UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LUCIANO DO AMARANTE

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

TRANSPORTE E METABOLISMO DE GLUTAMINA EM SOJA [*Glycine max* (L.) Merril]: UMA RELAÇÃO ESTREITA COM A FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
LUCIANO DO AMARANTE
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

Nº CHAMADA T/UNICAMP
Am13t
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 50867
PROC 16-837/02
C ____ D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 12/09/02
Nº CPD ____

CM00173041-8

BIB ID 257451

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Amarante, Luciano

Am13t Transporte e metabolismo de glutamina em soja{*Glycine max* (L.) Merril}: uma relação estreita com a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico/Luciano Amarante. --
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

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

1. Soja. 2. Glutamina. 3. Transporte. 4. Fixação simbiótica. I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 05/08/2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador) _____

Prof. Dr. Paulo Mazzafera _____

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato _____

Prof. Dr. José Ronaldo Magalhães _____

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo _____

Prof. Dr. Jorge Veja _____

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama _____

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas e à Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Professor Ladaslav Sodek pela orientação, apoio e amizade;

Aos Professores Cláudia Haddad, Marlene Schiavinato e Paulo Mazzafera pelas críticas e sugestões à tese;

A todos os professores, colegas e funcionários da UNICAMP que colaboraram para a realização deste trabalho;

À minha família pelo incentivo durante todo o período de curso;

À colega e amiga Professora Denise Colares pela compreensão e apoio prestado.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE

BANCA EXAMINADORA iii

AGRADECIMENTOS iv

ÍNDICE v

ABREVIATURAS ix

RESUMO xi

SUMMARY xiii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Fixação de N_2 e atividade dos nódulos em leguminosas: aspectos básicos 1

1.2. Síntese e transporte de compostos nitrogenados em leguminosas fixando o N_2 simbioticamente 6

2. OBJETIVOS 17

3. MATERIAL E MÉTODOS 18

3.1. Material vegetal e condições de cultivo 18

3.2. Inóculo: Origem, manutenção e multiplicação 19

3.3. Soluções nutritivas 20

3.4. Tratamentos 21

3.4.1. Influência do NO_3^- e do NH_4^+ sobre o transporte de N em plantas noduladas de soja 21

3.4.2. Transporte de N em soja nodulada após transferência para hidroponia 22

3.4.3. Transporte e metabolismo de glutamina em plantas noduladas de soja após transferência para hidroponia e posterior replantio em vermiculita 23

3.4.4. Inundação de soja nodulada: efeito de diferentes tempos de inundação e supressão do tratamento no transporte de N do xilema 23

3.4.5. Efeito de curtos períodos de alagamento de plantas noduladas de soja sobre o

transporte de N no xilema..... 24

3.4.6. Efeito de tratamentos específicos à inibição da fixação de N_2..... 25

3.4.7. Atividade da glutamina sintetase e transporte de nitrogênio em soja em diferentes estádios do processo de nodulação..... 27

3.4.8. Avaliação do transporte de N em leguminosas transportadoras e não transportadoras de ureídeos sob inundação ou presença de NO_3^-..... 27

3.4.8.1.Material vegetal, condições de cultivo e inóculos..... 27

3.4.8.2. Tratamentos empregados..... 29

3.5. Métodos analíticos..... 30

3.5.1. Coleta de exsudato do xilema..... 30

3.5.2. Coleta de exsudato de floema..... 30

3.5.3. Extração de aminoácidos de raízes, nódulos e folhas..... 31

3.5.4. Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema e de floema e de extrato de raízes, de nódulos e de folhas..... 32

3.5.5. Dosagem de aminoácidos solúveis livres totais (ALT)..... 33

3.5.6. Quantificação de ureídeos totais (URE)..... 34

3.5.7. Dosagem de nitrato (NO_3^-)..... 35

3.5.8.Dosagem da concentração de oxigênio..... 35

3.5.9. Dosagem das enzimas da assimilação da amônia nas raízes e nos nódulos..... 36

3.5.9.1. Glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2)..... 36

3.5.9.1.1. Extração..... 36

3.5.9.1.2. Dosagem da atividade..... 37

3.5.9.2. Glutamato sintase dependente de NADH (EC 1.4.1.14)..... 39

3.5.9.2.1. Extração 39
3.5.9.2.2. Dosagem da atividade 40
3.5.10. Determinação do teor de clorofilas 41
3.6. Delineamento experimental 42
4. Resultados e Discussão 43
4.1. Composição nitrogenada da seiva e constituinte do sistema aéreo e radicular de plantas noduladas e não-noduladas de soja 43
4.1.1. Na presença e ausência de nitrato 43
4.1.2. Na presença de amônio 50
4.2. Transporte de N em soja nodulada após transferência para sistema hidropônico 52
4.3. Transporte e metabolismo de glutamina em soja após inibição e recuperação da fixação de nitrogênio 62
4.4. Inundação de soja nodulada: efeito de diferentes tempos de inundação e supressão dos tratamentos sobre a recuperação da composição nitrogenada transportada no xilema 86
4.5. Efeito do alagamento do sistema radicular de plantas de soja nodulada na presença e ausência de aeração sob o transporte de glutamina e de ureídeos 91
4.6. Transporte de glutamina e de ureídeos em soja nodulada sob efeito da ausência de N_2 atmosférico e de O_2 101
4.7. Atividade da glutamina sintetase e transporte de nitrogênio em soja em diferentes estádios do processo de nodulação 108
4.8. Efeito do alagamento e do nitrato sobre a composição nitrogenada da seiva do xilema de espécies leguminosas transportadoras e não transportadoras de ureídeos 114
4.8.1. Soja 114
4.8.2. Feijão-de-corda 117

4.8.3. Feijão..... 118
4.8.4. Crotalária..... 121
4.8.5. Ervilha..... 123
4.8.6. Tremoço..... 125
4.8.7. Discussão geral..... 127
5. CONCLUSÕES..... 133
6. LITERATURA CITADA..... 134

ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
ALT	aminoácidos livres solúveis totais
ATP	trifosfato de adenosina
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etileno-diamina-tetracético
GABA	ácido gama-aminobutírico
GOGAT	glutamato sintase
GS	glutamina sintetase
°C	grau centígrado
Hepes	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etano-sulfônico]
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
imidazol	1,3-diaza-2,4-ciclopentadieno
α-KG	2-oxoglutarato
MCW	metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v/v/v)
MF	massa fresca
NAD^+	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADH-GOGAT	glutamina sintase dependente de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
$O^{\bullet}{}_2^-$	radical ânion superóxido
OPA	orto-fitaldialdeído
$OH^{\bullet}$	radical hidroxila

pO_2	pressão parcial de O_2
PVDF	polivinilidenodifluoreto
PVP	polivinilpirrolidona
PVPP	polivinilpolipirrolidona
TCA	ácido tricloroacético
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
URE	ureídeos totais (alantoína e ácido alantóico)

RESUMO

Plantas de soja noduladas fixando plenamente o N_2, cultivadas na ausência de N-combinado, contêm níveis relativamente altos de GLN como forma de transporte de N no xilema (cerca de 20-25 em mol % do total de aminoácidos) comparadas a plantas não-noduladas nutridas com NO_3^- (cerca de 1-2 em mol % do total de aminoácidos). Experimentos que levaram à redução da fixação de N_2, avaliados pela redução do teor de URE na seiva do xilema, como a aplicação de NO_3^-, transferência das plantas para sistema hidropônico com aeração, inundação do sistema radicular, substituição do ar da rizosfera com N_2 ou mistura argônio:oxigênio (80:20), conduziram a uma redução severa e específica dos níveis de GLN. A remoção manual dos nódulos do sistema radicular produziu o mesmo efeito. Além disso, durante o crescimento das plantas foi observado um aumento substancial dos níveis de GLN correspondentes à fase de formação dos nódulos e o início da fixação plena de N_2 em soja, em paralelo ao aumento de ureídeos e atividade da GS. Aumentos concomitantes dos níveis de GLN e de URE também foram observados quando plantas noduladas de soja, cultivadas em vermiculita sem N e transferidas para hidroponia, na presença ou ausência de N, ou inundadas, foram replantadas em vermiculita ou tiveram a inundação suprimida através da drenagem. A NADH-GOGAT nos nódulos parece ter uma relação direta com níveis de GLN transportados no xilema, partindo da observação da queda e posterior elevação da atividade da enzima em paralelo aos níveis de GLN nos tratamentos de hidroponia na presença e ausência de NO_3^- e posterior replantio em vermiculita sem N, respectivamente. As mudanças de atividade da GS em nódulos foram muito menos pronunciadas, sugerindo elevada estabilidade da enzima sob os tratamentos com hidroponia. A composição nitrogenada da seiva do xilema das plantas inundadas de soja mostrou uma queda considerável dos níveis de GLN, 10 minutos após início do tratamento, alcançando valores muito baixos dentro de 30 min. Uma inibição concomitante

do teor de URE foi obtida nesses tratamentos. Apesar da evidência de que a atividade dos nódulos esteja relacionada às flutuações dos níveis de GLN, foram encontrados teores mínimos desse aminoácido nos nódulos, não sofrendo variações detectáveis com a aplicação dos tratamentos. As reduções de GLN no xilema também não mostraram uma correspondência com os níveis de GLN do floema, raízes e folhas. Os tratamentos inibitórios à fixação de N_2 como a aplicação de NO_3^- e inundação também causaram uma redução dos níveis de GLN em espécies de leguminosas exportadoras de amidas e em ambos os teores de GLN e de URE em outras espécies de leguminosas que exportam preferencialmente URE, sugerindo ser este um efeito comum em leguminosas que transportam GLN. Coletivamente, as mudanças da composição aminoacídica do xilema frente aos diferentes tratamentos utilizados indicam que o nível de GLN transportado no xilema está fortemente associado com a atividade dos nódulos.

