ASP, e diminuição de ASN e GLN, em R2 e R3 (Tabela 1). Ocorreram poucas variações na concentração de ALT, entretanto a concentração de URE foi bastante reduzida após a transferência das plantas, quando comparada com plantas mantidas em vermiculita (Tabela 1).

Em plantas noduladas, a presença de alta concentração de GLN (Amarante & Sodek, dados não publicados) e URE (McClure & Israel, 1979; Streeter, 1979) na seiva do xilema das plantas mantidas em vermiculita indica eficiência na fixação do N. A transferência das plantas para H-N levou a redução na fixação do N, evidenciada pela menor concentração de GLN e URE na seiva do xilema (Tabela 1). O aumento de ASP pode ser explicado pela queda nas concentrações de ASN e GLN. A redução na concentração da GLN foi maior do que na da ASN, tanto em R2 quanto em R3 (Tabela 1).

Os resultados mostraram que assim como em plantas de soja não-noduladas (Capítulo 2, Tabela 1), o aumento de ASP na seiva do xilema de plantas de soja noduladas é independente do estágio de desenvolvimento em que a transferência foi realizada (Tabela 1).

O estágio R2 foi escolhido para a transferência das plantas para H-N. Apesar de que nesse estágio as plantas apresentarem massa radicular muito grande, dificultando a lavagem e a retirada dos nódulos, é garantida alta taxa de fixação do N₂.

3.2. Compostos nitrogenados da seiva do xilema e floema, raízes e folhas de plantas noduladas transferidas para hidroponia

Utilizando-se plantas noduladas no estágio R2, a investigação do comportamento dos aminoácidos no sistema experimental foi estendida para os demais tecidos da planta, como passo seguinte na tentativa de explicar os motivos da alteração na razão ASP/ASN na seiva do xilema. Os efeitos da transferência de plantas de soja noduladas (V-N) em R2 para hidroponia com aeração sem NO₃⁻ (H-N) nos compostos nitrogenados da seiva do xilema, floema, raízes, nódulos e folhas, são apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

Os dados da seiva do xilema confirmaram os resultados obtidos anteriormente. Primeiro, que em plantas de soja noduladas em V-N, o aminoácido mais transportado na seiva do xilema foi ASN, seguido de GLN e ASP (Tabela 2); segundo, que a transferência destas plantas para H-N resultou em reduções nos teores de ASN e GLN, e aumentos nos teores de ASP, ALA e GABA; e terceiro, que a concentração de URE sofreu redução com a transferência das plantas para hidroponia (Tabela 2).

Tabela 3. Composição de aminoácidos, teores de ALT e URE em raízes e nódulos de soja nodulada da cultivar IAC 17 no estágio R2, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em V-N e transferidas ou não para H-N por um período de quatro dias.

	Raízes		Nódulos	
	V -N	V -N	V -N	V -N
	V -N	H -N	V -N	H -N
(mol %)				
ASP	16,17	18,15	7,35	8,96
GLU	15,95	16,58	16,25	19,25
ASN	17,82	6,85	18,13	4,75
SER	10,45	6,17	11,35	10,13
GLN	7,78	3,63	1,15	0,93
ALA	7,38	9,25	10,18	15,65
GABA	9,12	12,13	14,45	17,01
Outros	15,33	27,24	21,14	23,32
(μmol/g MF)				
ALT	3,14 a	1,17 b	21,43 a	19,97 a
URE	2,16 a	1,78 a	3,54 a	3,05 a

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada)

Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Em plantas noduladas ASP, GLU, ASN e SER foram os aminoácidos presentes em maiores proporções na seiva do floema (Tabela 2). Após o tratamento, os teores de ASP, GLU e ASP sofreram reduções e o de SER sofreu aumento. O mesmo ocorreu em plantas não-noduladas (Capítulo 2, Tabela 2). Assim, fica evidente a importância desses aminoácidos para a redistribuição do N entre as diferentes partes das plantas, independente do processo de assimilação de N em funcionamento. Curiosamente, na seiva do floema das plantas não-noduladas e noduladas a proporção de GLN foi baixa (Tabelas 2, Capítulo 2 e 3). Na seiva do floema de *L. albus*, ASN e GLN constituem 50 % do N e outros 50 % restantes é representado por uma ampla faixa de aminoácidos incluindo SER, ASP, GLU, VAL, ILE, LYS, LEU, PHE (Pate *et al.*, 1979; Parsons & Baker, 1996). Noutro estudo, Pate (1989) também encontrou alto teor de GLN no floema, e relatou que a distribuição de compostos nitrogenados no floema de *L. albus* foi similar à do xilema, mas com concentração superior (10-15 vezes). Em *Triticum aestivum* o GLU foi o aminoácido mais abundante da seiva do floema (Caputo & Barneix, 1997). Portanto, a diferença na proporção de GLN e outros aminoácidos transportados pela seiva do floema pode ser uma característica da espécie da planta.

Nas raízes, os aminoácidos ASN, ASP, GLU e SER apresentaram-se em maiores proporções (Tabela 3). Com a transferência para hidroponia ocorreram diminuições nos teores de ASN, GLN e SER, juntamente com aumento do ASP, GLU, ALA e GABA. A transferência para H-N provocou grande redução na concentração de ALT entretanto, a concentração de URE no sistema de radicular não foi alterada. Raízes das plantas noduladas de *Sesbania rostrata* também apresentaram proporções relativamente altas de ALA e GABA (Godber & Parsons, 1998).

Nos nódulos de plantas transferidas para H-N ocorreram incrementos em ASP, GLU, ALA e GABA, e decréscimo de ASN, quando comparados com plantas em V-N (Tabela 3).

Nos nódulos das plantas V-N e H-N o teor de GLN foi muito baixo e os teores de GABA e ALA foram altos, quando comparados com as concentrações dos mesmos aminoácidos apresentadas pela seiva do xilema (Tabelas 2 e 3). Possivelmente, ALA e GABA desempenhem papel específico no metabolismo do nódulo. Os teores de URE e ALT do nódulo não foram alterados com a transferência das plantas para H-N (Tabela 3).

A composição de aminoácidos presentes na segunda, quinta e sétima folhas a partir da base, de plantas noduladas em V-N e quatro dias após a transferência H-N são mostradas na Tabela 4. GABA foi aminoácido que apresentou maior redução com a transferência. O teor de ASN foi muito baixo em todas as folhas, sofrendo pequenas variações após o tratamento. Houve aumento do ASP, GLU e SER após a transferência em todas as folhas. ALA diminuiu nas folhas 2 e 5, mas aumentou na folha 7. GLN também teve resposta variada em função da posição da folha na planta.

Com relação ao teor de ALT das folhas, observou-se que nas folhas 2 e 5 não houve diferença nestes compostos após a transferência das plantas para H-N, enquanto na folha 7 ocorreu redução significativa (Tabela 4).

O teor de URE encontrado na folha 2 foi muito baixo, não havendo diferença entre plantas em V-N e em H-N. Nas folhas 5 e 7 houve redução do teor de URE com a transferência para H-N (Tabela 4). Ureídeos são sintetizados pelos nódulos e transportados para a parte aérea via xilema, onde são degradados, e o N incorporado em aminoácidos (Valdez & Sinclair, 2000).

Para ALT nas plantas em V-N, houve aumento do teor da folha 2 até a 7, enquanto que para URE, o teor da folha 2 foi menor do que das folhas 5 e 7, não havendo diferenças entre estas duas últimas (Tabela 4). De um modo geral, a folha 2 coletada para análise estava amarelecida ou seja, já se encontrava em senescência, concordando com os baixos valores URE e ALT estimados nesta folha mesmo nas plantas em V-N (Tabela 4). A folha 5 estava

aumento do ASP, embora em proporções diferentes (Tabelas 2 e 3). Apenas na seiva do floema não houve aumento de ASP, concomitante com decréscimo na ASN (Tabela 2). Entretanto, a mudança da razão ASP/ASN das folhas não mostra relação com a razão da seiva do xilema, principalmente porque o teor de ASN nas folhas é muito baixo, o que significa que este aminoácido não participa diretamente do metabolismo do N neste tecido (Tabela 4).

O mais importante, em termos dos objetivos dos experimentos, foi o grande aumento do teor de ASP na seiva do xilema após a transferência para H-N. Desta forma, o sistema teve o comportamento esperado e permitiu verificar que a origem dessa mudança pode estar associada a raízes e ao nódulo, mas o envolvimento do floema (reciclagem) parece ser pequeno.

3.3. Atividade de enzimas do metabolismo de asparagina em nódulos de plantas transferidas para a hidroponia

Tendo em vista a possível contribuição dos nódulos nas alterações no transporte de ASP e ASN na seiva do xilema em condições de deficiência na fixação de N_2 , o próximo passo na elucidação deste processo foi de verificar o comportamento de algumas enzimas envolvidas no metabolismo desses aminoácidos. Foram estudadas as enzimas AAT, GOT, PEPcase, AS e ASNase.

Houve uma ligeira e gradual redução da atividade da enzima AAT nos nódulos das plantas transferidas para H-N em relação às plantas mantidas em vermiculita (Figura 1A). Para GOT, a redução iniciou-se um dia após a transferência, sendo que posteriormente a atividade se manteve constante (Figura 1B). A atividade da PEPcase diminuiu gradativamente até o terceiro dia, e depois se manteve constante (Figura 1C). A atividade da ASNase em nódulo de soja não foi afetada pela transferência das plantas para H-N (Figura 1D). A atividade da AS foi imediata e drasticamente reduzida com a transferência das plantas noduladas para H-N

(Figura 1E). A redução da atividade desta enzima foi acentuada até o segundo dia e daí por diante permanecendo 29 % abaixo do controle (V-N).

A PEPcase catalisa a carboxilação irreversível do PEP em AOA (Chollet *et al.*, 1996). PEPcase está presente no citossol, sendo 10 a 15 vezes mais ativa em nódulos de alfafa do que em outros órgãos (Vance *et al.*, 1994) e representa 2 % da proteína solúvel dos nódulos (Vance & Stade, 1984). A fixação de CO₂ via PEPcase desempenha um papel significativo nos nódulos de leguminosas pelo fornecimento do carbono para síntese do malato e do ASP (Anderson *et al.*, 1987; Rosendahl *et al.*, 1990). O ASP é formado a partir do AOA como uma das principais formas de exportação de N, enquanto o malato é importado para dentro do bacteróide e rapidamente respirado para o fornecimento de energia para a redução do N₂ (Coker & Schubert, 1981). Foi estimado que 25 % do carbono requerido para atividade da nitrogenase e assimilação do N pode ser suprido pela PEPcase (King *et al.*, 1986). Além destas duas bem estabelecidas funções da PEPcase no nódulo de leguminosas, várias outras têm sido propostas, incluindo a manutenção do balanço de cargas e do pH neutro nos espaços intercelulares e no xilema (Job *et al.*, 1978; Coker & Schubert, 1981), e regulação da barreira difusiva do O₂ (Robinson *et al.*, 1996).

O AOA produzido pela PEPcase, juntamente com GLU, são transformados em 2-oxoglutarato e ASP pela enzima AAT (Ireland & Lea, 1999b). Além da transferência do N, na forma de grupo amino para ASP em nódulos, a enzima apresenta outras funções metabólicas, tal como principal enzima fornecedora do ASP para síntese de outros aminoácidos e proteínas (Ireland & Lea, 1999b). O ASP produzido pela reação pode ser utilizado para biossíntese de ASN.

A ASN pode ser degradada em ASP e NH_4^+ pela enzima ASNase (Ireland & Joy, 1990), enquanto a síntese deste aminoácido é usualmente produzida pela enzima AS, que transfere o grupo amida da GLN para o ASP. A síntese de ASN é particularmente importante para fixação do N em nódulos radiculares de leguminosas (Reynolds *et al.*, 1982), além de ser uma das principais formas de transporte do N em plantas (Lam *et al.*, 1995). Ambos mRNA e atividade da AS aumentam similarmente de 10 a 20 vezes durante o desenvolvimento de nódulos de alfafa (Waterhouse *et al.*, 1996).

A redução da atividade da AS em nódulos de plantas após a transferência H-N, possivelmente pode ser explicada pelo fato de tanto os níveis como a atividade da AS serem regulados pelo *status* de C/N da planta (Lam *et al.*, 1995 e 1996). Os dados obtidos aqui para soja são compatíveis com o papel da enzima AS do nódulo nas mudanças na razão ASP/ASN na seiva do xilema.

Os dados referentes ao transporte de compostos nitrogenados na seiva do xilema das mesmas plantas usadas no estudo com enzimas estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 2. Os teores de ASN e GLN nas plantas em H-N estiveram sempre mais baixos do que nas plantas em V-N. Em contrapartida, o teor de ASP foi sempre alto nas plantas em H-N (Tabela 5). A maior parte das principais mudanças ocorreu no primeiro dia em H-N e é interessante notar que o grande aumento em ASP teve uma queda correspondente em GLN, mas não em ASN. A concentração de URE da seiva do xilema declinou gradativamente após a transferência das plantas para H-N (Figura 2A). Por outro lado, a concentração de ALT decresceu quatro dias após a transferência das plantas para hidroponia (Figura 2B).

3.4. Transferência de plantas noduladas para hidroponia sem N, seguido do replantio em vermiculita

Conforme foi discutido anteriormente, a redução da ASN e o aumento de ASP no xilema das plantas provavelmente estiveram relacionados com a redução da atividade da AS em nódulos. Para confirmar essa hipótese investigou-se se tratamentos capazes de aumentar a concentração de ASN no xilema também afetavam a atividade da AS *in vitro*.

O primeiro tratamento feito para tentar elevar a concentração de ASN e GLN e diminuir a concentração de ASP foi o replantio das plantas noduladas em vermiculita, quatro dias após a transferência para H-N.

A composição da seiva do xilema das plantas mantidas em V-N e de plantas inicialmente mantidas por 4 dias em H-N e depois transplantadas para vermiculita (H-N/R-N) são apresentadas na Tabela 6. Observa-se novamente que a transferência das plantas para H-N resultou em aumento de ASP e redução da ASN e GLN. ASN neste experimento foi reduzida somente 2 dias após o início do tratamento, e GLN diminuiu imediatamente após a transferência das plantas. Após o replantio, ASN e GLN aumentaram gradativamente na seiva do xilema, juntamente com a diminuição do ASP.

A completa recuperação da concentração de URE nas seivas do xilema ocorreu 12 dias após o início tratamento, ou seja, 8 dias após o replantio das plantas (Figura 3A).

A concentração de ALT da seiva do xilema diminuiu inicialmente com a transferência das plantas para H-N, depois se recuperou completamente, oito dias após o início tratamento (Figura 3B).

Nas raízes a transferência das plantas para hidroponia causou decréscimos acentuados nos teores de ASN e GLN, paralelamente ocorreram aumentos nos teores de ALA e GABA (Tabela 7). O replantio em vermiculita causou aumento da ASN, mas não atingindo os valores apresentados pelo controle. Ao mesmo tempo observou-se um decréscimo acentuado na concentração de ASP, que tendeu a permanecer mais baixa que no controle. A concentração de GLN também não foi recuperada após o replantio (Tabela 7).

Não houve grandes variações nos teores de URE nas raízes após a transferência H-N (Figura 4A). ALT das raízes foram reduzidos com a transferência das plantas para H-N, mas com o replantio se recuperaram seis dias após o início do tratamento (Figura 4B).

Nódulos de leguminosas acumulam concentrações relativamente altas de GABA (Vance & Heichel, 1991), podendo atingir em algumas espécies 20 % do conteúdo total de N nesta estrutura (Larher *et al.*, 1983). Este composto pode desempenhar um importante papel no balanço de pH do nódulo (Vance & Heichel, 1991), dado que durante sua síntese via glutamato descarboxilase ocorre consumo de prótons, sendo que a enzima é capaz de operar em pH baixo (Carrol *et al.*, 1994).

Têm sido proposto basicamente duas funções para o GABA, uma que este participaria da regulação do pH citoplasmático sob condições de anaerobiose (Streeter & Thompson, 1972). Outra função é que GABA proporciona uma rota alternativa para biossíntese de succinato, devido à limitação da enzima α -cetoglutarato desidrogenase (Kahn *et al.*, 1985 citado por Ricard *et al.*, 1994). Entretanto, Vance & Heichel (1991) sugeriram uma nova função para o GABA no nódulo, a de atuar como dreno para o H^+ tóxico produzido pela enzima PEPcase que utiliza como substrato HCO_3^- na fixação do CO_2 .

4. CONCLUSÕES

ASN, seguida da GLN foram os principais aminoácidos transportados na seiva do xilema das plantas noduladas, mantidas em V-N.

O aumento da razão ASP/ASN e a redução na concentração de URE na seiva do xilema, após a transferência de plantas noduladas para H-N, foram relacionados à deficiência no processo de fixação do N_2 e com a redução na atividade AS do nódulo (no caso de ASN, uma relação bastante estreita).

Houve recuperação das concentrações de ASN e URE na seiva do xilema e atividade da AS em nódulos após o replantio em vermiculita.

CAPÍTULO 4

EFEITO DA TRANSFERÊNCIA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS PARA HIDROPONIA SEM NITROGÊNIO NO TRANSPORTE DE NITROGÊNIO NA SEIVA DO XILEMA

2.4. Métodos analíticos

2.4.1. Coleta da seiva do xilema

Idem ao item 2.2.1 do Capítulo 2.

2.4.2. Dosagem dos compostos nitrogenados na seiva do xilema

2.4.2.1. Dosagem de ALT

Idem ao item 2.2.4 do Capítulo 2.

2.4.2.2. Dosagem de NO_3^-

Idem ao item 2.2.5 do Capítulo 2.

2.4.2.3. Dosagem de URE

Idem ao item 2.2.5 do Capítulo 3.

2.4.2.4. Separação de aminoácidos livres por HPLC

Idem ao item 2.2.1.3 do Capítulo 1.

2.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Idem a Capítulo 1 item 2.3.

O controle dos experimentos foi sempre plantas mantidas em vermiculita com ou sem N.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da transferência de leguminosas não-noduladas e noduladas para hidroponia sem N no transporte de N na seiva do xilema

. Tremoço

Na Tabela 1 são mostradas a composição e as concentrações de ALT, NO_3^- e URE na seiva do xilema de plantas de tremoço não-noduladas e noduladas, após a transferência H-N. Como se observa, tanto em plantas não-noduladas como em plantas noduladas ocorreu aumento do ASP e reduções da ASN e GLN após a transferência para hidroponia.

Plantas não-noduladas de tremoço apresentaram reduções nas concentrações de NO_3^- e ALT na seiva do xilema após a transferência das plantas para H-N. Nota-se que a concentração de ALT é muito maior do que a concentração NO_3^- nas plantas controle, sugerindo que esta espécie reduz o NO_3^- preferencialmente no sistema radicular (Tabela 1).

Plantas noduladas de tremoço também apresentaram declínio na concentração de ALT transportados pela seiva do xilema após a transferência das plantas para hidroponia (Tabela 1). A concentração de URE encontrada na seiva do xilema de plantas noduladas de tremoço foi muito baixa, demonstrando que esta espécie transportar mais N na forma de amidas (ASN e GLN), conforme foi observado pela composição da seiva do xilema (Tabela 1). Além disso, verifica-se pouca diferença na concentração de amidas transportada pela seiva entre plantas noduladas e não-noduladas (Tabela 1).

Tabela 1. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT, NO₃⁻ e URE na seiva do xilema de tremçoço (*Lupinus albus*) não-nodulado e nodulado sujeito ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em vermiculita (V+N; V-N) e transferidas para H-N.

	Não-nodulado		Nodulado	
	V+N V+N	V+N H-N	V-N V-N	V-N H-N
	(mol %)			
ASP	15,58	36,47	21,48	32,15
GLU	3,12	4,85	6,21	6,38
ASN	51,80	19,43	46,29	13,81
SER	2,26	5,68	0,55	5,14
GLN	10,41	1,75	18,30	2,86
HIS	0,69	1,18	0,42	1,26
GLY	0,91	0,79	0,81	0,99
THR	1,47	1,33	0,21	1,90
ARG	0,57	0,57	0,27	3,85
ALA	0,78	0,45	0,50	2,30
TYR	0,49	8,81	1,23	9,52
MET	0,21	0,26	0,12	0,95
VAL	3,88	4,40	1,38	3,71
PHE	1,21	0,81	0,26	1,44
ILE	1,73	1,91	0,66	1,73
LEU	0,47	1,40	0,28	1,08
LYS	0,50	0,70	0,26	0,41
GABA	2,56	7,27	0,53	8,76
Outros*	1,35	1,94	0,25	1,75
	(μmol/mL)			
NO₃⁻	3,93 a	0,24 b	nd	nd
ALT	11,51 a	2,19 b	13,70 a	1,66 b
URE	nd	nd	0,20 a	0,05 b

nd – não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra , na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

. Feijão

Após a transferência de plantas de feijão não-noduladas para H-N foi observada forte redução da ASN e pequena redução da GLN (Tabela 2). Em contrapartida, ASP teve um pequeno aumento na seiva do xilema. Dos aminoácidos restantes com exceção HIS, PHE, MET, THR e ALA, todos os outros apresentaram aumento de proporção após a transferência para H-N, com destaque para GABA, que aumentou cerca de 9 %.

As concentrações de ALT e NO_3^- foram reduzidas com a transferência de plantas de feijão não-noduladas para H-N (Tabela 2). Uma vez que a concentração de ALT encontrada foi muito baixa, em relação à concentração de NO_3^- , pode-se sugerir que grande parte do NO_3^- seria reduzida na parte aérea da planta (Tabela 2).

Plantas de feijão noduladas apresentaram aumento na concentração de ASP e reduções na concentração de ASN e GLN na seiva do xilema, após a transferência de plantas para H-N. GABA aumentou cerca de 6 % (Tabela 2).

Ocorreram reduções nas concentrações de ALT e URE com a transferência sendo que, a concentração de URE foi superior à concentração de ALT, indicando que a espécie é transportadora de URE quando nodulada (Tabela 2). Outro ponto importante é que a concentração de GLN encontrado na seiva do xilema de plantas noduladas foi cerca de 2,7 vezes superior à concentração encontrada em não-noduladas, mostrando a importância desta amida em plantas transportadoras de URE, como feijão (Tabela 2).

Tabela 2. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT, NO₃⁻ e URE na seiva do xilema de feijão (*Phaseolus vulgaris* cultivar Carioca) não-nodulado e nodulado sujeito ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em vermiculita (V+N; V-N) e transferidas para H-N.

	Não-nodulado		Nodulado	
	V+N V+N	V+N H-N	V-N V-N	V-N H-N
	(mol %)			
ASP	1,65	7,85	8,21	16,03
GLU	2,06	6,36	8,74	9,26
ASN	53,95	27,03	20,97	11,28
SER	1,25	1,78	4,34	7,17
GLN	7,97	4,63	21,73	6,43
HIS	4,02	3,92	1,82	1,84
GLY	2,38	3,64	0,90	0,37
THR	4,20	3,83	4,19	4,85
ARG	2,85	5,33	2,66	2,60
ALA	0,41	0,35	1,45	1,32
TYR	1,83	2,76	0,59	1,24
MET	0,47	0,26	1,18	1,69
VAL	5,21	9,11	3,51	4,25
PHE	2,16	1,08	0,76	0,65
ILE	2,19	5,46	1,76	3,57
LEU	1,36	2,97	1,77	4,16
LYS	1,35	2,17	6,79	6,18
GABA	3,81	10,31	7,12	13,35
Outros	0,87	1,16	1,51	3,75
	(μmol/mL)			
NO₃⁻	19,33 a	2,92 b	nd	nd
ALT	2,98 a	1,05 b	3,09 a	1,72 b
URE	nd	nd	6,48 a	1,07 b

nd – não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra , na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

. Feijão-de-corda

Plantas de feijão-de-corda não-noduladas e noduladas mostraram aumento de ASP, juntamente com reduções nas concentrações de ASN e GLN após a transferência para H-N quando comparadas com plantas mantidas em V+N ou V-N (Tabela 3).