SUMMARY

Nodulated soybean plants, fully dependent on N_2 fixation, cultivated with N-deficient nutrient solution, contain relatively high levels of GLN in N transport of the xylem (around 20-25 mol % of total amino acids) compared to non-nodulated plants grown on nitrate (around 1-2 mol % of total amino acids). Experiments that lead to reduced N_2 fixation, judged by xylem sap ureide levels, such as NO_3^- application, transfer of plants to aerated hydroponic culture, waterlogging of the root system, substitution of air in the rhizosphere with nitrogen or a mixture of argon:oxygen (80:20), lead to severe and specific reduced GLN levels. Manual removal of the nodules from the root system produced the same effect. Furthermore, during the growth cycle of the plants, a substantial increase in GLN levels was observed corresponding to the phase of nodule formation and beggining of N_2 fixation, in parallel with increases in ureide levels and GS activity. Concomitant increases in GLN and ureide levels were observed, when nodulated soybean plants cultivated in vermiculite without N and transfered to hydroponic culture with or without N or waterlogging, were returned to vermiculite or the waterlogging treatment was suppressed by drainage. In nodules, NADH-GOGAT activity seems to be directly correlated with GLN levels transported in the xylem, judging by the decline and posterior elevation of enzyme activity in parallel with GLN levels in the hydroponic treatments with or without N and when plants were returned to vermiculite without N, respectively. Changes in GS activity in nodules were much less pronounced suggesting high enzyme stability under hydroponic treatment. The xylem sap nitrogen composition of waterlogged plants showed a considerable fall in glutamine levels, ten minutes after the treatment had initiated, reaching very low levels within 30 minutes. A concomitant inhibition in ureide contents was observed. Despite the evidence that nodule activity underlies the flutuations of GLN levels in the xylem, very low levels in the nodule were found, which

suffered no detectable variation after the treatments applied. Decreases in xylem GLN were not associated with GLN levels in phloem, roots or leaves. Inhibitory effects on nitrogen fixation such as NO_3^- application and waterlogging caused a reduction in GLN in amide exporting legumes and in both GLN and ureide levels in other URE exporting legume species, suggesting a common effect in GLN exporting legumes. Collectively, changes in amino acid xylem composition under the several treatments tested indicated that GLN levels transported in xylem are largely associated with nodule activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fixação de N_2 e atividade dos nódulos em leguminosas: aspectos básicos

O nitrogênio é um elemento essencial para as plantas e freqüentemente, um fator limitante do crescimento das culturas. Em conseqüência, grandes quantidades de fertilizantes são aplicadas nas plantas cultivadas, o que constitui um processo caro e consumidor de energia (Day *et al.*, 2001).

Algumas espécies de plantas, muitas delas leguminosas, como a soja, associam-se simbioticamente com bactérias do solo, que se tornam capazes de reduzir o N_2 atmosférico, satisfazendo o requerimento de N da planta, num processo denominado fixação simbiótica do nitrogênio. Essas espécies são capazes de crescer sem a adição de fertilizantes nitrogenados, com vantagens evidentes para a agricultura sustentável (Day *et al.*, 2001; Poole & Allaway, 2000).

A soja tem grande importância na agricultura mundial, oferecendo proteína de alta qualidade (Balestrasse et al., 2001). Ao ser cultivada em simbiose com *Bradyrhizobium*, contribui para o aumento da entrada de nitrogênio combinado no solo, atingindo alta produtividade, o que resulta numa economia superior a três bilhões de dólares por safra em fertilizantes nitrogenados em nosso país (Dobereiner, 1997).

A conversão biológica do N_2 atmosférico em NH_4^+ é realizada pelos bacteróides, células especializadas de rizóbio, inclusas em células infectadas do tecido central dos nódulos da planta hospedeira, por meio da operação do sistema enzimático nitrogenase (Udvardi & Day, 1997).

Com a finalidade de que a fixação de N_2 seja mantida e traga o máximo de beneficio à planta hospedeira, as células dos nódulos e das bactérias em simbiose devem ser supridas eficientemente com substratos ricos em energia gerados pela fotossíntese da planta hospedeira.

Uma vez que os bacteróides não têm nenhuma capacidade fermentativa e os produtos de fermentação da planta hospedeira são inibitórios para o metabolismo vegetal, os sistemas de transporte de elétrons de ambos, hospedeiro e simbionte, não devem ser limitados pela disponibilidade de O_2, de forma que suas oxidases terminais sejam supridas com O_2 suficiente para manter uma geração eficiente de ATP (Robson & Postgate, 1980). Por outro lado, a nitrogenase, extremamente lábil ao O_2, é desnaturada com 5 mmol O_2/m^3 (Sheehy & Thornley, 1988). Porém as espécies de rizóbio são estritamente dependentes da energia respiratória (Appleby, 1984) e o funcionamento da nitrogenase também necessita do O_2 como o aceptor final de elétrons para a produção de ATP. Essas condições levaram as leguminosas a incorporar vários mecanismos no nódulo com a finalidade de criar um ambiente microaeróbico altamente regulado (Guash *et al.*, 2001), de forma que o O_2 aos nódulos é fornecido por fluxos adequados de O_2 sob baixas concentrações, dissolvido no citoplasma das células infectadas dos nódulos (Bergersen, 1997b).

Vários mecanismos de regulação da difusão de oxigênio em leguminosas têm sido propostos, envolvendo o córtex do nódulo e a região infectada (contendo o bacteróide). A barreira de difusão ao oxigênio, localizada no córtex interno e córtex central, foi sugerida como o principal mecanismo de regulação do O_2 (Minchin, 1997).

Evidências anatômicas recentes sugerem que as células do córtex interno são osmocontráteis e podem reduzir o tamanho dos espaços intercelulares e/ou expulsar água para o seu interior (Serraj *et al.*, 1995). Essa idéia é apoiada pelo desaparecimento induzido do O_2 dos espaços intercelulares, das células da zona de distribuição do córtex interno do nódulo após 1-2 min de tratamento com O_2 40 % (Witty *et al.*, 1987). A mesma velocidade de resposta foi observada em relação à despolarização de membrana dentro dos nódulos, com o auxílio de microeletrodo de O_2 (Deninson & Kinraide, 1995). Microanálises de raios-X evidenciaram mudanças no equilíbrio dos íons Ca^{2+} e K^+ no córtex interno de nódulos de soja

ocorrendo no período de 10-15 min de tratamento (Minchin *et al.* (1995) citado por Minchin, 1997).

A expulsão rápida de glicoproteínas (e outros materiais oclusivos) pode também apoiar o mecanismo osmótico, apesar desses materiais não terem sido observados em células do córtex interno (Minchin, 1997). No entanto, há evidências do aumento de oclusões nos espaços intercelulares do córtex central dos nódulos de soja e tremoço. Estudos com imunomarcação estabeleceram que essas oclusões contém glicoproteínas (James *et al.*, 1991; Ianneta *et al.*, 1993a), o que é apoiado por resultados com ELISA, mostrando aumentos substanciais nos antígenos MAC236 e MAC65 para as glicoproteínas (Ianneta *et al.*, 1993b; de Lorenzo *et al.*, 1993). Em nódulos de tremoço foi demonstrado que essas oclusões nos espaços intercelulares podem ocorrer dentro de 15 min de exposição a 50 % de O_2 (Iannetta *et al.*, 1995). As oclusões funcionariam como um gel rígido, com resistência alta à difusão gasosa, de forma a forçar a difusão lenta do O_2 na fase líquida dentro das paredes celulares e células (Minchin, 1997).

Contrariamente aos demais resultados, Van Cauwenberghe *et al.* (1994) registraram uma rede contínua de poros abertos ao longo do córtex de nódulos de soja, a qual não sofreu interferência da exposição a 80 % de O_2 por 2 horas. A nitrogenase também não foi afetada por esse tratamento, o que levou aos pesquisadores concluirem que a proteção contra o O_2 não estava situada no córtex.

Há no entanto, várias razões para que parte da barreira de difusão ao O_2 esteja situada dentro da região infectada, como uma maior rapidez de resposta considerando as células infectadas como o sítio sensível ao O_2 (Van Cauwenberghe *et al.*, 1994), a dificuldade em se obter um controle fino de suprimento de O_2 no interior de uma barreira cortical e, no caso de leguminosas que produzem ureídeos, a necessidade de altas taxas de suprimento de O_2 às células intersticiais não-infectadas para a reação da uricase. A ocorrência da uricase nas

células não-infectadas é uma conseqüência dos níveis relativamente mais altos de oxigênio nessas células. Apesar de existir uma taxa alta de transferência de oxigênio aos sítios respiratórios nas células infectadas, o grande consumo de oxigênio juntamente com a ocorrência da leg-hemoglobina asseguram que os níveis de O_2 livre sejam extremamente baixos (10-200 nM) (Atkins, 1987). O Km (O_2) para a uricase de ambos, feijão-de-corda e soja é cerca de 30 μM (Rainbird & Atkins, 1981), indicando que a enzima não poderia funcionar eficientemente nas células infectadas. Além disso, o Km(O_2) da uricase é 100 vezes mais alto que o valor da pressão parcial de O_2 (pO_2) limiar, para o funcionamento da nitrogenase, acima do qual é inibida irreversivelmente (cerca de 300 nM) (Robson & Postgate, 1980). Em células que não contêm leg-hemoglobina são encontrados níveis mais altos de O_2 livre, os quais devem estar próximos do equilíbrio com o ar, cerca de 200 μM (Atkins, 1987). Os modelos matemáticos atuais sugerem um nível de regulação do O_2 pelas células infectadas, fundamentados nessas informações (Minchin, 1997).

A leg-hemoglobina exerce uma função regulatória (Appleby, 1984), uma vez que libera o O_2 diretamente aos bacteróides e permite uma concentração de O_2 livre muito baixa ao longo do percurso de O_2 na maioria das células infectadas. A saturação de leg-hemoglobina próxima aos espaços intercelulares pode contribuir com à difusão limitada do O_2 (Thumfort *et al.*, 1994). Além disso, a respiração do bacteróide e da mitocôndria podem também funcionar como um dreno para o O_2 e regular o fluxo desse gás (Bergersen, 1997 a,b).

A possibilidade de formação de ligações entre glicoproteínas, lectinas e isoflavonas nos espaços dos simbiossomos, no citossol, paredes celulares e espaços intercelulares da região infectada, como um mecanismo de regulação do O_2, não pode ser descartada (Minchin, 1997).