Houve reduções nas concentrações de NO_3^- e ALT após a transferência de plantas de feijão-de-corda não-noduladas para H-N. Por outro lado, plantas noduladas mostraram reduções nas concentrações de ALT e URE em H-N quando comparadas com plantas controle (Tabela 3). Verifica-se também que NO_3^- é reduzido em maior proporção na parte aérea das plantas não-noduladas e quando as plantas estão noduladas houve preferência pelo transporte de URE (Tabela 3).

Tabela 3. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT, NO₃⁻ e URE na seiva do xilema de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) não-nodulado e nodulado sujeito ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em vermiculita (V+N; V-N) e transferidas para H-N.

	Não-nodulado		Nodulado	
	V+N	V+N	V-N	V-N
	V+N	H-N	V-N	H-N
	(mol %)			
ASP	3,30	13,05	4,51	32,67
GLU	1,55	5,70	1,42	8,50
ASN	43,22	23,04	21,30	9,56
SER	6,88	9,52	1,63	8,60
GLN	21,50	9,84	40,49	3,31
HIS	1,29	1,24	3,19	1,35
GLY	1,27	1,31	2,78	2,48
THR	2,49	3,70	2,17	3,52
ARG	1,97	2,54	2,22	0,85
ALA	0,67	1,35	0,50	3,11
TYR	0,40	0,74	0,76	1,24
MET	0,93	0,94	1,42	2,23
VAL	3,34	7,18	3,62	5,61
PHE	1,12	1,82	0,83	1,16
ILE	2,30	3,87	2,10	4,35
LEU	2,95	5,42	2,57	5,76
LYS	3,31	4,92	5,91	0,49
GABA	0,93	1,65	0,63	3,14
Outros *	0,57	2,17	1,96	2,06
	(μmol/mL)			
NO ₃ ⁻	20,48 a	4,59 b	nd	nd
ALT	3,88 a	2,16 b	3,75 a	0,68 b
URE	nd	nd	12,46 a	1,79 b

nd – não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra , na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

. Crotalária

Ocorreram decréscimos nas concentrações de ASN e GLN, e aumento da concentração de ASP após a transferência de plantas de crotalária não-noduladas para H-N, em relação às plantas V+N ou V-N (Tabela 4). Observa-se também a ocorrência de aumentos significativos nas concentrações de GLU, SER, VAL e de outros aminoácidos. Dentro de "outros", um aminoácido de natureza desconhecida, eluído entre TYR e MET, aumentou muito com a transferência das plantas. NO_3^- e ALT tiveram suas concentrações reduzidas com a transferência das plantas para H-N (Tabela 4).

Em plantas de crotalária noduladas ocorreram decréscimos nas concentrações de ASN e GLN após a transferência para H-N. Entretanto, a concentração de ASP decresceu nestas plantas ao invés de aumentar, contrariando nossa hipótese de que após a transferência de plantas noduladas para H-N ocorreria acúmulo de ASP às custas de ASN. Ocorreu neste caso, acúmulo significativo de um aminoácido de natureza desconhecida, citado anteriormente. Este aminoácido contribuiu muito pouco para o transporte nas plantas controle mas, se sobressaiu mais ainda quando ocorreu decréscimo na assimilação do N (Tabela 4). Plantas de crotalária noduladas após a transferência para H-N mostraram forte redução na concentração de ALT transportadas na seiva do xilema. A concentração de ALT encontrada na seiva do xilema das plantas noduladas foi muito mais alta do que a concentração de URE, mostrando que esta espécie tem preferência pelo transporte de amidas para o N fixado (Tabela 4).

Tabela 4. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT, NO₃⁻ e URE na seiva do xilema de crotalária (*Crotalaria juncea* cultivar IAC 1) não-nodulada e nodulada submetida ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em vermiculita (V+N; V-N) e transferidas para H-N.

	Não-nodulado		Nodulado	
	V+N	V+N	V-N	V-N
	V+N	H-N	V-N	H-N
(mol %)				
ASP	1,94	19,37	18,26	5,18
GLU	1,33	9,61	2,61	9,12
ASN	67,53	13,22	56,61	12,65
SER	0,87	5,27	0,12	6,18
GLN	12,73	4,45	17,66	3,72
HIS	0,95	2,39	0,50	4,36
GLY	1,05	2,85	0,14	1,75
THR	2,43	4,00	0,34	5,13
ARG	0,68	0,73	0,20	2,35
ALA	0,25	1,55	0,12	3,78
TYR	0,67	7,19	0,12	1,44
MET	0,27	0,96	0,09	0,96
VAL	2,43	6,16	0,47	3,52
PHE	0,68	1,39	0,07	0,44
ILE	1,19	4,63	0,14	1,15
LEU	1,06	3,11	0,10	2,28
LYS	2,48	1,89	0,74	2,25
GABA	0,26	1,75	0,19	8,14
pico entre TYT e MET	1,05	7,25	1,51	25,63
Outros*	0,16	2,22	1,01	2,32
(μmol/mL)				
NO₃⁻	20,94 a	2,73 b	nd	nd
ALT	4,66 a	1,45 b	8,04 a	0,78 b
URE	nd	nd	0,036	0,031

nd – não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

. Ervilha

Plantas de ervilha não-noduladas e noduladas apresentaram aumento da concentração de ASP e reduções nas concentrações de ASN e GLN transportada na seiva do xilema após a transferência para H-N, em relação às plantas mantidas em V+N ou V-N (Tabela 5). O aminoácido não-protéico homoserina ocorreu em concentração alta na seiva do xilema de plantas não-noduladas e noduladas. Em plantas noduladas, a concentração de homoserina chegou a ser superior à concentração de GLN transportado, tendendo a se reduzir em plantas transferidas para H-N (Tabela 5). Homoserina também foi encontrada na seiva do xilema de plantas do gênero *Pisum* por PATE (1962) e Pate & Wallace (1964).

As concentrações de NO_3^- e ALT apresentaram reduções com a transferência das plantas para H-N, sendo que a concentração de NO_3^- foi superior a de ALT (Tabela 5). A concentração de ALT na seiva do xilema de plantas noduladas foi reduzida com a transferência para H-N (Tabela 5).

Tabela 5. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT e NO₃⁻ na seiva do xilema de ervilha (*Pisum sativum* cultivar samba) não-nodulada e nodulada sujeita ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em vermiculita (V+N; V-N) e transferidas para H-N.

	Não-nodulada		Nodulada	
	V+N V+N	V+N H-N	V-N V-N	V-N H-N
	(mol %)			
ASP	3,26	20,02	15,74	32,61
GLU	0,36	0,57	0,26	0,23
ASN	43,63	36,75	52,03	32,92
SER	0,65	2,44	0,29	0,55
GLN	10,51	2,74	15,36	12,54
HIS	0,70	0,93	0,36	0,51
GLY	0,93	2,57	0,04	0,06
THR	0,86	2,07	0,73	1,23
ARG	2,21	1,03	0,63	0,80
ALA	0,13	1,02	0,11	0,44
TYR	0,24	0,24	0,21	0,21
MET	0,24	0,19	0,38	0,10
VAL	1,60	3,57	0,62	1,15
PHE	0,42	0,38	0,13	0,14
ILE	8,81	2,01	0,53	0,64
LEU	0,81	1,74	0,34	0,65
LYS	1,20	0,65	0,64	0,88
GABA	0,12	0,95	0,16	2,87
Homoserina	23,03	19,64	10,23	10,46
Outros*	0,29	0,50	1,22	1,07
	(μmol/mL)			
NO₃⁻	18,25 a	2,91 b	nd	nd
ALT	5,29 a	1,21 b	3,04 a	1,85 b
URE	nd	nd	nd	nd

nd – não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey (p ≤ 0,05)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

3.1.1. Considerações Gerais

A análise dos produtos da fixação do N_2 em leguminosas permite a sua divisão em transportadoras de URE (ácido alantóico e alantoína) ou transportadoras de amidas (ASN e GLN), dependendo do tipo de soluto dominante na seiva do xilema (Dakora, 2000). Os membros da tribo Phaseoleae exportam o N fixado na forma de URE, no caso de feijão-de-corda, feijão e soja (Pate *et al.*, 1980; Sprent, 1981). Cerca de 98 % do N transportado para a parte aérea de feijão-de-corda ocorre na forma de URE, enquanto em plantas transportadoras de amidas, como ervilha e trevo, 81 % do N no xilema está na forma de ASN (Atkins, 1987).

Apesar da diferença dos produtos, a via de assimilação da NH_4^+ produzida pela fixação do N_2 é aparentemente a mesma para leguminosas transportadoras de URE ou de amidas (Schubert, 1986).

Além disso, as principais enzimas envolvidas na biossíntese de URE, 5'-nucleotidase, purina nucleosidase, xantina desidrogenase, uricase e alantoinase, estão presentes e ativas em nódulos de leguminosas transportadoras de URE e amidas, como soja e feijão-de-corda (Reynolds *et al.*, 1982). A atividade da enzima AS, principal enzima envolvida na biossíntese de ASN também foi verificada em nódulos de leguminosas transportadoras de amidas e URE (Reynolds *et al.*, 1982). Ocorre apenas atividade ou expressão mais baixa das enzimas da biossíntese de URE em plantas transportadoras de amidas, e vice-versa (Pate, 1973; Corby *et al.*, 1983). Estas diferenças nas atividades das enzimas mostram que os genes que controlam a síntese destas proteínas estão presentes e sendo expressos diferencialmente em plantas transportadoras de URE e amidas (Dakora, 2000).

URE são encontrados somente na seiva do xilema de leguminosas tropicais, (tribo Phaseoleae), uma das razões propostas para explicar essa ocorrência, é que ureídeos são menos solúveis do que amidas (ASN e GLN) (Sprent, 1981). Como moléculas de transporte, ureídeos são mais adequados aos trópicos quentes, onde temperaturas relativamente altas

podem promover maior absorção de água e maior solubilidade destes compostos para transporte interno (Dakora, 2000). As concentrações de URE encontradas na seiva do xilema de feijão (Tabela 2) e feijão-de-corda (Tabela 3), juntamente com soja (Capítulo 3) estão de acordo com a classificação dessas espécies como transportadoras de URE.

Leguminosas transportadoras de amida quando estão fixando N_2 ou absorvendo NO_3^- , NH_4^+ ou uréia transportam muita ASN e GLN na seiva do xilema (Atkins *et al.*, 1979). Esta característica foi observada nos experimentos com plantas de tremoço e crotalária, que quando noduladas ou não-noduladas apresentaram poucas alterações nas concentrações de ASN e GLN transportada na seiva do xilema (Tabelas 1 e 4).

Em espécies de leguminosas transportadoras de URE, como soja, feijão-de-corda e feijão, verificou-se um aumento significativo da proporção de GLN e uma redução da ASN em plantas noduladas, quando comparadas com plantas não-noduladas (Tabelas 2 e 3). Em plantas noduladas de feijão-de-corda e feijão a proporção de GLN chegou a ser superior à de ASN (Tabelas 2 e 3). A presença de mais GLN na seiva do xilema de espécies transportadoras de URE, pode estar relacionada ao fato de que GLN é o aminoácido doador de grupo amino para a síntese de URE (Schubert, 1986).

Nos experimentos realizados, verificou-se que os nódulos formados em plantas de tremoço, crotalária e ervilha apresentaram crescimento indeterminado, enquanto os nódulos de feijão, feijão-de-corda e soja apresentaram crescimento determinado. Isto concorda com o fato de que plantas transportadoras de amidas apresentam modelo de crescimento indeterminado para o nódulo e leguminosas transportadoras de URE, modelo de crescimento do nódulo determinado (Schubert, 1986).

Foi observado que plantas de tremoço não-noduladas recebendo 15 mM de NO_3^- apresentaram uma alta concentração de ALT na seiva do xilema e, em contrapartida uma baixa

concentração de NO_3^- (Tabela 1). Raízes de espécies de *Lupinus* são particularmente ativas na redução de NO_3^- , sendo muito pouco do NO_3^- (6 a 10 %) reduzido na parte aérea da plantas, mesmo em concentrações supra-ótimas de NO_3^- (Pate, 1973; Pate *et al.*, 1979).

Outras espécies como ervilha (Oghoghorie & Pate, 1971) e feijão-de-corda (Pate *et al.*, 1980) são classificadas como "intermediárias", porque reduzem parte do NO_3^- na raiz e na parte aérea mas, à medida que a concentração de NO_3^- no meio externo aumenta, aumenta a proporção de NO_3^- reduzida na parte aérea da planta (Pate *et al.*, 1980). Isto pode explicar porque foi encontrada alta concentração de NO_3^- na seiva do xilema de plantas não-noduladas de feijão-de-corda e ervilha (Tabelas 3 e 5). Outros exemplos de plantas que reduzem NO_3^- tanto na raiz como na parte aérea, são crotalária (Tabela 4) e soja (Capítulo 2), conforme observado também por Crafts-Brandner & Haper (1982).

Existem espécies onde muito pouco NO_3^- é reduzido na raiz como por exemplo, *Gossypium* (Radin *et al.*, 1975) e *Xanthium* (Wallace & Pate *et al.*, 1967). No nosso caso, feijão mostrou uma baixa concentração de ALT na seiva do xilema sendo portanto, grande parte do NO_3^- reduzido na parte aérea da plantas (Tabela 2). A maior redução do NO_3^- na parte aérea de plantas de feijão também foi observada por Marques *et al.* (1983) e Wallace (1986).

De um modo geral, leguminosas tropicais pertencentes à tribo Phaseoleae, apresentam em média 87 % da atividade da RN na parte aérea (Atkins *et al.*, 1980a). Em leguminosas temperadas como ervilha e tremoço, 50 % ou mais da atividade da RN na raiz (Wallace, 1966), sendo que quanto maior o suprimento de NO_3^- , maior é a proporção reduzida na parte aérea (Andrews *et al.*, 1984; Wallace, 1966).

Com exceção de plantas de crotalária noduladas (não houve aumento de ASP, embora a razão ASP/ASN aumentou), em todas as espécies de leguminosas estudadas, noduladas e não-noduladas, ocorreu aumento de ASP e redução da ASN. Isto confirma nossa hipótese de

que sob deficiência na assimilação do N, há uma preferência pelo transporte de ASP em relação a ASN. Em todas as situações também ocorreu declínio da GLN.

O comportamento das leguminosas estudadas durante o estresse de N foi, portanto semelhante à soja quanto às mudanças no transporte de aminoácidos no xilema. Não houve diferença neste sentido entre as leguminosas transportadoras de URE ou amidas.

3.2. Efeito da transferência de plantas de girassol, tomate e milho para hidroponia sem nitrogênio

Diante do fato de que plantas leguminosas aqui estudadas, noduladas ou não noduladas, apresentaram alteração na razão ASP/ASN sob deficiência de N, surgiu-nos o interesse de estender a investigação para verificar o fenômeno em não leguminosas.

Observou-se também em girassol, milho e tomate (Tabelas 6, 7 e 8) reduções nas concentrações de ASN e GLN acompanhado do aumento da concentração de ASP na seiva do xilema após a transferência das plantas para H-N. Nestas espécies observa-se que GLN sempre foi o principal aminoácido transportado na seiva do xilema das plantas. Talvez por essa razão não foi observada redução muito acentuada da concentração de ASN nas plantas. Pate (1971) e White *et al* (1981) também encontraram GLN como a principal forma de N transportada em tomate. A redução de GLN pode estar relacionada com o fato dessa amida ser produto primário da assimilação de N em plantas.

Tanto para girassol quanto para milho e tomate ocorreram decréscimos nas concentrações de NO_3^- e ALT na seiva do xilema das plantas em H-N, quando comparadas com plantas mantidas em vermiculita recebendo NO_3^- (Tabelas 6, 7 e 8). Nas três espécies ficou caracterizado que o sítio de redução do NO_3^- foi principalmente a parte aérea da planta, uma vez que a concentração de NO_3^- no xilema foi sempre superior à de ALT (Tabelas 6, 7 e 8).

Tabela 6. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT e NO₃⁻ na seiva do xilema de girassol (*Helianthus annuus*) sujeito ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em V+N e transferidas para H-N.

	V+N V+N	V+N H-N
	(mol %)	
ASP	3,66	10,89
GLU	4,84	9,66
ASN	12,17	4,37
SER	3,80	6,07
GLN	58,37	38,86
HIS	0,48	1,14
GLY	1,27	2,12
THR	1,11	2,19
ARG	1,94	4,03
ALA	2,46	3,25
TYR	0,71	0,91
MET	0,15	0,23
VAL	2,19	3,46
PHE	0,24	0,35
ILE	1,20	2,47
LEU	0,78	1,35
LYS	0,23	0,33
GABA	2,80	5,30
Outros *	1,58	3,02
	(μmol/mL)	
NO ₃ ⁻	17,10 a	4,01 b
ALT	3,23 a	1,30 b

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra , na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

Tabela 7. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT e NO_3^- na seiva do xilem de milho (*Zea mays*) sujeito ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em V+N e transferidas para H-N.

	V+N V+N	V+N H-N
	(mol %)	
ASP	4,18	9,59
GLU	7,42	20,98
ASN	17,47	4,46
SER	10,87	12,17
GLN	33,36	20,13
HIS	0,56	0,88
GLY	2,63	2,30
THR	3,36	4,31
ARG	2,20	1,91
ALA	11,66	5,83
TYR	0,06	0,02
MET	0,44	0,84
VAL	1,50	3,34
PHE	0,26	0,97
ILE	0,56	1,78
LEU	0,55	2,20
LYS	1,35	2,05
GABA	0,53	4,98
Outros *	1,05	1,25
	($\mu\text{mol/mL}$)	
NO_3^-	20,47 a	4,20 b
ALT	10,08 a	5,81 b

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

Tabela 8. Composição de aminoácidos e concentrações de ALT e NO₃⁻ na seiva do xilema de tomate (*Lycopersicon esculentum*) sujeito ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em V+N e transferidas para H-N.

	V+N V+N	V+N H-N
	(mol %)	
ASP	4,22	13,96
GLU	7,49	11,39
ASN	10,90	7,74
SER	5,44	10,75
GLN	32,56	21,58
HIS	2,97	1,24
GLY	2,47	4,21
THR	4,49	3,19
ARG	2,82	0,27
ALA	1,41	1,67
TYR	1,00	1,80
MET	3,64	0,50
VAL	4,07	4,16
PHE	1,25	1,57
ILE	2,82	2,89
LEU	2,60	2,81
LYS	5,92	1,42
GABA	3,27	7,28
Outros *	0,67	1,58
	(μmol/mL)	
NO ₃ ⁻	29,21 a	2,34 b
ALT	2,44 a	0,67 b

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra , na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

3.3. Transferência de cultivares de soja nodulada para hidroponia sem nitrogênio influência de cultivar e estirpe

Existe grande variabilidade genética entre e dentro de espécies de leguminosas quanto à capacidade de fixar N biologicamente, o que representa uma material inesgotável para seleção genética (Hungria & Neves, 1986). Essa variabilidade já foi demonstrada em *Phaseolus vulgaris*, refletindo em diferenças na massa, número e eficiência dos nódulos atividade da nitrogenase e N acumulado pelas plantas (Hungria & Ruschel, 1982). Do mesmo modo, já foram detectadas diferenças entre plantas da mesma cultivar de feijão inoculada com diferentes estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (Hungria & Ruschel 1982). Desta forma, torna-se importante saber se fatores intrínsecos da planta hospedeira (soja) e estirpe de bactéria (*Bradyrhizobium*) podem influenciar na alteração da razão ASP/ASN após a transferência de plantas noduladas para hidroponia.

Na Tabela 9 estão apresentadas as composições da seiva do xilema de plantas de soja de dois cultivares, IAC17 e Maple Arrow, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe 463) e *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe 6). Como se observa nos quatro sistemas simbióticos houve reduções nas concentrações de ASN e GLN com o concomitante aumento de ASP na seiva do xilema de plantas transferidas para H-N, em relação às plantas mantidas em V+N. Ocorreram também reduções nas concentrações de ALT e URE nos quatro sistemas em hidroponia (Tabela 9). Entretanto, não ocorreram grandes diferenças nas concentrações de ALT ou URE entre os quatro sistemas estudados (Tabela 9). Baseado nestes resultados pode-se inferir que as alterações observadas na seiva do xilema de plantas de soja após transferência para hidroponia foram independentes do genótipo e da estirpe de *Bradyrhizobium* utilizada.

Tabela 9. Composição de aminoácidos, ALT e URE na seiva do xilema de soja nodulada das cultivares IAC 17 e Mapple Arrow no estágio (R2), inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe 463) e *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe 6), sujeitas ou não ao estresse de N por quatro dias. Plantas cultivadas em V-N e transferidas para H-N.

	IAC17 Estirpe 463		IAC17 Estirpe 6		Mapple arrow Estirpe 463		Mapple arrow Estirpe 6	
	V-N V-N	V-N H-N	V-N V-N	V-N H-N	V-N V-N	V-N H-N	V-N V-N	V-N H-N
(mol %)								
ASP	6,95	27,18	12,39	23,19	7,56	42,72	4,27	17,80
GLU	0,94	3,46	0,63	5,10	0,38	1,74	0,29	2,69
ASN	39,56	29,25	47,30	31,05	49,41	23,21	50,79	19,97
SER	7,47	7,02	5,06	4,51	1,23	2,28	0,96	3,41
GLN	24,96	4,47	18,16	11,00	22,61	10,30	16,08	2,67
ALA	1,25	2,58	0,74	1,52	0,77	0,95	1,01	1,40
GABA	2,80	3,24	2,58	3,64	1,80	0,55	1,84	2,38
Outros *	16,07	22,28	13,16	20,00	16,24	18,25	24,76	49,68
(µmol/mL)								
ALT	3,69 a	2,51 b	3,15 a	1,92 b	4,85 a	2,17 b	4,13 a	0,78 b
URE	8,74 a	1,48 b	10,48 a	2,45 b	11,98 a	3,20 b	9,44 a	2,79 b

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada).

Médias seguidas de mesma letra , na linha, não diferem entre si pelo Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

*Aminoácidos não identificados no cromatograma

É provável que também haja pequenas variações nos efeitos da transferência da planta noduladas e não noduladas para H-N em função da espécie, cultivar e idade de planta, condições ambiente, nível nutricional antes do estresse etc. As plantas cultivadas com NO₃⁻ (leguminosas ou não) permaneceram em H-N durante quatro dias entretanto, não se sabe qual o nível de deficiência de N que esse tratamento causou à planta, portanto é possível que intensidade do efeito varie em função do tempo de permanência em H-N sem NO₃⁻.

Quando plantas de soja não-noduladas foram transferidas para H-N, observou-se que somente no segundo dia após a transferência é que ocorreu aumento na razão ASP/ASN. Deve ocorrer primeiramente um esgotamento do *pool* de N da raiz (dados apresentados no Capítulo 2). Plantas noduladas também podem apresentar variações na sensibilidade do nódulo a aumento da resistência ao oxigênio, conforme proposto no Capítulo 3.