Thumfort *et al.* (1999) propuseram um modelo de difusão de O_2 em nódulos de leguminosas que produzem ureídeos, considerando não somente as células infectadas, mas as células adjacentes, não infectadas. O modelo considerou uma distribuição compartimentalizada da concentração de O_2, por meio de um fluxo significante de O_2, entre os dois tipos de células, de forma a manter altas concentrações de O_2 nas células não infectadas e necessárias para a operação eficiente da uricase e síntese de ureídeos e baixa concentração de O_2 na maioria das células infectadas, fornecendo um ambiente adequado para a fixação de N_2. Os resultados sugerem uma resistência significativa para a difusão do O_2 através da interface célula:célula devido à plasmalema e paredes celulares.

Condições que levaram a um decréscimo da atividade da nitrogenase, como alagamento (Pugh *et al.*, 1995), estresse salino (Serraj *et al.*, 1995), temperatura (Kuzma & Layzell, 1994), nitrato (Arrese-Igor *et al.*, 1997) e deficiência hídrica (Diaz del Castillo *et al.*, 1994) causaram um aumento da resistência à difusão de O_2 nos nódulos. Essas diminuições da atividade da nitrogenase foram pelo menos parcialmente recuperadas pelo aumento da concentração externa de O_2 (Minchin *et al.*, 1992; Ianetta *et al.*, 1993a; De Lorenzo *et al.*, 1993; Hunt & Layzell, 1993).

A possibilidade da regulação da fixação de N_2 pela planta hospedeira do rizóbio, conduziu também à hipótese de que os níveis de N do floema atuem como reguladores da fixação de N_2, por meio do controle da barreira de difusão de O_2. No modelo proposto, um conjunto de fatores além de alterações do conteúdo de N do floema, como mudanças das taxas de suprimento de carbono, produção e exportação de amidas ou ureídeos e mudanças no suprimento de oxigênio, influenciariam a concentração de um composto-chave, nitrogenado e reduzido, no córtex, provavelmente um aminoácido. A concentração desse composto-chave, regularia a barreira de difusão de O_2 por meio dos mecanismos já mencionados, como por

exemplo, conteúdo gás/água ou deposição de glicoproteínas nos espaços intercelulares (Parsons *et al.*, 1993).

1.2. Síntese e transporte de compostos nitrogenados em leguminosas fixando o N_2 simbioticamente

O NH_4^+ é o primeiro produto estável da fixação do N_2 (Bergersen, 1965; Kennedy, 1966). Uma vez produzido, é excretado pelos rizóbios (Bergersen & Turner, 1967) para a célula hospedeira, onde é assimilado no citoplasma e em organelas e usado para a síntese de N orgânico para transporte (Schubert, 1986; Crawford *et al.*, 2000).

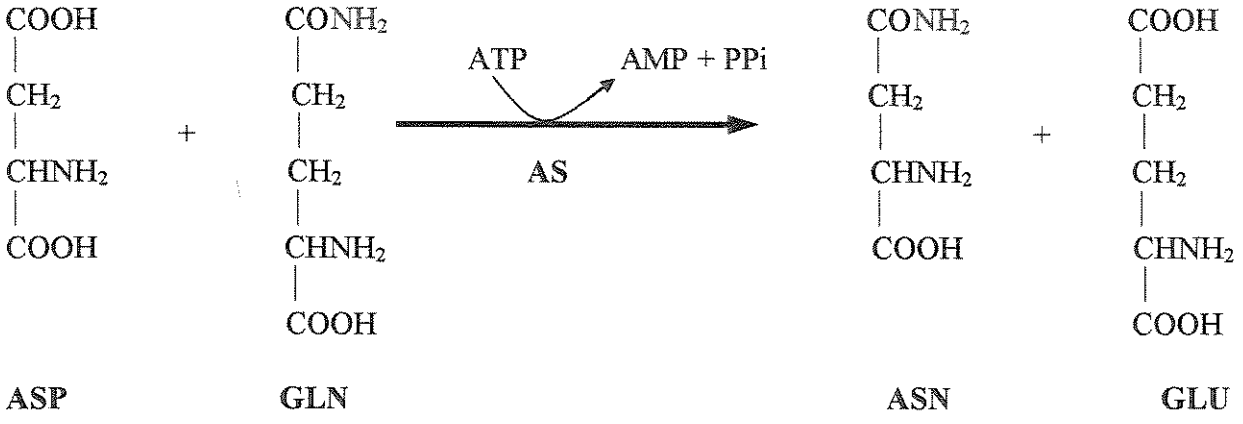
A assimilação inicial do NH_4^+ recém fixado, envolve sua conversão em GLN, a qual terá um destino metabólico dependente do tipo de compostos nitrogenados utilizados no transporte pela planta hospedeira do rizóbio (Crawford *et al.*, 2000).

A GS (glutamina sintetase; EC 6.3.1.2) catalisa a aminação, dependente de ATP, do glutamato (GLU) em glutamina (GLN), utilizando NH_4^+ e 2-oxoglutarato (α-KG) como substratos. Uma vez sintetizada, parte da GLN poderá ser transportada, porém a maior proporção participa da síntese de outros aminoácidos, principalmente asparagina (ASN), ou mesmo outros compostos nitrogenados, como ureídeos, principal forma de transporte de N em plantas simbióticas tropicais, como a soja. A conversão da GLN em outros aminoácidos envolve, inicialmente, a ação da glutamato sintase, NADH-GOGAT (EC 1.4.1.13) que catalisa a transferência do grupo δ-amino da glutamina para a posição α-ceto do α-KG, produzindo duas moléculas de GLU, às custas do poder redutor fornecido pelo NADH (Lea & Ireland, 1999).

Uma vez que o NH_4^+ foi assimilado pelo ciclo GS/GOGAT, o GLU pode ser rapidamente convertido em outros aminoácidos pela ação das transaminases. Uma dessas

enzimas é essencial para a formação de aspartato (ASP), necessário para síntese de ASN: envolve a transaminação entre GLU e oxaloacetato (OAA) pela ação da glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), produzindo ASP e α-KG (Lea & Ireland, 1999). Portanto, a GOGAT, juntamente com a GS, mantém o fluxo de N a partir do NH_4^+ em GLN e GLU (Lea *et al.*, 1990).

A ASN, um dos principais produtos da fixação de N_2, é formada via ação da enzima asparagina sintetase (AS), a partir de ASP e GLN, com hidrólise simultânea de ATP em AMP (Lea & Fowden, 1975; Shi *et al.*, 1997). Neste caso, a GLN tem o papel de doador de N para formar o grupo amida:



Esta enzima foi purificada de nódulos de soja (Huber & Streeter, 1984; 1985) e a sua especificidade para GLN demonstrada, ao contrário do observado em outros organismos onde o NH_4^+ desempenha o papel de doador de N (Lea & Fowden, 1975; Shi *et al.*, 1997).

As plantas fixadoras de N_2 podem ser classificadas em exportadoras de amidas ou de ureídeos baseando-se na composição do fluído do xilema, coletado de sistemas radiculares nodulados ou de nódulos excisados. As plantas exportadoras de amidas transportam ASN,

GLN e 4-metilenoglutamina, enquanto que as exportadoras de ureídeos transportam alantoína, ácido alantóico ou citrulina (Schubert, 1986).

As leguminosas originárias de regiões temperadas são geralmente exportadoras de amidas, como as pertencentes às tribos Viciae, Genisteae e Trifoliae (Schubert, 1986). Exemplos são ervilha, tremoço, feijão-fava, alfafa e trevo. As leguminosas de clima tropical da tribo Phaseoleae sintetizam e transportam ureídeos como principal forma de N, como feijão-de-corda, feijão e soja (Pate *et al.*, 1980; Schubert, 1986; Sprent, 1981).

Em soja nodulada, o transporte de N no xilema é caracterizado pelos ureídeos, ácido alantóico e alantoína, que representam até cerca de 80 % do N translocado (McClure & Israel, 1979) e são considerados produtos específicos da fixação de nitrogênio (McClure *et al.*, 1980). Em quantidades menores são encontradas as amidas ASN e GLN. Teores relativamente altos de GLN transportada na seiva do xilema são observados em plantas de soja cuja fixação do N_2 se torna ativa (Puiatti & Sodek, 1999). Plantas não noduladas crescendo sob NO_3^- contêm quantidade baixa ou traços de ureídeos no fluxo do xilema, e ASN apresenta-se como a principal forma de transporte de N (Matsumoto et al., 1977; McClure & Israel, 1979; Ohyama & Kumazawa, 1979).

O teor de ureídeos no xilema tem sido usado como indicador da eficiência da fixação de N_2, uma vez que concentrações altas de ureídeos no xilema de leguminosas estão usualmente associadas com nodulação efetiva e altas taxas de fixação de N_2 (Streeter, 1979; Pate *et al.*,1980; Herridge, 1982; Herridge *et al.*, 1990).

Existem evidências consistentes de que os ureídeos são sintetizados como produtos do N recém fixado em nódulos radiculares de leguminosas tropicais. Após 10 minutos de exposição de nódulos de soja ao $^{13}N_2$, 40 % da radioatividade foi encontrada no ácido alantóico. Em experimentos similares com feijão-de-corda, os ureídeos foram responsáveis por

mais de 90 % do ^{15}N no exsudato do xilema, duas horas após a exposição dos nódulos ao $^{15}N_2$ (Lea, 1999).

A alantoina e o ácido alantóico são produtos secundários do metabolismo do nitrogênio no sentido de que são formados a partir de N-amínico e amídico, incorporados nos produtos iniciais da fixação de NH_4^+ (Atkins & Beevers, 1990). A rota biossintética de ureídeos em nódulos de leguminosas é longa e complexa. A alantoína e o ácido alantóico são derivados da purina inosina monofosfato (IMP), a qual é sintetizada a partir de ribose 5-P e requer entrada de N a partir de GLN, ASP e GLY (glicina) (Lea, 1999).

Em nódulos, as purinas para a biossíntese de ureídeos são sintetizadas *de novo*. Aparentemente isso não era esperado ao se considerar a rapidez com que os ureídeos são marcados quando os nódulos são expostos ao N_2 radioativo e o grande fluxo de N exportado como ureídeos a partir dos nódulos (Ohyama & Kumazawa,1978; Schubert, 1986).