4. CONCLUSÕES

O aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema de leguminosas noduladas e não-noduladas após a transferência para H-N é um fenômeno que independe da leguminosa ser transportadora de URE ou amidas.

Espécies não-leguminosas (girassol, tomate e milho) também apresentam aumento da razão ASP/ASN após serem sujeitas à deficiência de N.

Em soja, o fenômeno foi independente da cultivar e da bactéria utilizada.

CAPÍTULO 5

METABOLISMO E TRANSPORTE DE NITROGÊNIO EM SOJA DURANTE A NODULAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA

1. INTRODUÇÃO

Durante o estabelecimento da fixação do N_2 , plantas inoculadas cultivadas na ausência de N mineral (NO_3^- e NH_4^+), estão sujeitas, após o esgotamento das reservas de N e antes do início da fixação do N_2 , a um período de deficiência (Peat *et al.*, 1981; Finke *et al.*, 1982; Atkins *et al.*, 1989a). Essa deficiência pode ser observada pelo amarelecimento, das folhas principalmente mais velhas. Tendo em vista que o aumento do transporte de ASP parece estar associado a uma deficiência na assimilação do N (Capítulos 2 e 3), o fenômeno representa uma oportunidade de testar a hipótese numa situação bastante distinta do sistema de hidroponia usado nos demais capítulos desta tese. Desta forma, foi feito um estudo com objetivo de relacionar o teor de ASP no xilema com outros compostos nitrogenados de raízes, nódulo e folhas durante o desenvolvimento de plantas noduladas em vermiculita.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, em condições naturais de luz e temperatura. As sementes foram colocadas para germinar diretamente em vasos plásticos contendo 3 L de vermiculita. Após a emergência foi feito o desbaste de plântulas conduzindo-se, a partir daí, uma ou três plantas por vaso, dependendo de sua capacidade. Foram colocados pratos sob os vasos para reter pequena quantidade de água ou solução nutritiva.

A partir de V0 (planta com cotilédones abertos, segundo Fehr *et al.*, 1971), foram feitas três inoculações com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 (=SEMIA 5019), distribuindo-se 2 mL de inóculo em torno do colo da planta, por três vezes seguidas. Após as inoculações, foram colocados 50 mL de água destilada no vaso para distribuir o inóculo.

Durante o cultivo as plantas receberam duas vezes por semana 250 mL de solução nutritiva -N (0 mM N-NO₃⁻), preparada baseando-se na solução de Hoagland & Arnon (1950). Irrigações, quando necessárias, foram realizadas com água de torneira.

Periodicamente foram feitas coletas da seiva do xilema, raízes, nódulos e folhas das plantas para análise.

2.2. Métodos Analíticos

2.2.1. Dosagem de pigmentos foliares

Os teores de clorofilas totais e carotenóides foram determinados em discos foliares retirados do último trifólio expandido, a partir do ápice da planta. Utilizou-se acetona 80% (v/v) para extração e os coeficientes de absorvância molar propostos por Lichtenthaler & Rinderle (1988).

2.2.2. Coleta da seiva do xilema

Idem ao item 2.2.1 do Capítulo 2.

2.2.3. Coleta, extração e análise dos compostos nitrogenados de raízes e nódulos

Idem ao item 2.2.3 do Capítulo 2, executando os mesmos procedimentos para o nódulo.

2.2.4. Dosagem de ALT

Idem ao item 2.2.4 do Capítulo 2.

2.2.5. Dosagem de URE

Idem ao item 2.2.4 do Capítulo 3.

2.2.6. Separação de aminoácidos livres por HPLC

Idem ao Capítulo 1 item 2.2.1.3.

2.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Idem a Capítulo 1 item 2.3.

O controle dos experimentos foi sempre plantas em vermiculita.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os teores de clorofilas e carotenóides nas folhas bem como, teores de URE e ALT na seiva do xilema das plantas de 17 a 49 dias após a semeadura (DAS) em vermiculita.

Os teores de clorofilas e carotenóides sofreram uma queda após 17 DAS, voltando a aumentar após 27 DAS, indicativo do período de deficiência de N que as plantas estão sujeitas após o esgotamento das reservas de N e antes da plena atividade de fixação do N₂.

A concentração de URE na seiva do xilema foi muito baixa até os 27 DAS. A concentração de ALT diminuiu após 17 DAS, tendendo posteriormente a permanecer constante (Tabela 1).

Quanto à análise qualitativa dos aminoácidos, esta revelou mudanças acentuadas ao longo do desenvolvimento. O teor de ASP na seiva do xilema das plantas foi inicialmente baixo (17 DAS), aumentou até 27 DAS, e depois sofreu redução. Por outro lado, o teor de ASN teve tendência inversa ao do ASP ou seja, quando o teor de ASP foi alto, o de ASN foi baixo (Tabela 1), sugerindo que houve maior transformação de um aminoácido no outro. A GLN foi encontrada em grande proporção a partir de 34 DAS (Tabela 1). Os aminoácidos GLU, SER, ALA e GABA não sofreram grandes alterações durante o desenvolvimento das plantas (Tabela 1).

Os resultados apresentados na Tabela 1 revelam uma associação clara com as características morfológicas das plantas apresentadas na Tabela 4. Aos 34 DAS, por exemplo, foram observados os primeiros nódulos (Tabela 4), que coincidiu com o aumento da massa fresca, e com aumentos na concentração de URE e GLN na seiva do xilema (Tabela 1). Apesar disso, as plantas ainda permaneciam com folhas com coloração verde-clara (Tabela 4), concordando com o baixo teor de clorofilas totais (Tabela 1). O “enverdecimento” só ocorreu

aos 39 DAS (Tabela 4), e foi confirmado pelo aumento no teor de clorofilas e carotenóides das folhas (Tabela 1). A presença de URE na seiva do xilema pode ser usada para avaliar a fixação de N (McClure *et al.*, 1980; Herridge & Peoples, 1990; Sodek & Silva, 1996). Baseando-se nisso, a concentração de URE indicou que a plena fixação do N foi atingida 5 dias antes do "enverdecimento" das folhas (Tabelas 1 e 4).

Os resultados mostraram também que a presença da GLN na seiva do xilema esteve sempre associada à síntese de URE (Tabela 1), concordando com os resultados obtidos por Amarante & Sodek (dados não publicados).

O baixo teor de ASN e alto teor de ASP no xilema, mesmo quando URE e GLN já começaram atingir valores altos no xilema (34 DAS, Tabela 1) podem significar que a alteração do transporte de aminoácidos não esteve diretamente associada à fixação do N₂, *per se* mas relacionada com a deficiência de N na planta.

Nas raízes, aos 27 DAS observou-se o teor mais baixo de ASN, e os teores mais altos de ASP e GLU (Tabela 2). Este resultado concorda com o teor mais baixo de ASN, concomitante com a concentração mais alta de ASP na seiva do xilema. A partir desta data, o teor de ASN elevou-se até 49 DAS (Tabela 2).

Aos 27 DAS, as plantas já apresentavam nódulos, porém estas ainda eram muitos pequenos, havendo dificuldade para serem coletados das raízes (Tabela 4). Assim, provavelmente grande parte do N da planta ainda era derivado da reserva dos cotilédones.

Nas raízes, o teor de GLN sofreu pouca variação durante todo o desenvolvimento da planta (Tabela 2), sugerindo que o teor deste aminoácido nas raízes independe da fixação do N, e que também não contribui para o aumento do ASP no xilema (Tabela 2).

Tabela 1. Massa fresca dos nódulos, teor de pigmentos na folha e compostos nitrogenados na seiva do xilema de soja durante a fase de nodulação. Plantas cultivadas em V-N.

Dias após a semeadura	17 DAS	22 DAS	27 DAS	34 DAS	39DAS	44 DAS	49 DAS
Estádio de desenvolvimento:	(V1)	(V2)	(V3)	(V4 e V5)	(V6)	(R1 e R2)	(R3)
Nódulo	nd	nd	0,12 ± 0,009	1,21 ± 0,056	2,12 ± 0,194	2,29 ± 0,223	2,30 ± 0,01
Massa Fresca (g/planta)							
Folha							
Clorofilas (mg/g)	1,08 ± 0,037	0,57 ± 0,147	0,75 ± 0,133	0,86 ± 0,170	1,70 ± 0,171	2,33 ± 0,156	2,68 ± 0,09
Carotenóides (mg/g)	0,07 ± 0,017	0,04 ± 0,009	0,05 ± 0,008	0,06 ± 0,009	0,11 ± 0,009	0,10 ± 0,003	0,15 ± 0,00
Xilema							
URE (µmol/mL)	0,15 ± 0,014	0,41 ± 0,029	0,79 ± 0,143	10,26 ± 0,621	9,14 ± 0,418	8,14 ± 0,133	8,95 ± 0,53
ALT (µmol/mL)	4,89 ± 0,008	3,06 ± 0,091	5,27 ± 0,180	5,29 ± 0,338	5,37 ± 0,639	4,41 ± 0,850	5,04 ± 0,43
Aminoácidos (mol %)							
ASP	13,7	34,6	68,5	41,2	23,0	16,4	15,6
GLU	0,7	2,4	0,8	1,8	1,4	1,0	0,9
ASN	59,3	36,1	10,2	19,8	30,8	41,0	41,4
SER	2,1	2,9	2,9	4,6	3,1	2,0	2,5
GLN	5,1	5,0	1,8	18,7	30,1	20,6	18,6
ALA	0,7	1,1	1,0	1,1	0,3	2,5	0,9
GABA	1,3	1,8	2,0	1,4	0,5	2,0	3,1
Outros	17,0	16,1	12,7	11,4	11	14,6	17,1

nd - não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada), com seu respectivo erro padrão.

Tabela 2. Compostos nitrogenados das raízes de soja durante a fase de nodulação. Plantas cultivadas em V-N.

Dias após a seneadura:	17 DAS	22 DAS	27 DAS	34 DAS	39DAS	44 DAS	49 DAS
Estádio de desenvolvimento	(V1)	(V2)	(V3)	(V4 e V5)	(V6)	(R1 e R2)	(R3)
URE ($\mu\text{mol/g}$)	nd	nd	nd	1,52 $\pm$ 0,162	1,43 $\pm$ 0,03	1,81 $\pm$ 0,117	1,45 $\pm$ 0,10
ALT ($\mu\text{mol/g}$)	3,14 $\pm$ 0,423	2,16 $\pm$ 0,126	2,32 $\pm$ 0,311	2,93 $\pm$ 0,205	3,01 $\pm$ 0,225	3,22 $\pm$ 0,521	3,10 $\pm$ 0,27
Aminoácidos (mol %)							
ASP	12,07	13,31	15,40	12,34	12,23	13,91	12,96
GLU	13,03	11,69	18,84	10,12	10,44	9,63	10,45
ASN	45,74	26,14	2,63	8,71	8,79	18,57	21,30
SER	4,17	7,23	14,26	14,74	13,84	11,55	10,56
GLN	3,99	10,84	8,47	13,32	8,11	7,87	8,75
ALA	1,85	3,71	8,05	9,02	8,78	8,51	7,88
GABA	0,75	2,83	9,68	6,62	12,92	8,34	9,26
Outros	18,42	24,25	24,25	25,13	24,89	21,63	18,83

nd - não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada), com seu respectivo erro padrão.

Tabela 3. Compostos nitrogenados nos nódulos de soja durante a fase de nodulação. Plantas cultivadas em V-N.

Dias após a semeadura:	17 DAS	22 DAS	27 DAS	34 DAS	39 DAS	44 DAS	49 DAS
Estádio de desenvolvimento	(V1)	(V2)	(V3)	(V4 e V5)	(V6)	(R1 e R2)	(R3)
URE ($\mu\text{mol/g}$)	nd	nd	nd	$4,72 \pm 0,521$	$5,02 \pm 0,713$	$5,23 \pm 0,254$	$5,16 \pm 0,42$
ALT ($\mu\text{mol/g}$)	nd	nd	nd	$22,42 \pm 3,45$	$20,13 \pm 1,65$	$21,15 \pm 2,83$	$20,61 \pm 3,0$
Aminoácidos (mol %)							
ASP	nd	nd	nd	0,56	2,51	4,95	5,07
GLU	nd	nd	nd	5,69	10,78	18,70	16,96
ASN	nd	nd	nd	0,57	0,43	11,22	16,56
SER	nd	nd	nd	12,57	9,81	8,88	8,35
GLN	nd	nd	nd	0,14	0,11	0,45	0,65
ALA	nd	nd	nd	21,30	21,14	18,13	21,86
GABA	nd	nd	nd	42,68	40,49	26,76	20,48
Outros	nd	nd	nd	16,49	14,72	10,91	10,07

nd - não determinado

Cada valor representa a média de quatro repetições (vasos com três plantas cada), com seu respectivo erro padrão.

Tabela 4. Características morfológicas de plantas de soja durante a fase de nodulação. Plantas cultivadas em V-N.

Dias após a semeadura Estádio de desenvolvimento	Descrição das características morfológicas
17 DAS (V1)	Plantas com folhas e cotilédones verde-escuro
22 DAS (V2)	Plantas com folhas e cotilédones verde-claro, sem nódulos. Algumas plantas sem cotilédones
27 DAS (V3)	Plantas com folhas com coloração verde-claro, as raízes já apresentavam nódulos mas, ainda pequenos, havendo dificuldade para destacá-los das raízes
34 DAS (V4 e V5)	Plantas ainda com folhas verde-claro, raízes com nódulos pequenos
39 DAS (V6)	Plantas com folhas com coloração verde-escuro, raízes com nódulos de tamanho médio
44 DAS (R1 e R2)	Plantas com folhas verde-escuro, com flores e raízes com nódulos de tamanho grande
49 DAS (R2 e R3)	Plantas com folhas mais novas verde-escuro e folhas mais velhas já em senescência, algumas plantas com vagens em formação

Nos nódulos, aos 34 DAS, o teor de GABA foi bem mais alto do que qualquer outro aminoácido (Tabela 3). Nesta data, ASN já havia começado se elevar nas raízes (Tabela 2). No xilema ASN e GLN também tiveram suas concentrações aumentadas enquanto, a concentração de ASP começou a decrescer (Tabelas 1). Além disso, a concentração de URE na seiva do xilema nesta fase chegou ao seu valor mais alto durante todo experimento, indicando que a planta já tinha atingido a plena fixação do N, mesmo a planta ainda apresentando sintomas de deficiência de N comprovada também pelo teor ainda baixo de clorofila nas folhas (Tabelas 1 e 4).

Posteriormente, continuaram ocorrendo aumentos nas concentrações de ASN no xilema, raízes e nódulos (Tabelas 1, 2 e 3), até atingirem a composição característica de plantas com nódulos maduros, ou seja, predominância de URE, ASN e GLN no transporte de N no xilema.

À medida que ASN aumentou, ASP diminuiu na seiva do xilema, e no nódulo, à medida que aumenta ASN, a concentração de GABA diminuiu. Ainda quando ASP estava alto, GLN e URE já tinham atingindo valores máximos no xilema.

Um ponto surpreendente, é o alto teor de GABA no nódulo logo após sua formação (34 e 39 DAS). Somente após a plena fixação do N, demonstrada pela concentração de URE, a concentração de GABA começa diminuir e o de ASN aumenta. Nos relatos em literatura, verifica-se que no nódulo GABA foi relacionado ao balanço de pH, especificamente como dreno de H^+ (Vance & Heichel, 1991). Mas, durante a formação dos nódulos não há relatos na literatura sobre o papel específico para o GABA.

Outro aspecto importante, é que com a formação do nódulo, primeiro ocorreu aumento de GLN e URE, seguido do aumento de ASN na seiva do xilema. Isto demonstra a preferência pelo transporte de URE pelo sistema soja-*Bradyrhizobium*. ASN também tendeu a se acumular lentamente nas raízes. No nódulo ASN aumentou rapidamente, mas somente após o teor nas

raízes ter aumentado. Isto sugere que, primeiro é estabelecido o teor de ASN para transporte no xilema, depois ocorre aumento do *pool* de ASN nas raízes e um pouco mais tarde o *pool* do nódulo.

Apesar das grandes variações na composição dos aminoácidos nos tecidos durante o desenvolvimento da planta, houve apenas pequenas variações no teor de ALT. A maior variação no teor de ALT foi observada aos 27 dias para o xilema e aos 27 e 34 dias nas raízes, quando ocorreu um pequeno decréscimo. Uma queda nos teores de ALT durante da fase de deficiência de N pode ser esperado. Surpreendente foi a queda ser relativamente pequena.

O desenvolvimento do nódulo envolve uma complexa série de alterações bioquímicas e estruturais na planta hospedeira e infectada pelo *Rhizobium*, que finalmente resulta na simbiose no qual o componente da bactéria fornece N reduzido e o hospedeiro fornece substratos respiráveis e um ambiente apropriado para atividade fixadora de N₂ pelo bacteróide. Embora, o desenvolvimento do cordão de infecção e do funcionamento da simbiose, crescimento e maturação dos tecidos do nódulo se prolonguem usualmente após o aparecimento da atividade da nitrogenase (Newcomb, 1981).

Dos 27 aos 34 dias ocorreu um aumento de 26 vezes na massa fresca dos nódulos e 13 vezes na quantidade de URE exportada no xilema, ficando demonstrado rápido crescimento e pleno funcionamento do nódulo. Neste período, o teor de clorofila das folhas não atingiu seu máximo. O rápido aumento na matéria fresca do nódulo observado pode ser relacionado à transformação extremamente rápida de uma estrutura pré-emergente em nódulo funcional, que envolve a transformação de células meristemáticas em células infectadas. Estes eventos foram associados por Newcomb (1981) com o crescimento extremamente rápido do nódulo e com o súbito aumento da atividade da nitrogenase (Atkins et al., 1984b). Após este período, parece existir uma auto-regulação da nodulação em relação à atividade da nitrogenase. Isto foi demonstrada em *Discaria trinervis* inoculada com *Frankia*, pela depressão na formação

(número) e no crescimento (biomassa) dos nódulos após o estabelecimento da fixação de N_2 , em contraposição ao aumento do conteúdo de N na planta como um todo (Valverde *et al.*, 2000).

Durante o crescimento da planta e a formação dos nódulos em leguminosas, como soja e feijão, ficou demonstrado que há sincronização entre o declínio do N dos cotilédones e o início da fixação do N_2 , causa um período de deficiência de N, entre 15 e 20 dias após a emergência (Cookson *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1981; Franco & Munns, 1982; Hungria & Neves, 1987). O período exato de "fome de N" em leguminosas noduladas epígeas, coincide com o período onde o N_2 fixado é usado mais para o crescimento do nódulo do que transportado para a parte aérea, cujas primeiras folhas requerem alto teor de N (Yoneyama & Ishizuki, 1982; Sprent & Thomas, 1984). O modelo de particionamento do N para os nódulos e os sintomas de "fome de N" variou entre cultivares de feijão-de-corda (Atkins *et al.*, 1989) e também entre estirpes de *Rhizobium* em feijão (Hungria *et al.*, 1991). Assim, é possível selecionar estirpes e cultivares nos quais o sintoma clássico de deficiência de N não seja observado, devido ao precoce estabelecimento da fixação do N_2 e assimilação (Hungria *et al.*, 1991).

Pelos resultados verifica-se que o aumento de ASP na seiva do xilema esteve associado à fase de deficiência de N, entre o esgotamento das reservas de N provenientes dos cotilédones e o estabelecimento do nódulo/fixação do N. Isso apóia a hipótese de que o aumento do ASP esteja relacionado com a deficiência na assimilação do N, proposta por Puiatti & Sodek (1999). Tal hipótese foi baseada no aumento de ASP com a diminuição da fixação do N ao transferir plantas para H-N, com aeração, e ao transferir plantas não-noduladas cultivadas com NO_3^- para H-N, com aeração, conforme os resultados apresentados nos Capítulos 2 e 3. ASP diminui quando NO_3^- é adicionado a hidroponia com aeração em plantas não-noduladas e

noduladas. Assim, supostamente a assimilação do NO_3^- adicionado à hidroponia compensa em parte a inibição da fixação do N.

4. CONCLUSÕES

A formação dos nódulos em plantas de soja representou mais uma situação na qual o aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema esteve relacionado com a deficiência na assimilação de N pela planta.

CONCLUSÃO GERAL

A deficiência de N provoca um aumento na razão ASP/ASN na seiva do xilema reflexo de mudança no metabolismo de ASN, aparentemente em função de alterações na atividade da enzima AS, responsável pela síntese de ASN a partir de ASP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M.P., Heichel, G.H. & Vance, C.P., 1987. Non photosynthetic CO₂ fixation by alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots and nodules. *Plant Physiol.* 85:283-289
- Andrews, M., Sutherland, J.M., Thomas, R.J. & Sprent, J.I., 1984. Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: the importance of the stem. *New Phytol.* 98:301-310
- Anthon, G.E., Emerich, D. W., 1990. Development regulation of enzymes of sucrose and hexose metabolism in effective and ineffective soybean nodules. *Plant Physiol.* 92:346-35.
- Arrese-Igor, C., Minchin, F.R., Gordon, A.J. & Nath, A.K., 1997. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in presence of nitrate. *J. Exp. Bot.* 48:905-913
- Ashton, A.R., Burnell, J.N., Furbank, R.T., Jenkins, C.L.D. & Hatch, M.D., 1990. Enzymes of C4 Photosynthesis. IN: *Methods in Plant Biochemistry: Enzymes of Primary Metabolism* (LEA, P.J., ed.), Academic Press Limited, London, pp.39-72.
- Atkins, C.A., Pate, J.S. & Sharkey, P.J., 1975. Asparagine metabolism: key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiol.* 56:807-812
- Atkins, A.C., Pate, J.S. & Layzell, D.B., 1979. Assimilation and transport of nitrogen in non nodulated (NO₃⁻ grown) *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* 64:1078-1082
- Atkins, A.C., Pate, J.S., Griffiths, G.H. & White, S.T., 1980a. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO₃⁻ grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L. Walp.). *Plant Physiol.* 66:978-983
- Atkins, A.C., Rainbird, R.M. & Pate, J.S., 1980b. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N₂-fixing nodules [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Z. Pflanzenphysiol.* 97:249-260

- Atkins, C.A., Pate, J.S., Peoples, M.B. & Joy, K.W., 1983. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71:841-848
- Atkins, C.A., Shelp, J.K., Peoples, M.B. & Pate, J.S., 1984a. Nitrogen nutrition and the development and senescence of nodules cowpea seedlings. *Planta* 162:316-326
- Atkins, C.A., Shelp, J.K., Peoples, M.B. & Pate, J.S., 1984b. Nitrogen nutrition and the development of functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. *Planta* 162:327-333
- Atkins, A.C., 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant Soil* 100:157-169
- Atkins, A.C., Pate, J.S., Stanford, P.J., Dakora, F.D. & Matthews, I., 1989. Nitrogen nutrition of nodules in relation to 'N-hunger' in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Plant Physiol.* 90:1644-1649
- Atkins, A.C., Fernando, M., Hunt, S. & Layzell, D.B., 1992. A metabolic connection between nitrogenase activity and synthesis of ureides in nodulated soybean. *Physiol. Plant.* 84:441-447
- Aurisano, N., Bertani, A. & Reggiani, R., 1995. Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings; causes e significance. *Phytochemistry.* 38: 1147-1150
- Bacanamwo, M. & Harper, J.E., 1996. Regulation of nitrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum*/soybean symbiosis by shoot C:N ratio. *Physiol. Plant.* 98:529-538
- Bacanamwo, M. & Harper, J.E., 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/products of its metabolism. *Physiol. Plant.* 100:371-377
- Baker, A., Hill, G.F. & Parsons, R., 1997. Evidence for the N feedback regulation of N₂ fixation in *Alnus glutinosa* L. *J. Exp. Bot.* 48:67-73