A primeira evidência direta de que a alantoína é derivada da síntese *de novo* de purinas em nódulos de feijão-de-corda é proveniente da demonstração de que fragmentos de tecido de nódulos rapidamente incorporavam [^{14}C]glicina na fração do glioxilato do ácido alantóico (Atkins *et al.*, 1980b). Subseqüentemente, preparações livres de células a partir de nódulos de feijão-de-corda e de soja (Atkins *et al.* 1982; Boland & Schubert, 1983; Boland *et al.* 1982; Shelp & Atkins, 1983) formaram nucleotídeos de purina a partir de GLN, ASP, GLY e CO_2, uma fonte de "unidades de C_1 ativadas", como metenil e formil – tetraidrofolato (THFA), Mg^{2+}-ATP e Mg^{2+}-PRPP (fosforribosilpirofosfato), a taxas proporcionais à fixação simbiótica do N_2. A origem dos átomos de C e de N da estrutura do anel da purina IMP está representada no esquema 1. Apesar dos precursores desses átomos provavelmente fornecerem C e N para a síntese de purina nos nódulos (Atkins *et al.*, 1982), estudos mais detalhados com marcadores que confirmem essa hipótese, ainda não foram conduzidos (Atkins & Beevers, 1990). Resultados de GC-MS do metabolismo de glicina numa suspensão de cultura de

células de cenoura, demonstraram, pela primeira vez em plantas, a hipótese de marcação de adenina consistente com a incorporação de GLY no anel de purina e o suprimento do C de metileno da GLY à estrutura por meio da SER hidroximetil transferase (Whatley *et al* 1986).

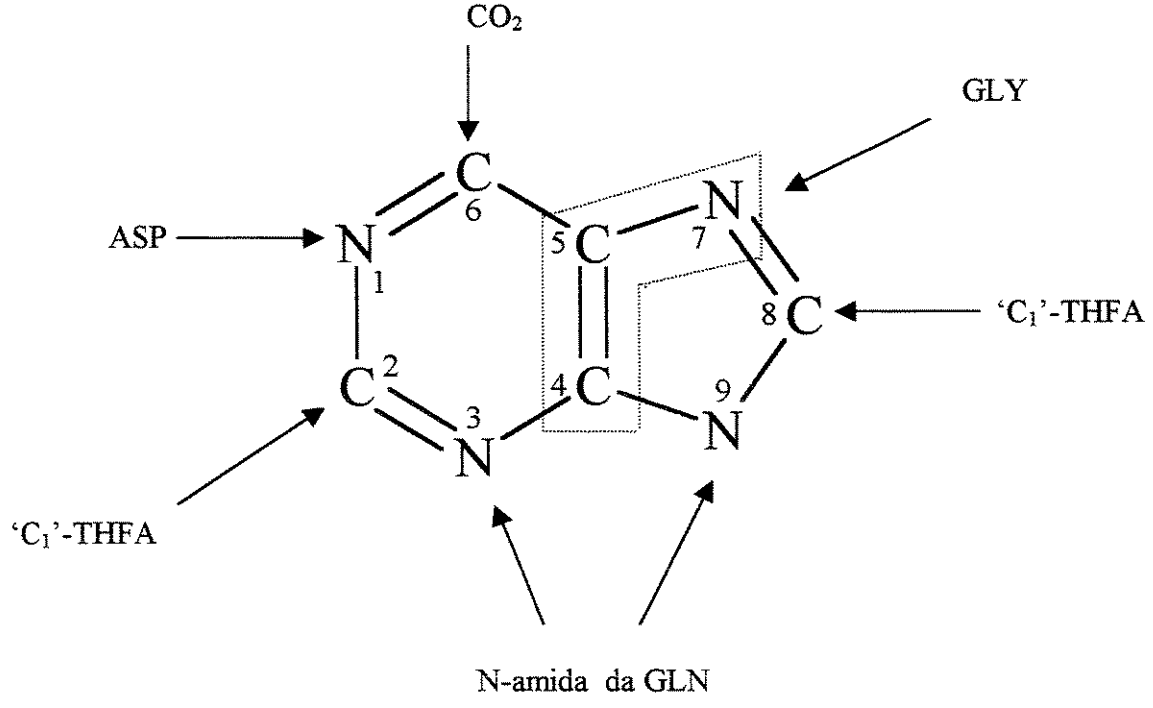
Hanks *et al.* (1983) fracionando protoplastos de células infectadas e não infectadas de nódulos de soja, enquanto Shelp *et al.* (1983) separando os dois tipos de células a partir de nódulos de feijão-de-corda, não obtiveram uma separação completamente clara entre as atividades enzimáticas das frações celulares isoladas. No entanto, os resultados de cada caso, foram qualitativamente semelhantes, conduzindo à formulação de um modelo (esquema 2) que considera a assimilação do NH_4^+, a síntese *de novo* e a oxidação de purinas, além da formação de ácido úrico, nas células infectadas, com o metabolismo subseqüente do ácido úrico em microcorpos (peroxissomos) de células não infectadas.

A síntese *de novo* se processa por uma série de reações que requerem PRPP, GLN, ASP, CO_2, GLY, metenil-THFA, e formil-THFA. Os níveis das enzimas envolvidas na síntese de purinas (como a PRPP amida transferase) e na síntese de precursores de purina - PRPP sintetase, fosfoglicerato (PGA) desidrogenase, serina (SER) hidroximetilase e metileno-THFA desidrogenase - elevam-se várias vezes nos nódulos de leguminosas produtoras de ureídeos, em relação às espécies que exportam amidas (Atkins *et al.*, 1984c; Reynolds *et al.*, 1982a; Reynolds *et al.*, 1982b).

A atividade dessas enzimas juntamente com a GS, GOGAT e aspartato aminotransferase são induzidas assim que a fixação de N_2 e exportação de ureídeos são iniciadas (Atkins *et al.*, 1982; Atkins *et al.*, 1984c; Reynolds *et al.*, 1982a,b).

Apesar de IMP ter sido detectado como o produto inicial dos nucleotídeos da seqüência de purinas (Atkins *et al.*, 1982), os nódulos contêm uma IMP desidrogenase dependente de NAD^+ (Shelp & Atkins, 1983; Shelp *et al.*, 1985), que oxida prontamente IMP a XMP.

Muito esforço foi realizado para definir a localização celular e subcelular das enzimas componentes da síntese de ureídeos em nódulos de soja e feijão-de-corda (Atkins & Beevers, 1990). A localização celular e subcelular dessas reações não foi ainda completamente elucidada, constituindo ainda um tema de certa controvérsia (Atkins *et* al., 1997; Lea & Ireland, 1999; Morot-Gaudry *et al.*, 2001) A partir do fracionamento de extrato centrifugado em gradiente de densidade de sacarose, foi verificado que as vias são altamente compartimentalizadas, envolvendo várias organelas e diferentes tipos de células (esquema 2) (Atkins & Beevers, 1990).

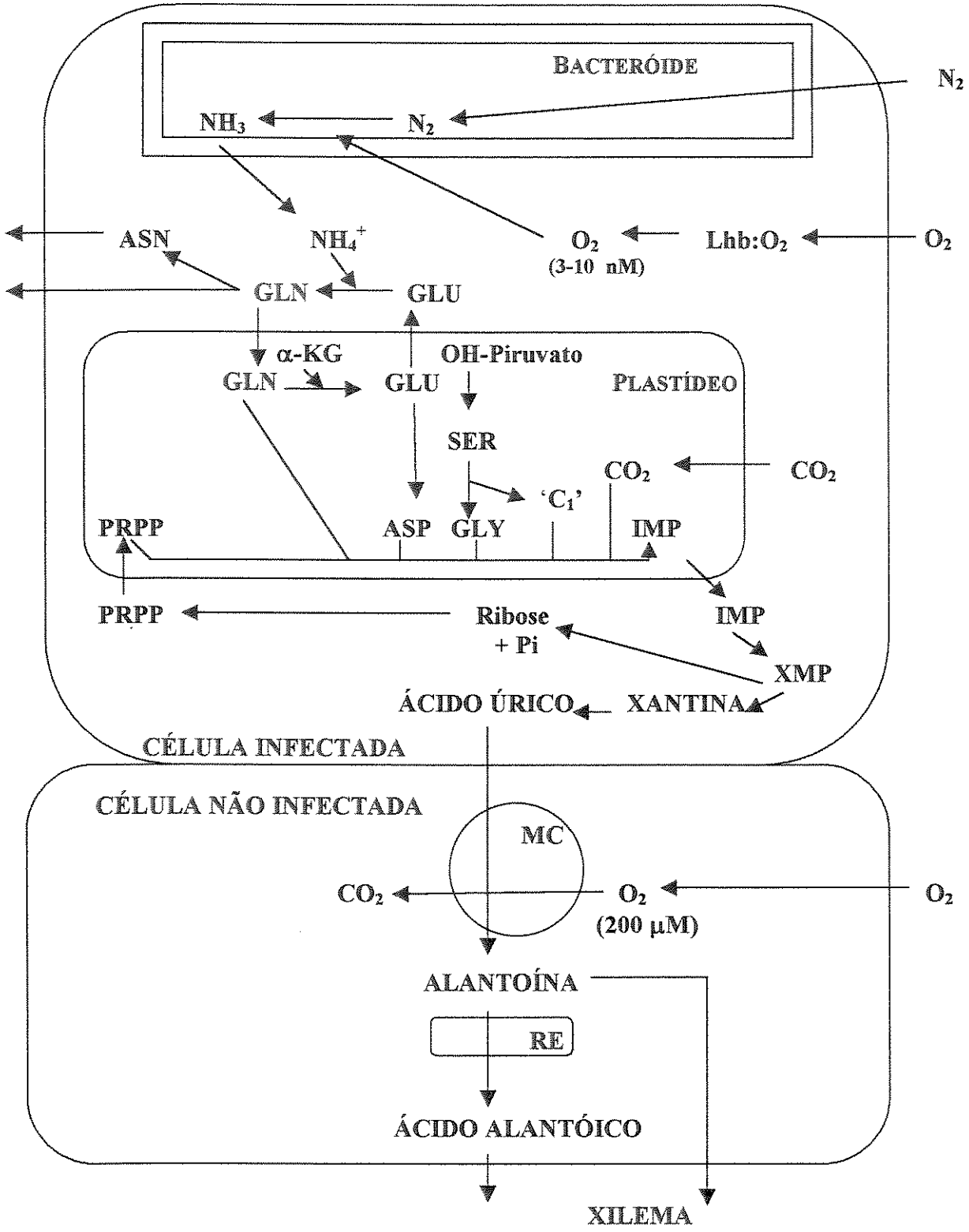


Esquema 1. Origem dos átomos de C e de N do anel de base púrica da estrutura de IMP (Atkins & Beevers, 1990).