- Benson, J.R. & Hare, P.E., 1975. - *o*-phthalaldehyde fluorogenic detection of primary amine in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72:619-629
- Benton Jones, J., Wolf, B. & Mills, H.A., 1991. *Plant Analysis Handbook*. Micro-Macro Publishing Inc., Atenas, 213p.
- Bergersen, F.J., 1971. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 22:121-140
- Bielecki, R. I. & Turner, N. A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-293
- Blumenthal, J.M., Russelle, M.P. & Vance, C.P., 1997. Nitrogenase activity is affected by reduced partial pressures of N_2 and NO_3^- . *Plant Physiol.* 114:1405-1412
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-251
- Burns, I.G., 1991. Short- and long-term effects of a change in the spatial distribution of nitrate in the spatial distribution of nitrate in the root zone on N uptake, growth and root development of young lettuce plants. *Plant, Cell Environ.* 14:21-33
- Burris, R.H. & Roberts, G.P., 1993. Biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Nutr.*, 14:317-335
- Caputo, C. & Barneix, A.J., 1997. Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Physiol. Plant.* 101:853-860
- Carroll, A.D., Fox, G.G., Laurie, S., Phillips, R., Ratcliffe, R.G., Stewart, G.R., 1994. Ammonium assimilation and the role of γ -aminobutyric acid in the homeostasis in carrot cell suspensions. *Plant Physiol.* 106:513-520

- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. & Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Soil Sci. and Plant Anal. Comm.* 6:71-80
- Chang, K.S. & Farnden, K.J.F., 1981. Purification and properties of asparaginase from *Lupinus aboreus* and *Lupinus angustifolius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 208:49-58
- Christeller, T.J., Laing, W.A. & Sutton, D., 1977. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. I.Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen during nodule development. *Plant Physiol.* 94:47-50
- Chollet, R., Vidal, J. & Oleary, M.H., 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous highly regulated enzyme in plants. *Annual Review Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 47:273-298
- Coker, G.T. & Schubert, K.R., 1981. Carbon dioxide fixation in soybean roots. I.Characterization and comparison with N₂ fixation and composition xylem exudate during early nodule development. *Plant Physiol.* 67:691-696
- Cookson, C., Hughes, H. & Coombs, J., 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 148:338-345
- Corby, H.D.L., Polhill, R.M. & Sprent, J.I., 1983. Taxonomy. IN: Nitrogen fixation. (Broughton, W.J., ed.), vol. 3, Clarendon Press, Oxford, pp.1-35.
- Crafts-Brandner, S.J. & Harper, J.E., 1982. Nitrate reduction by roots soybean (*Glycine max* L. Merr.) seedlings. *Plant Physiol.* 69:1298-1303
- Crawford, N.M., 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7:859-868
- Dakora, F.D., 2000. Commonality of root nodulation signals and nitrogen assimilation in tropical grain legumes belonging to the tribe Phaseoleae. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:885-892

- Dembinski, E., Wisniewska, I., Zebrowski, J. & Raczynski-Bojanowska, K., 1996. Negative regulation of asparagine synthetase in the leaves of maize seedlings by light benzyladenine, and glucose. *Plant Physiol.* 96:66-70
- Die, J. van. 1963. Pathways of translocation and metabolic conversions of root absorbed $^{14}\text{C}(\text{U})\text{L}$ -glutamic acid in tomato plants. *Acta Bot. Neerl.* 12:269-280
- Drevon, J.J., Heckmann, M.O., Soussana, J.F. & Salsac, L., 1988. Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* 26:197-203
- Dobereiner, J., 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* 29:771-774
- Evans, H.J. & Burris, R.H., 1992. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: *Biological Nitrogen fixation* (Stacey, G., Burris, R.H. and Evans, H.J., eds.) Chapman Hall, New York, pp.1-42
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. & Pennington, J. S., 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11: 929-931
- Finke, R.L., Harper, J.E. & Hageman, R.H. , 1982. Efficiency of nitrogen assimilation by N_2 fixing and nitrate-grown soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Plant Physiol.* 70:1178-1184
- Franco, A.A., Munns, D.N., 1982. Nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. *Plant Soil* 66:149-160
- Givan, C.V. Aminotransferases in higher plants. In: *The Biochemistry of Higher Plants* (Stumpf, P.R. and Conn, E.E., eds.), vol.5, Academic Press, New York, pp.329-357.
- Godber, I.M., Parsons, R., 1988. Translocation of amino acids from stem nodules of *Sesbania rostrata* demonstrated by GC-MS in planta ^{15}N isotope dilution. *Plant Cell Environ* 21:1089-1099

- Gomes, F.P., 1990. Curso de Estatística Experimental. 3rd Edition. Livraria Nobel, Piracicaba, 467p.
- Gordon, C.V., 1991. Enzyme distribution between the cortex and infected region of soybean nodules. J. Exp. Bot. 42:961-967
- Gordon, C.V. & James, C.L. 1997. Enzymes of carbohydrate and amino acid and amino acid metabolism in developing and mature nodules of white clover. J. Exp. Bot. 48:894-903
- Hák, R. & Nátr, L., 1987. Effect of nitrogen starvation and recovery on gas exchange characteristics of young barley leaves. Photosynthetica 2:9-14
- Heckman, M.O. & Drevon, J.J., 1987. Nitrate metabolism in soybean root-nodules. Physiol. Plant. 69:721-725
- Herridge, D.F. & Peoples, M.B., 1990. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ^{15}N methods. Plant Physiol. 93:495-503
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. Sta. Bull. Circular 347
- Hoff, T., Truong, H-N & Caboche, M. 1994. The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. Plant Cell Environ. 17:489-506
- Huber, T.A. & Streeter, J.G., 1984. Asparagine biosynthesis in soybean nodules. Plant Physiol. 74:605-610
- Huber, T.A. & Streeter, J.G. , 1985 .Purification and properties of asparagine synthetase from soybean root nodules. Plant Sci., 42:9-17
- Hughes, C.A., Beard, H.S. & Matthews, B.F., 1997. Molecular cloning and expression of two cDNAs encoding asparagine synthetase in soybean. Plant Mol. Biol. 33:301-311
- Hungria, M. & Ruschel, A.P., 1982. Eficiência da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. I. Efeito da cultivar de feijão e da estirpe de bactéria. In: XI Reunión Latino Americana de Rhizobium, Lima, Peru, p.60

- Hungria, M. & Neves, M.C.P., 1986. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* com diferentes estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesq. Agrop. Bras.* 21:27-140
- Hungria, M. & Neves, M.C.P., 1987. Cultivar and Rhizobium strain effects on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 103:111-121
- Hungria, M., Barradas, C.A.A. & Wallsgrove, R.M., 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 42:839-844
- Hunt, S. & Layzell, D.B., 1983. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 44:483-511
- Hunt, S., Gaito, S.T. & Layzell, D.B., 1988. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characteristics of the diffusion barrier and estimations of concentrations of CO₂, H₂ and N₂ in the infected cells. *Planta*, 173:128-141
- Hunt, S., King, B.J. & Layzell, D.B., 1989. Effects of gradual increases in O₂ concentration on nodule activity in soybean. *Plant Physiol.* 91:315-321
- Ireland, R.J. & Joy, K.W., 1990. Aminotransferases. IN: *Methods in Plant Biochemistry: Enzymes of Primary Metabolism*. (Dey, P.M. and Harbourne, J.B., eds.) Academic Press London, Vol. 3, pp.277-286.
- Ireland, R.J. & Lea, P.J., 1999. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. IN: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology* (Singh B.K., ed.), Dekker, New York, 1999. pp.48-84.
- Jarrett, H.W., Cooksey, K.D., Ellis, B. & Andersen, J.M., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of aminoacids by reverse-phase chromatography on octylsilic columns. *Anal. Biochem.* 153:189-198
- Job, D., Cochet, C., Dhien, A. & Chambaz, E., 1978. A rapid method for screening inhibitory effects: determination of I₅₀ and its standard deviation. *Anal. Biochem.* 84:68-77

- Jones, R.S., Patterson, R.P. & Raper, C.D.J. 1981. The influence of temperature and nitrate on vegetative growth and nitrogen accumulation by nodulated soybeans. *Plant Soil* 63:333-344
- Joy, K.W., Ireland, R.J. & Lea, P.J., 1983. Asparagine synthesis in pea leaves, and occurrence of an asparagine synthetase inhibitor. *Plant Physiol.* 73:165-168
- Joy, K.W. & Ireland, R.J. 1990. Enzymes of asparagine metabolism. IN: *Methods in Plant Biochemistry: Enzymes of Primary Metabolism* (Dey, P.M. and Harbourne, J.B., eds.) Academic Press, London, Vol. 3, pp.287-296.
- Kim, H.B., Lee, S.H., Lee & Na, C.S., 1999. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding asparagine synthetase from root nodules of *Elaeagnus umbellata*. *Plant Sci.*, 149:85-94
- King, B.J., Layzell, D.B. & Canvin, D.T., 1986 The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules soybean. *Plant Physiol.* 81:200-205
- Lam, H. -M., Coschigan, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, N., M. & Coruzzi, G, 1995. Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7:887-898
- Lam, H. M., Coschigano, K., Schultz, C., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G. M., 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47:569-593
- Larher, F., Goas, G., Lerudilier, D., Gerard, J. & Hamelin, J., 1983. Bound 4-aminobutyric acid in root nodules of *Medicago sativa* and other nitrogen fixing plants. *Plant Sci. Letters* 26:315-326
- Layzell, D.B. & LaRue, Ta, 1982. Modelling C and N transport to developing soybean fruits. *Plant Physiol.* 70:1290-1298

- Layzell, D.B., Hunt, S. & Palmer, G.R., 1990. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules. Pulse-modulated spectroscopy that activity is limited by O₂. *Plant Physiol.* 92:1101-1107
- Lea, P.J. & Fowden, L., 1975. The purification and properties of glutamine-dependent asparagine synthase isolated from *Lupinus albus*. *Proc. Royal Society of London Series B*, 192:13-26
- Lea, P.J., Fowden, L. & Mifflin, B.J., 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. *Phytochemistry* 17 :217-222
- Lea, P.J., Robinson, S.A. & Stewart, G.R., 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. IN: *The Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism*. (Mifflin, B.J. and Lea, P.J., eds.) Vol.16, Academic Press, New York, pp.147-152.
- Lea, J. P. & Ireland, R.J., 1999. Nitrogen Metabolism in higher plant. IN: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology* (Singh, B.K., ed.). Marcel Dekker, New York, pp.1-47.
- Lloyd, N.D.H. & Joy, K.W., 1978. 2-hydroxy-succinamic acid: a product of asparagine metabolism in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81:186-192
- Ling, V., Snedden, W.A., Shelp, B.J. & Assmann, S.M., 1994. Analysis of a soluble calmodulin-binding protein from fava bean roots-identification of glutamate-decarboxylase as a calmodulin-activated enzyme. *Plant Cell* 6:1135-1143
- Lichtenthaler, H.K., Rinderle, U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 19:39-85
- McClure, P.R. & Israel, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants *Plant Physiol.* 64:411-416

- McClure, P.R., Israel, D.W. & Volk, R.J. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans plants. *Plant Physiol.* 66:720-725
- McNeil, D.L. 1979. The interchange of minerals and nitrogenous solutes between the xylem, phloem, and plant tissues of a grain legume. University western Australia, Nedlands, 176p., PhD thesis.
- Marques, I.A., Oberholzer, M.J. & Erismann, K.H., 1983. Effects of different inorganic nitrogen sources on photosynthetic carbon metabolism in primary leaves of nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 71:555-561
- Marur, C.J., Sodek, L. & Magalhães, A.C.N., 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6:103-108
- Marczewski, W., 1989. Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from lupin nodules and roots. *Physiol. Plant.* 76:539-543
- Matsumoto, T., Yatazawa, M. & Yamamoto, Y., 1977. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 18:353-359
- Mosquim, P.R. & Sodek, L., 1992. Parting of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allantoin. *Plant Physiol. Biochem.* 30:451-457
- Neo, H.H. & Layzell, D.B., 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 11:259-267
- Newcomb, W., 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 13:247-298
- Norris D. O. & Date, R. A. 1976. Legume bacteriology. IN: Tropical Pastures Research: Principles and Methods (N. H. Shaw and Bryan, eds.), Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Bull. 51 Hurley, England, pp.134-174.

- Oghoghorie, C.G.O. & Pate, J.S., 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). IN: Technique for measurement and evaluation in physiological terms. IN: Tech. meet. biol. nitrogen fixation. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.) (Lie, T.A and Mulder, E.G, eds.) Plant Soil, Spec. Vol. Int. Biol. Programme, pp.185-202
- Osuna, D., Gálvez, G., Pineda, M. & Aguilar, M., 1999. RT-PCR cloning, characterization and mRNA expression analysis of a cDNA encoding a type II asparagine synthetase in common bean. Biochim. Biophys. 1445:75-85
- Parsons, R., Stanforth, A., Raven, J.A. & Sprent, J.I., 1993. Nodule growth and activity may be regulated by feedback mechanism involving phloem nitrogen. Plant Cell Environ 16:125-136
- Parsons, R. & Baker, A., 1996. Cycling of amino compounds in symbiotic lupin. J. Exp. Bot. 47:421-429
- Pate, J.S., 1962. Root exudation studies on the exchange of ^{14}C labelled organic substance between the roots and shoots of the nodulated legume. Plant Soil 17:333-356
- Pate, J.S. & Wallace, W., 1964. Movement of assimilated nitrogen from the root system to the field pea (*Pisum arvense* L.) Ann. Bot. 28: 80-89
- Pate, J.S., 1971. Movement of nitrogenous solutes in plants. IN: Nitrogen- 15 in Soil-Plant Studies. Int. At. Energy Agency, Vienna, IAEA-P1-341/13, 1971. pp.165-187
- Pate, J.S., 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Sci Biol. Biochem. 5:109-119
- Pate, J. S., Atkins, C. A., Hamel, K., Mcneil, D. L. & Layzell, D. B., 1979. Transport of organic solutes in phloem and xylem of nodulated legume. Plant Physiol. 63:1082-1088

- Pate, J.S., Atkins, C.A., White, S.T., Rainbird, R.M. & Woo, R.C., 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* 65:961-965
- Pate, J. S., 1989. Synthesis, transport, and utilization of products of symbiotic nitrogen fixation. In: *Plant Nitrogen Metabolism* (Poulson, J.E., Romeo and J.T., Conn E.E., eds.), Plenum Press, New York, Vol.23, pp.65-115.
- Peat, J.R., Summerfield, R.J., Jeffcoat, B. and Minchi, F.R., 1981. The role of cotyledons in vegetative growth and nitrogen assimilation by soya bean. *Ann. Bot.* 48:183-187
- Pike, D.C. & Beevers, L., 1982. Kinetic studies on asparagine synthetase from mung beans (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) with a phosphonate analogue of a proposed reaction intermediate. *Biochim. Biophys. Acta* 708:203-209
- Puatti, M., 1997. Mecanismos envolvidos na inibição da nodulação e fixação de N_2 pelo NO_3^- em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa) cultivadas em hidroponia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado
- Puatti, M., Sodek, L, 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 37:767-773
- Radin, J.W., Sell, C.R., Jordan, W.R., 1975. Physiological significance of the in vivo assay for nitrate reductase in cotton seedlings. *Crop Sci.* 15:710-713
- Rainbird, R.M., Thorne, J.H. & Hardy, R.W., 1984. Role of amides, amino acids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 74: 329-334
- Ricard, B., Couée, I., Raymond, P., Saglio, P.H., Saint-Ges, V., Pradet, A., 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* 32:1-10

- Richards, N.G.J. & Schuster, S.M., 1992. An alternative mechanism for the nitrogen transfer reaction in asparagine synthetase. *FEBS Lett.* 313:98-102
- Richards, N.G. & Schuster, S.M., 1998. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis IN: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology: Amino Acid Metabolism*. Wiley, New York, , pp.145-198, Part A.
- Reggiani, R., Cantú, C.A., Brambilla, I. & Bertani, A., 1988. Accumulation and interconversion of amino acids in rice under anoxia. *Plant Cell Physiol.* 29:981-987
- Reggiani, R., Aurisano, N., Manttana, M., Bertani, A. 1993. ABA induces 4 - aminobutyrate accumulation in wheat seedlings. *Phytochemistry* 34:605-606
- Reggiani, R., 1999. Amino acid metabolism under oxygen deficiency. *Curr. Top. Phytochem* 2:171-174
- Reynolds, P.H.S., Boland, M.J. & Farnden, K.J.F., 1981. Enzymes of nitrogen metabolism in legumes nodules: partial purification and properties of the aspartate aminotransferase from lupin nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* 209:524-533
- Reynolds, P.H.S., Blevins, D.G., Boland, M.J., Schubert, K.R. & Randall, D.D., 1982. Enzymes of ammonia assimilation in legumes nodules: A comparison between ureide and amide transporting plants. *Physiol. Plant.* 55:255-260
- Robinson, D.L., Pathirana, S.M., Gantt, J.S and Vance, C.P., 1996. Immunogold localization of nodule-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase in alfafa. *Plant Cell Environ.* 19:602-608
- Rognes, S.E., 1975. Glutamine-dependent asparagine synthetase from *Lupinus luteus*. *Phytochemistry* 14:1975-1982
- Rognes, S.E, 1980. Anion regulation of lupin asparagine synthetase: chloride activation of the glutamine-utilizing reactions. *Phytochemistry* 19:2287-2293

- Romagni, J.G. & Dayan, F.E. 2000. Measuring asparagine synthetase activity in crude plant extracts. *J. Agric. Food Chem.* 48:1662-1696
- Romanov, V.I., Gordon, A.J., Minchin, F.R., Witty, J.R., Skot, L., James, C.L. Borisov, A.Y. & Tikhonovich, I.A., 1995. Anatomy, physiology and biochemistry of root nodules of Sprint-2 Fix; a symbiotically defective mutant of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Exp. Bot.* 46:1809-1816
- Rosendahl, L., Vance, C.P. & Pederson, W.B., 1990. Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* 93:12-19
- Schubert, K.A., 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:539-574
- Schuller, K. R., Turpin, D.H. & Paxton, W.C., 1990. Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 94:1429-1435
- Scott, D.B., Farnden, K.J.F. & Robertson, J.G., 1976. Ammonia assimilation in lupin nodules. *Nature* 263:703-705
- Shelp, B.J. & Atkins, C.A., 1984. Subcellular location of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. *Plant Sci. Lett.* 36:225-230
- Shi et al., 1997. Nitrogen assimilation in alfalfa isolation and characterization asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark adapted leaves. *Plant Cell* 9:1339-1356
- Sieciechowicz, K.A., Joy, K.W. & Ireland, R. J., 1988. The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry* 27:663-671
- Sieciechowicz, K.A. & Ireland, R.J., 1989. Isolation and properties of asparaginase from leaves of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 28:2275-2279

- Smith, M.T., Waters, K.K., Karr, D.B., Preston, G.G., Suzuki, F. & Emerich, D.W. 1995. Nitrate alters the symbiotic expression of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid enzymes in *planta*. *Symbiosis* 18:143-157
- Snapp, S.S. & Vance, C.P., 1986. Asparagine biosynthesis in alfafa (*Medicago sativa* L. roots nodules. *Plant Physiol.* 82:390-395
- Sodek L., Lea, P.J. & Miflin, B.J., 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. *Plant Physiol.* 65:22-27
- Sodek, L. & Lea, P.J., 1993. Asparaginase from the testa of developing lupin and pea seeds. *Phytochemistry* 34:51-56
- Sodek, L. & Silva, D.M., 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8:187-191
- Sousa, C.A.F., 2001. Metabolismo de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. IAC-17) submetidas à deficiência de O₂ no sistema Radicular. Tese de Doutorado. Unicamp
- Sprent, J.I. & Thomas, R.J., 1984. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Plant Cell and Environ.* 7:637-645
- Sprent, J.I., 1981. Functional evolution in some Papilionoid root nodules. IN: *Advances in legume systematics*. (Polhill, R.M., Raven, P., eds.), Her Majesty's Stationery Office, London, Vol.2, pp.671-676
- Stephens, A.S., Gebhardt, J.S., Matthews, B.F. & Wadsworth, G.J., 1998. Purification and preliminary characterization of soybean glyoxysomal aspartate aminotransferase isozymes. *Plant Sci.* 139:233-242

- Streeter, J.G., 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* 63: 478-480
- Streeter, J.G., 1987a. Carbohydrate, organic acid and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiol.* 85:768-773
- Streeter, J.G., 1987b. Effect of nitrate on the organic acid and amino acid composition of legume nodules. *Plant Physiol.* 85:774-779
- Streeter, J.G., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* 7:1-23
- Streeter, J.G., Thompson, J.F., 1972. *In vivo* studies on γ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol.* 49:579-584
- Stulen, I. & Oaks, A., 1977. Asparagine synthetase in corn roots. *Plant Physiol.* 60:680-683
- Tsai, F.Y. & Coruzzi, G.M., 1990. Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. *EMBO J.* 9:323-332
- Tischner, R., 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell Environ.* 23:1005-1024
- Valdez, v., Sinclair, T.R., 2000. Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. *J. Exp. Bot.* 51:1459-1465
- Valverde, C., Wall, L.G. & Huss-Danell, K., 2000. Regulation of nodulation and nodule mass in relation to nitrogenase activity and nitrogen demand in *Discaria trivernis* (Rhamnaceae) seedlings. *Symbiosis*, 28:49-62
- Vance, C.P. & Stade, S., 1984. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75:261-264
- Vance, C. P. & Heichel, G.H., 1991. Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 42:373-392

- Vance, C. P. & Gantt, J.S., 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant.* 85:266-274
- Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S. & Gant, J.S., 1994. Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules-molecular-features of the enzymes involved. *Plant Sci.* 101:51-64
- Vincent, J.M., 1970. A manual for practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 164p.
- Vogels, G.D. & Van Der Drift, C., 1970. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33:143-157
- Wallace, W., 1966. The assimilation of nitrate in higher plants. Queen's University, Belfast Northern Ireland. PhD thesis
- Wallace, W. & Pate, J.S. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (*Xanthium pennsylvanicum* Wallr.). *Ann. Bot.* 31:213-228
- Wallace, W., 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiol. Plant.* 66:630-639
- Waterhouse, R.N., Smyth, A.J., Massonneau, A., Prosser, I.M. & Clarkson, D.T., 1996. Molecular cloning and characterisation of asparagin synthetase from *Lotus japonicus*. Dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant Mol. Biol.* 30:883-897
- White, M.E., Decker, A.M., Chaney, R.L., 1981. Metal complexation in xylem fluid. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. *Plant Physiol.* 67:292-399
- Yemm, E.M. & Cocking, E.C., 1955. Estimation of amino acids by ninhydrin. *Analyst* 80:209-213
- Yoneyama, A.N. & Ishizuki, J., 1982. ^{15}N study on the partitioning of the nitrogen taken by soybean from atmospheric dinitrogen, medium nitrate or ammonium. *Soil Sci. Plant Nut.* 28:451-461