A síntese de ureídeos, a partir de purinas, envolve uma comunicação notável entre diferentes organelas e células dentro dos nódulos, iniciando no citossol e plastídeos das células infectadas e culminando com a oxidação de ácido úrico à alantoína nos peroxissomos de células não infectadas (Schubert & Boland, 1990). A partir de células não-infectadas da região central dos nódulos, os ureídeos provavelmente se difundem em direção ao córtex e ao feixe vascular para exportação (Gordon *et al.*, 2001).

A reação inicial da rota, a assimilação de NH_4^+ pela GS, acontece do lado de fora dos bacteróides, no citossol das células hospedeiras, ao passo que a transferência do N-amídico da GLN ao GLU pela GOGAT é altamente compartimentalizada no plastídeo (Boland *et al.*, 1982; Shelp *et al.*, 1983). Estas duas enzimas estão similarmente localizadas nas células hospedeiras, em nódulos de leguminosas exportadoras de amidas (Awonaike *et al*, 1981; Shelp & Atkins, 1983). As enzimas responsáveis pela síntese *de novo* de purinas, catalisam a sequência de reações de PRPP a IMP junto com aquelas que mantêm o metabolismo do "C_1", estão localizadas nos plastídeos. A oxidação subseqüente de IMP via XMP, xantosina e xantina, para formar ácido úrico, é no entanto citossólica (Boland & Schubert, 1983; Boland *et al.*, 1982; Shelp *et al.*, 1983). Evidências experimentais sugerem que em nódulos de soja, a atividade da PRPP sintetase pode estar associada com os plastídeos (Boland *et al.*, 1982), apesar da enzima ter sido recuperada de mitocôndria de alcachofra (Le Floc'h & Lafleuriel, 1983).

A oxidação de xantina em ácido úrico pela xantina desidrogenase ocorre no citossol. O ácido úrico é transformado nos peroxissomos, pela uricase, em alantoína, com a liberação de CO_2 e H_2O_2 e então, convertido em ácido alantóico pela alantoinase, enzima do retículo endoplasmático (Schubert & Boland, 1990; Lea & Ireland, 1999; Morot-Gaudry *et al.*, 2001).



Esquema 2. Compartimentalização das rotas de assimilação de amônia e de biossíntese de ureídeos em nódulos de leguminosas tropicais. Abreviaturas: PRPP – fosforibosilpirofosfato; IMP – inosina monofosfato; MC – microcorpo; RE – retículo endoplasmático; Lhb – leg-hemoglobina (Atkins & Beevers, 1990).

A localização da uricase (Hanks *et al.*, 1981) em microcorpos (peroxissomos), nas células não infectadas dos nódulos, é consistente com a baixa afinidade da enzima pelo oxigênio (Rainbird & Atkins, 1981) pois os teores de O_2 livres nas células infectadas são muito baixos para a enzima funcionar eficientemente (Appleby, 1984).

O transporte dos produtos da fixação de N_2 (e da assimilação do nitrato nas raízes) para a parte aérea envolve exclusivamente o xilema. Entretanto, a reciclagem de N da parte aérea para as raízes ou entre as folhas, é realizada via floema, ou pelo intercâmbio xilema/floema, que pode ocorrer ao longo de todo o sistema vascular (Pate, 1980). Tais aspectos tornam o floema uma importante fonte de N para o transporte nitrogenado no xilema. O floema pode com isso, exercer uma forte influência na composição nitrogenada do xilema, através de sua ação direta ou indireta sobre a atividade assimilatória do sistema radicular.

O armazenamento, remobilização e transporte de aminoácidos permite a reciclagem interna do N reduzido e a manutenção do metabolismo e crescimento, mesmo quando o N do ambiente se torna limitante. Esse armazenamento e remobilização dependem fundamentalmente do transporte de aminoácidos (Delrot *et al.*, 2001).

Os aminoácidos usualmente correspondem cerca de 5 a 10 % do total de solutos no floema, sendo os mais comumente encontrados: ASN/ASP, GLU/GLN, SER, THR, GLY, ALA, VAL, LEU e ILE (Delrot *et al.*, 2001).

O transporte de aminoácidos a longa distância envolve uma reciclagem constante entre as partes aéreas das plantas e as raízes, mediada pelas trocas entre xilema e floema. O conteúdo de aminoácidos do floema pode controlar também a velocidade de absorção de N. O enriquecimento artificial do floema com aminoácidos resultou num decréscimo da absorção de N (Muller & Touraine, 1992; Imsande & Touraine, 1994). De forma semelhante à regulação e absorção de NO_3^-, os sistemas simbióticos requerem uma regulação geral para assegurar que a fixação de N_2 supra a demanda de N da planta. Uma regulação por "feedback" constitui um

requerimento dos sistemas simbióticos, uma vez que a fixação de N_2 tem o potencial de prover em excesso a demanda de N, conduzindo a um sistema ineficiente (Parsons & Sunley, 2001).

Foi sugerido que compostos nitrogenados na seiva do floema movem-se para os nódulos e regulam a taxa de fixação de N_2 e o crescimento dos nódulos. Altas concentrações de N reduzido, provavelmente aminoácidos e amidas, presentes no floema, podem decrescer a atividade e crescimento do nódulo, enquanto que baixas concentrações desses compostos estimulariam a atividade. Através desse mecanismo, a quantidade de N disponível dentro da planta, proveniente da fixação ou da absorção de N-combinado, regulariam a atividade e o crescimento nodular. Dentro dos nódulos, esses compostos nitrogenados ao chegarem no floema da bainha vascular poderiam se mover para o interior das células não infectadas do córtex. Em conseqüência, eles efetuariam mudanças na resistência gasosa do córtex do nódulo e isso causaria uma alteração na disponibilidade de oxigênio dentro da região infectada. Outros processos poderiam sofrer interferência, envolvendo transporte e catabolismo da sacarose, ou alteração da assimilação e transporte de compostos nitrogenados para fora do nódulo (Parsons *et al*, 1993).

Apesar do transporte de N em soja ser bem conhecido, ainda são poucas e recentes as informações que relatam a composição de aminoácidos transportados em plantas fixando N_2 sob condições de estresse.

A mudança da proporção ASN/GLN para plantas simbióticas em relação às plantas não simbióticas (nutridas com nitrato), tem sido registrada para um grande número de leguminosas que produzem ureídeos, incluindo a soja (McClure & Israel, 1979; Pate *et al.*, 1980). Entretanto, neste caso a mudança no nível de glutamina foi supostamente associada ao metabolismo do NO_3^-.

Silva & Sodek (1997) demonstraram que a queda no transporte de GLN ocorre quando a fixação do N_2 é inibida pelo Al^{3+}, sem a presença do nitrato. Portanto, levantou-se a

hipótese de que o nível de GLN no xilema, como os ureídeos, é resultado direto da atividade do nódulo, de forma que sua produção seria diminuída em condições que limitam a fixação de N_2 (NO_3^-, Al^{3+}).

Puiatti & Sodek (1999) observaram mudanças dramáticas na composição do N transportado no xilema de plantas noduladas de soja, após transferência para hidroponia na presença e ausência de NO_3^-. Além de mudanças contrastantes das proporções de ASP/ASN frente à presença/ausência de N, foi observada uma queda de GLN como resposta comum a todos os tratamentos, à semelhança dos ureídeos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos caracterizar a composição nitrogenada transportada na seiva do xilema e do floema de soja nodulada sob diferentes sistemas de assimilação de N; associar possíveis mudanças no transporte de GLN com enzimas responsáveis pelo seu metabolismo; avaliar a hipótese de GLN ser considerada uma molécula sinalizadora da atividade metabólica dos nódulos e verificar se mudanças na assimilação primária de N, sob estresse à fixação do N_2, são efeitos comuns a outras espécies de leguminosas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de soja [(*Glycine max* (L.) Merril)] cv. IAC-17, cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação. No estádio V0 (plântulas com cotilédones abertos) – estádio de desenvolvimento definido por Fehr *et al.* (1971) - as plântulas foram selecionadas e inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe SMS 463 (=SEMIA 5019), através de imersão das radículas em meio líquido contendo a bactéria em suspensão. Em seguida, foram replantadas em vasos de 1 L com vermiculita, na proporção de uma planta por vaso, nos experimentos em que as plantas foram transferidas para sistema hidropônico. Foram transplantadas três plantas por vaso de 3 L, nos experimentos em que as plantas não foram removidas dos vasos. A vermiculita foi lavada em água corrente, durante 4-6 horas, antes de ser utilizada para o cultivo da soja.

No período outono/inverno, as plântulas emergiram sob fotoperíodo longo (18 h de luz/6 h de escuro) e foram mantidas nessas condições até o estádio V0. Decorrido este período, as mesmas foram transferidas para condições naturais de luz e temperatura. A temperatura mínima entretanto, foi mantida a 20 °C por aquecedores de ambiente, para evitar interferência de baixas temperaturas na formação dos nódulos e fixação simbiótica de N_2.

No período primavera/verão, as plântulas permaneceram sob condições naturais de luz e ao atingir o estádio V0, após inoculação, foram submetidas a fotoperíodo curto (8 h de luz/18 h de escuro) durante quatro dias, quando novamente retornaram às condições naturais de luz e temperatura. Desta forma as plantas floresceram com cerca de 35 dias após a germinação.

As plantas foram nutridas com solução Hoagland & Arnon (1938) sem nitrogênio mineral, colocando-se duas vezes por semana 100 ou 250 mL de solução por vaso, em vasos contendo uma ou três plantas, respectivamente. Plantas cultivadas sob sistema não simbiótico foram nutridas com solução Hoagland completa (NO_3^- = 15 mM), seguindo-se as mesmas proporções estabelecidas para as plantas cultivadas em sistema simbiótico.

Nos estádios iniciais de desenvolvimento, as plântulas inoculadas com rizóbio exibiram tons amarelados nas folhas mais jovens, normalmente após queda dos cotilédones ou esgotamento das reservas, fase em que a fixação de N_2 ainda não estava efetiva. Nesse momento as plantas receberam NO_3^- em concentração próxima a 0,1 mM juntamente à solução normalmente utilizada, concentração não inibitória à fixação de N_2 e formação do nódulo, até que o enverdecimento das plantas fosse observado, caracterizando-se então a fixação plena de N_2.

3.2. Inóculo: Origem, manutenção e multiplicação

O inóculo *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 foi cedido pelo Instituto Agronômico de Campinas-IAC – SP.

A manutenção (meio inclinado) e a multiplicação (meio líquido) das bactérias foram realizadas em meio de cultura de Norris & Date (1976), pH 6,8-7,0, formulado com os seguintes sais e respectivas concentrações: K_2HPO_4 (0,5 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0,8 g/L), NaCl (0,1 g/L), $FeCl_3.6H_2O$ (0,01 g/L), extrato de levedura (0,8 g/L), manitol (10,0 g/L) e 5 mL/L de azul de bromotimol a 0,5 % (p/v) em metanol. O meio inclinado (sólido) foi obtido adicionando-se 15 g/L de ágar ao meio líquido.

Após autoclavagem a 121°C por 20 min, os meios foram inoculados em câmara de fluxo laminar e incubados a 28-30°C. Após o crescimento das bactérias foi adicionada vaselina líquida (Labsynth), previamente autoclavada, cobrindo todo o meio de cultura sólido,

e os tubos de ensaio armazenados sob temperatura de 4-6 °C. O meio líquido, após ter sido inoculado, foi incubado sob agitação, por um período de 5-6 dias quando a suspensão de bactérias atingia cerca de 10^9 células viáveis/mL (= UFC – Unidades Formadoras de Colônias), estádio em que foi utilizado para se fazer a inoculação das plântulas.

3.3. Soluções nutritivas

Foram preparadas duas soluções baseadas na solução de Hoagland e Arnon (1938), uma com NO_3^- (+N10), 10 vezes concentrada, e outra sem NO_3^- (-N), conforme abaixo:

Solução +N10: $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (50 mM); KNO_3 (50 mM); $MgSO_4.7H_2O$ (20 mM); KH_2PO_4 (10 mM); H_3BO_3 (0,46 mM); $MnCl_2.4H_2O$ (0,091mM); $ZnSO_4.7H_2O$ (7,65 μM); $CuSO_4.5H_2O$ (3,20 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

Solução –N: $MgSO_4.7H_2O$ (2 mM); KH_2PO_4 (1 mM); $CaSO_4.2H_2O$ (2 mM), K_2SO_4 (2 mM); H_3BO_3 (0,046 mM); $MnCl_2.4H_2O$ (9,1 μM); $ZnSO_4.7H_2O$ (0,765 μM); $CuSO_4.5H_2O$ (0,32 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

As duas soluções foram preparadas com macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro. O íon foi adicionado à solução +N ou –N apenas no momento de se colocar as soluções nas plantas. Para isso, acrescentou-se à solução +N (devidamente diluída) ou –N, 1 mL/L, de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo Na_2-EDTA (33,2 g/L); $FeSO_4.7H_2O$ (25 g/L) e NaOH (3,65 g/L).

3.4. Tratamentos

3.4.1. Influência do NO_3^- e do NH_4^+ sobre o transporte de N em plantas noduladas de soja

Foram conduzidos dois experimentos com a finalidade de caracterizar a composição nitrogenada transportada em soja nodulada, na presença dos íons NO_3^- e NH_4^+. O primeiro foi constituído de três tratamentos: um controle com plantas não noduladas cultivadas com NO_3^- como única fonte nitrogenada (N/NOD), um controle de plantas noduladas cultivadas na ausência de N (NOD) e um grupo de plantas noduladas recebendo NO_3^- 15 mM durante uma semana (NOD c/N). As plantas foram cultivadas em número de três por vaso de 3 L contendo vermiculita como substrato. O NO_3^- foi aplicado nas plantas em estádio R2 (Fehr *et al.*, 1971) – estádio reprodutivo inicial - flor no nó imediatamente abaixo do nó mais alto com uma folha completamente desenrolada, em três etapas. Primeiramente, foi colocado 1 L de solução Hoagland completa contendo NO_3^- 15 mM, sem impedimento da drenagem, visando saturar todo o vaso com a solução e nas duas etapas posteriores, 400 mL em intervalos de dois dias. Nesse experimento foram coletados a seiva de xilema, nódulos, raízes e folhas para análise da composição aminoacídica, teor de aminoácidos livres totais (ALT) e teor de ureídeos totais (URE). Para coleta de folhas foram eleitos o terceiro, quinto e sétimo pares de folhas trifolioladas, contando como primeiro, o par de folhas trifolioladas logo após o nó de folhas primárias. Em R2, a maioria das plantas apresentava o oitavo par de folhas em expansão.

O segundo experimento foi constituido de quatro tratamentos: um controle nodulado (NOD), um controle não nodulado (N/NOD) cultivado com N- NO_3^- como fonte nitrogenada e outros dois tratamentos, um grupo de plantas noduladas (NOD c/ NH_4^+) e outro não nodulado (N/NOD c/ NH_4^+), ambos recebendo 10 mM de NH_4^+ durante quatro dias. As plantas foram cultivadas em vasos de 3 L contendo vermiculita como substrato, em número de três por vaso. O íon NH_4^+ foi aplicado na forma de $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM, solubilizado em solução Hoagland

sem N, em duas etapas: 1 L/vaso, visando saturar todo o vaso com a solução e dois dias após, em volume de 500 mL por vaso. O NH_4^+ foi aplicado quando as plantas atingiram o estádio R2. Nesse experimento foram coletados a seiva de xilema e de floema para análise da composição aminoacídica. O teor de ALT e de URE na seiva do xilema foram também determinados.

3.4.2. Transporte de N em soja nodulada após transferência para hidroponia

Nesse experimento buscou-se caracterizar o transporte de N em soja nodulada após transferência para hidroponia, como alternativa aos tratamentos com N-combinado. Ainda com a finalidade de ampliar os efeitos da hidroponia, foi associado a esse fator a presença/ausência do íon NO_3^- e a presença/remoção de nódulos.

As plantas foram cultivadas em vermiculita, e ao atingirem o estádio R2, foram transplantadas para um sistema hidropônico em casa de vegetação, constituído de vasos plásticos com volume de 3 L sob borbulhamento constante de ar comprimido. As plantas, em número de três por vaso, permaneceram nesse sistema durante quatro dias. Os seguintes tratamentos foram conduzidos:

- Controle – plantas mantidas em vermiculita sem N (V)
- Plantas com nódulos transferidas para sistema hidropônico na presença de NO_3^- 15 mM (N+/NOD+)
- Plantas com nódulos destacados transferidas para sistema hidropônico na presença de NO_3^- 15 mM (N+/NOD-)
- Plantas com nódulos transferidas para sistema hidropônico na ausência de N (N-/NOD+)
- Plantas com nódulos destacados transferidas para sistema hidropônico na ausência de N (N-/NOD-)

Após a transferência das plantas para hidroponia, foram realizadas coletas diárias de seiva de xilema, nódulos e raízes, para determinação da composição de aminoácidos, URE e ALT.

3.4.3. Transporte e metabolismo de glutamina em plantas noduladas de soja após transferência para hidroponia e posterior replantio em vermiculita

Nesse experimento foi determinada a atividade da NADH-GOGAT (NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14) em nódulos de plantas de soja, em estádio R2, transferidas para hidroponia em solução sem N e contendo N-NO_3^- 15 mM, ao longo de quatro dias de tratamento e posteriormente após replantio em vermiculita, na ausência de N, durante oito dias. Foram avaliados paralelamente a composição de aminoácidos, teores de ALT, de NO_3^- e de URE na seiva do xilema, raízes e nódulos durante o período de tratamentos em hidroponia e após replantio.

As atividades das enzimas glutamina sintetase (GS; E.C. 6.3.1.2) em nódulos e de NADH-GOGAT e de GS em raízes, no primeiro e quarto dia de transferência das plantas para hidroponia, foram também avaliadas.

3.4.4. Inundação em soja nodulada: efeito de diferentes tempos de inundação e supressão do tratamento no transporte de N do xilema

Plantas de soja da cultivar IAC-17, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 foram cultivadas em vermiculita na proporção de três plantas por vaso em condições de casa de vegetação. As plantas foram nutridas com solução sem N (Hoagland & Arnon, 1938) e ao atingirem o estádio R2 foram submetidas aos tratamentos. O sistema radicular das plantas foi inundado com solução Hoagland sem N com 1/3 da força, durante 5 h e 1 e 4 dias. O nível de solução era continuamente monitorado, de forma a manter-se uma lâmina sobre a

superfície do substrato. Decorridos estes períodos de tratamento, procedeu-se à drenagem total da solução. Após 1, 2 e 4 dias de supressão do estresse e também nos tempos estabelecidos de inundação, procedeu-se à coleta da seiva do xilema para posterior análise da composição aminoacídica e de URE.

3.4.5. Efeito de curtos períodos de alagamento em plantas noduladas de soja sobre o transporte de N no xilema

Dois experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação, com soja da cultivar IAC-17, em estádio R2, inoculada com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 e cultivada em vermiculita na ausência de N.

O primeiro experimento teve por o objetivo avaliar o efeito do alagamento sem deficiência de oxigênio no sistema radicular, sobre o transporte de N no xilema. Para isso, plantas crescidas em vasos de 1 L (uma planta por vaso) foram transferidas para vasos de 3 L, em sistema hidropônico sob borbulhamento constante de ar comprimido, contendo solução Hoagland sem N. Manteve-se três plantas por vaso durante 2, 4, 8, 12, 24 e 48 h. Decorridos esses períodos, a seiva do xilema foi coletada para posterior análise da composição de aminoácidos e de URE.

O segundo experimento foi conduzido com o objetivo de verificar a influência do alagamento sem aeração, em curtos períodos, na composição nitrogenada transportada via xilema. Com essa finalidade, as plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 3 L, em número de três plantas por vaso até o estádio R2. A inundação foi efetuada ao se impedir a drenagem da solução, por meio de um encaixe do vaso contendo as plantas em um outro de mesmo volume, sem furos. O sistema radicular foi inundado com solução Hoagland sem N com 1/3 da força. A solução foi colocada no vaso de forma a manter uma pequena lâmina de solução sobre a superfície do substrato. Imediatamente após a inundação das plantas, a coleta

dos exsudatos da seiva do xilema foi iniciada. Alíquotas de 50 μL foram coletadas e armazenadas individualmente em Eppendorfs, registrando-se o tempo em que se completava o volume de cada fração coletada, durante 1 h de coleta. Procedeu-se à coleta de forma intercalada e individualizada entre as três plantas de um mesmo vaso. Logo após o início da inundação, seccionou-se uma das três plantas do vaso e procedeu-se a coleta. Ao se completar 30 min desta coleta, seccionou-se outra planta e iniciou-se a coleta da segunda planta, prosseguindo-se a coleta de seiva já iniciada da planta anterior. Ao se completar 30 min de coleta da segunda planta, a terceira planta foi seccionada e iniciada a coleta de seiva, finalizado-se a coleta de seiva da primeira planta seccionada. Ao se finalizar a coleta de seiva das três plantas de um vaso, obteve-se o volume aliquotado de seiva exsudado em um intervalo de 2 h, de forma que o período compreendido entre 30 e 90 min de inundação apresentou pontos sobrepostos de coleta. As plantas do controle foram coletadas seguindo o mesmo procedimento. Procedeu-se também à coleta de seiva de plantas submetidas à inundação por um período de 2, 4 e 5 h. Neste caso, coletou-se o volume total exsudado pelas três plantas durante 1 h. As diferentes aliquotas foram armazenadas a –80°C e posteriormente analisadas quanto ao teor de URE e composição de aminoácidos.

3.4.6. Efeito de tratamentos específicos à inibição da fixação de N_2

O experimento conduzido teve por objetivo relacionar o efeito de tratamentos específicos à inibição da fixação do N_2 sobre a composição nitrogenada transportada na seiva do xilema, aos demais experimentos conduzidos com plantas alagadas. Neste caso, plântulas de soja cv. IAC-17, imediatamente após inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 (conforme item 3.1), foram transferidas para vasos plásticos de 1L, na proporção de uma planta por vaso, contendo pedrisco como substrato. Os vasos possuiam apenas um furo em suas bases para drenagem do excesso de solução, o qual era também utilizado para encaixe de

tubo plástico no momento de aplicação dos tratamentos. Posteriormente foram realizadas duas novas inoculações, através de pipetagem de 2,5 mL de meio líquido/planta. Sobre o pedrisco, uma camada de algodão umedecida era mantida continuamente, a fim de se evitar o ressecamento do substrato. O substrato foi continuamente umedecido com solução Hoagland sem N com 1/3 da força.

Quando as plantas antigiram o estádio R2, foram aplicados os tratamentos. Nesse momento, os vasos tinham a parte superior vedada com tampa plástica, de forma que as trocas gasosas com o meio externo se davam apenas por um pequeno orifício. A base da planta, junto ao caule, em contato com a tampa, foi vedada com massa de modelar. Foram utilizados dois controles, um consistindo de vaso vedado, sem receber fluxo de ar e outro recebendo fluxo de ar atmosférico. Os tratamentos foram: fluxo de N_2 puro e mistura $Ar:O_2$ (80%:20%). Os gases foram bombeados de um reservatório plástico para o interior do vaso com auxílio de uma bomba de aquário. As misturas gasosas foram aplicadas no vaso através do orifício presente na saída lateral do fundo do vaso. Ao percorrer o perfil de substrato, o gás era liberado pelo orifício existente na parte superior do vaso. Inicialmente aplicou-se um fluxo de 500 mL/min durante 2 min, para se garantir que todo o espaço poroso existente no vaso fosse preenchido com o gás que se estava aplicando, visto que o espaço aéreo dos vasos era em torno de 200 mL. Posteriormente manteve-se o fluxo a uma vazão de 200 mL/min, até o término da coleta da seiva do xilema. A coleta de exsudatos do xilema foi iniciada após 1 h de aplicação dos tratamentos, durante 1 h de exsudação. Paralelamente a esses tratamentos, foi conduzido um tratamento de referência, procedendo-se à inundação de plantas com solução Hoagland –N com 1/3 da força durante uma hora. Realizou-se a coleta de raízes e nódulos de todos os tratamentos. Posteriormente procedeu-se à análise da composição aminoacídica, dos teores de URE e ALT da seiva do xilema, dos nódulos e das raízes.

3.4.7. Atividade da glutamina sintetase e transporte de nitrogênio em soja em diferentes estádios do processo de nodulação

Plantas de soja da cultivar IAC-17 foram cultivadas em vermiculita na proporção de três plantas por vaso de 3 L em casa de vegetação, em condições naturais de luz e temperatura.

As plântulas foram inoculadas aos cinco (estádio V0) e dez (estádio V1) (Fehr *et al.*, 1971) dias após emergência, com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463 (=SEMIA 5019). O procedimento de inoculação consistiu em distribuir cerca de 3,0 mL de inóculo em torno do sistema radicular de cada planta, seguido de aplicação de 50 mL de água destilada por vaso para distribuição em profundidade do rizóbio ao longo do sistema radicular.

As plantas foram nutridas com 250 mL/vaso de solução Hoagland, sem nitrogênio, duas vezes por semana.

Nos estádios V1, V2, V3, V4/V5, R1, R2/R3, R4 e R5 (Fehr *et al.*, 1971) foram realizadas coletas de seiva de xilema, raízes e folhas. Os nódulos foram coletados a partir de V2.

Foram determinados os níveis de URE e de ALT e a composição aminoacídica do xilema, de raízes e de nódulos; teor de clorofila total da folha expandida mais jovem e atividade da GS em nódulos.

3.4.8. Avaliação do transporte de N em leguminosas transportadoras e não transportadoras de ureídeos sob inundação ou presença de NO_3^-

3.4.8.1. Material vegetal, condições de cultivo e inóculos

Plântulas de soja [*Glycine max* (L.) Merril] das cultivares IAC-17 e Maple Arrow foram inoculadas com *Rhizobium japonicum* estirpe 06 e com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe

SMS 463; feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca Eté com *Rhizobium spp* estirpe 4080; feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.) cv. Vita 07 com *Bradyrhizobium spp* estirpe USDA 3458 e estirpe 6002; crotalária (*Crotalaria juncea* L.) cv. IAC-1 com *Rhizobium spp*; tremoço (*Lupinus albus* L.) com *Bradyrhizobium spp* estirpe 938 e ervilha (*Pisum sativum*) cv. Samba com *Rhizobium spp* estirpe USDA 2380. As plântulas foram mantidas em vasos plásticos com capacidade para 3 L contendo vermiculita (exaustivamente lavada em água corrente) como substrato, na densidade de três indivíduos por vaso. Os vasos receberam solução nutritiva Hoagland sem N, quando inoculadas com rizóbio e Hoagland completa quando não inoculadas, na proporção de 250 mL por vaso, duas vezes por semana.

As sementes de ervilha foram obtidas do IAPAR-PR e as das demais leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). A estirpe 2380 (3Hoq45a, Iowa 1948) para ervilha, e a estirpe 3458 (NifTAL 189, Nitragin 176A31) para feijão-de-corda, foram obtidas da coleção da USDA de Beltsville. A estirpe SMS 463 (=SEMIA 5019) e a 06 para soja foram obtidas do IAC. As demais estirpes foram cedidas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). O inoculante utilizado para crotalária, obtido a partir de isolamento de *Rhizobium* de nódulos de crotalária em associação simbiótica em condições naturais, foi gentilmente cedido pela Profa. Marlene Schiavinato do Departamento de Fisiologia Vegetal do IB – UNICAMP.

A recuperação das estirpes armazenadas na forma de liofilizado em ampola, foi realizada por meio de adição de meio líquido no interior da ampola, seguida da repicagem da estirpe para placa de Petri, contendo meio de cultura sólido (agar, manitol, extrato de levedura e sais minerais, com corante azul de bromotimol). As placas foram mantidas no escuro em estufa a 28°C, durante 3-5 dias para estirpes de crescimento rápido e de 5-8 dias para estirpes de crescimento lento. Após crescimento, as estirpes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado, em câmara de fluxo laminar e incubados a 28-30°C. Após

crescimento das bactérias foi adicionada vaselina líquida, previamente autoclavada, cobrindo todo o meio de cultura sólido, e os tubos de ensaio foram armazenados sob temperatura de 4-6°C.

A identificação das estirpes de bactérias de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foi realizada através da observação do crescimento das colônias em meio sólido contendo azul de bromotimol em placas de Petri. O acompanhamento diário da cor do meio de cultura revelou o gênero da bactéria. As colônias de *Bradyrhizobium*, de crescimento lento, promoveram o desenvolvimento de coloração verde escura ou azul no meio, em função do aumento do pH (meio tornava-se básico). O meio contendo colônias de *Rhizobium,* de crescimento rápido, desenvolvia coloração verde claro em função da maior acidez.

O inoculante de crotalária foi obtido de nódulos intactos, lavados e colocados por 6 segundos em álcool 95 %, transferidos para uma solução de peróxido de hidrogênio 3 % por 5 minutos, para esterilização superficial, lavados com água estéril e cortados ao meio. Com auxílio de uma pinça esterilizada, a superfície cortada do nódulo foi passada sobre o meio de cultura sólido (Norris & Date, 1976). Os procedimentos posteriores foram os mesmos anteriormente descritos para o preparo de inoculantes para outras estirpes.

3.4.8.2. Tratamentos empregados

Ao atingirem o estádio reprodutivo, estabelecido pelo aparecimento da primeira flor, as plantas foram submetidas aos tratamentos. O efeito do NO_3^- foi estudado através da aplicação de solução Hoagland completa contendo o íon na concentração de 15 mM. A solução foi aplicada três vezes, sendo que na primeira, num volume de 1 L para saturação dos vasos, seguido de duas doses de 0,5 L, em intervalos de um dia entre aplicações. No quinto dia após a primeira aplicação foi realizada a coleta da seiva do xilema. O tratamento com inundação das plantas noduladas foi efetuado ao se encaixar o vaso contendo as plantas em

outro, sem furos de drenagem. Com este objetivo, solução Hoagland sem N com 1/3 da força foi adicionada ao vaso, até se formar uma lâmina de solução sobre o substrato. A lâmina era continuamente mantida através da reposição da solução evaporada e/ou consumida pelas plantas. Após dois dias de inundação procedeu-se à coleta da seiva do xilema das plantas, a qual foi analisada quanto ao teor de ureídeos e composição aminoacídica. O teor de oxigênio da solução drenada dos vasos foi monitorado a cada 24 h.

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Coleta de exsudato do xilema

A coleta de exsudato de xilema foi realizada entre 11 h e 12 h conforme McClure & Israel (1979). Com auxílio de lâmina de barbear foi feito um corte em bisel logo abaixo do nó cotiledonar das plantas, separando-se a parte aérea das raízes. Em seguida, a região do corte foi lavada com água destilada e enxugada com papel absorvente, iniciando-se então, a coleta de exsudatos com auxílio de microcapilares de vidro. Os exsudatos foram coletados durante uma hora em tubos do tipo Eppendorf, os quais permaneceram em banho de gelo. Após a coleta o material foi conservado em freezer.

3.5.2. Coleta de exsudato de floema

A coleta de exsudato de floema foi realizada com base na metodologia descrita por Neo & Layzell (1997). As plantas foram aspergidas com água destilada, envolvidas em saco plástico e seccionadas na base do caule. Imediatamente foram transferidas para uma solução de EDTA 5 mM, em tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) 5 mM, pH 6,0 onde seus caules foram novamente seccionados em região que se encontrava imersa neste tampão. Em seguida, as plantas foram transferidas para frascos de modo que a porção cortada dos caules

ficava imersa em 5 mL do tampão, permanecendo durante 3 h, no escuro. Decorrido este período, a solução restante nos frascos foi armazenada em freezer para posterior análise.

3.5.3. Extração de aminoácidos de raízes, nódulos e folhas

O sistema radicular previamente lavado em água corrente para retirada da vermiculita e sais aderidos à superfície, teve seus nódulos destacados e posteriormente, nódulos e raízes foram lavados em água destilada gelada várias vezes, enxugados em papel filtro e pesados. Para uniformizar o material utilizado, foram coletados cerca de 2 g da metade inferior das raízes, e cerca de 1 g de nódulos desenvolvidos, com tamanho uniforme. Das folhas eleitas para análise foram descartadas as nervuras principais e aproximadamente 1 g de massa fresca foi amostrada de todos os folíolos de cada folha selecionada.

Após pesagem, raízes e folhas maceradas com N_2 líquido e nódulos intactos, foram armazenados em solução extratora M:C:W (metanol:clorofórmio:água; 12:05:03; v/v/v) na proporção de 10 mL por grama de massa fresca, sob refrigeração. O extrato foi então obtido segundo Bieleski & Turner (1966), com pequenas modificações. O homogeneizado foi centrifugado a 600 x g durante 10 min, em tubos de polipropileno. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso novamente em MCW, seguido de nova centrifugação a 600 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram então juntados, para se obter o extrato total em MCW. A cada 4 mL desse extrato, foi acrescentado 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água milli-Q. A mistura foi agitada e centrifugada a 600 x g por 10 min, para separação de fases. A fase superior, aquosa, foi coletada com auxílio de pipeta Pasteur e concentrada por evaporação até aproximadamente 50 % de seu volume em banho-maria a 40°C por cerca de 12 h, com os objetivos de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. Os extratos foram então armazenados em tubos Eppendorf em freezer.

3.5.4. Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema e de floema e de extrato de raízes, nódulos e folhas

A separação e análise de aminoácidos livres foi efetuada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivação com *o*-ftaldialdeído (OPA) (Benson & Hare, 1975; Jarret *et al.*, 1986) com modificações (Marur *et al.*, 1994).

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

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes tampão fosfato para a bomba A [="A": $Na_2HPO_4.7H_2O$ 50 mM, CH_3COONa 50 mM, 1,5 mL de CH_3COOH (pH 7,25), 20 mL de tetrahidrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol 65 % (="B") para a bomba B. Ambas as soluções foram desaeradas, sendo o tampão A filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana PVDF, com 0,45 μm de diâmetro.

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

As amostras de seiva de xilema foram centrifugadas a 14.000 x g por 5 min e as amostras de seiva de floema e de extratos de tecidos foram filtradas em membrana PVDF de 0,22 μm, para posterior derivação com a mistura OPA + mercaptoetanol.

Uma alíquota de 10 μL de amostra ou padrão foi misturada com 70 μL do reagente OPA + mercaptoetanol em Eppendorf, agitando-se. Após 2 min de reação, tempo suficiente para se formar os derivados aminoácidos-OPA, uma alíquota de 10 μL quando amostra de

seiva, nódulos ou folhas ou 30 μL quando amostra de floema ou raízes foi injetada na câmara de injeção de amostra do HPLC. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em gradiente dos dois tampões, A e B através da coluna cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2, 5 μm, 250 x 4,6 mm, da SUPELCO INC.) com fluxo de 0,8 mL/min, em um gradiente formado por quantidades crescentes de "B" em relação à "A". O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de "B" em relação a "A" da seguinte forma: 20 % aos 0 min, 28 % aos 5 min, 58 % aos 35 min, 75 % aos 40 min, 95 % aos 56 min, 96 % aos 60 min e 100 % aos 61 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica os derivados aminoácidos-OPA foram detectados por um monitor de fluorescência Shimadzu modelo RF-530, ajustado com λ de excitação de 265 nm e λ de emissão de 480 nm. O sinal do monitor foi processado por um integrador LKB, modelo 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS-18, com 15 aminoácidos protéicos, ao qual foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos à concentração de 250 nmol/mL.

3.5.5. Dosagem de aminoácidos solúveis livres totais (ALT)

Os ALT foram determinados conforme método de Yemm & Cocking (1955). Extratos de tecidos ou seiva de xilema devidamente diluídos em água, padrão de leucina (0-200 nmol) e água (branco) em volume de 1 mL, em tubo de ensaio, foram acrescidos de 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 0,2 mL do reativo de ninhidrina 5 % em metil-celusolve (éter monometílico de etilenoglicol) e 1 mL de KCN 2 % (v/v) em metil-celusolve (preparada a partir de uma solução 0,01 M de KCN em água).

Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para banho-maria a 100°C por 20 min. Em seguida, os tubos foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60 % (v/v) para completar o volume para 4 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco, foi medida a 570 nm, sendo feitas três repetições para cada amostra.

3.5.6. Quantificação de ureídeos totais (URE)

A determinação de ureídeos totais, alantoína e ácido alantóico, em exsudatos de xilema e extratos de nódulos, de raízes e de folhas foi realizada conforme método colorimétrico de Vogels & Van Der Drift (1970), que estima os teores de ureídeos a partir de leituras de absorbância a 535 nm, tomando-se como base uma curva padrão de alantoína em quantidades variando entre 12,5 e 75,0 nmol. Foram utilizadas pelo menos três repetições para cada amostra.

Os procedimentos utilizados envolvem inicialmente a hidrólise alcalina da alantoína em alantoato. Com esta finalidade, tubos de ensaio tapados com bolas de vidro contendo uma mistura de 250 µL de amostra convenientemente diluída, 500 µL de água e 250 µL de NaOH 0,5 N, foram colocados em banho-maria fervente durante 8 min. Decorrido esse tempo, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e procedeu-se à hidrólise ácida do alantoato em glioxilato e uréia. Com essa finalidade foram pipetados 250 µL de HCl 0,65 N e os tubos foram novamente tapados com bolas de vidro e colocados em banho fervente durante quatro minutos. Após resfriamento, os tubos receberam 250 µL de tampão fosfato (Na_2HPO_4-KH_2PO_4) 0,4 M, pH 7,0 e 250 µL de fenil-hidrazina a 0,33 %, seguido de agitação em vórtex e repouso por 5 min. Decorrido este tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo, onde permaneceram até a adição de 1,25 mL de HCl concentrado e gelado (0°C) e 250 µL de

ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] 1,65 %. Os tubos foram então agitados em vórtex e deixados à temperatura ambiente durante 15 min, para posterior leitura de absorbância a 535 nm. Nessa etapa o produto da reação da etapa anterior, ácido glioxílico fenil hidrazona, foi transformado em 1,5-difenilformazam de cor vermelha, equivalente à presença de ureídeos totais na amostra.

3.5.7. Dosagem de Nitrato (NO_3^-)

A determinação de NO_3^- foi executada conforme método de Cataldo et al. (1975). Em tubo de ensaio, foram pipetados 100 µL de água (branco), amostras e padrões (0,25 a 1,0 µmol de NO^-_3) e 400 µL do reagente salicílico (ácido salicílico 5 % p/v em H_2SO_4 concentrado) agitando-se cada tubo. Decorridos 20 min à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 9,5 mL de NaOH 2 N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e medidas as densidades óticas, a 410 nm, dos padrões e amostras contra o branco, sendo feitas três repetições para cada amostra.

3.5.8. Dosagem da concentração de oxigênio

Os teores de O_2 na solução nutritiva foram medidos por meio de um medidor portátil de tensão de O_2 da marca JENWAY mod. 9071.

3.5.9. Dosagem das enzimas da assimilação da amônia nas raízes e nos nódulos

3.5.9.1. Glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2)

3.5.9.1.1 Extração

A extração da enzima foi realizada por método de Cullimore *et al.* (1983). Quando em nódulos, cerca de um grama de material, recém coletado e previamente lavado em água destilada gelada foi macerado em almofariz, sob temperatura de 4°C em câmara fria, com tampão de extração Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, contendo 1 mM de DTT, 5 mM de glutamato de sódio, 10 mM de $MgCl_2$ e 10 % de glicerol, na razão de 5 mL por grama de massa fresca e 20 % de polyclar AT (PVPP) com base na massa de tecido fresco. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g por 20 min a 4°C e uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 médio, de volume total de 10 mL (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração.

Em raízes o extrato enzimático foi obtido a partir de cinco gramas da porção inferior do sistema radicular, recém coletado e previamente lavado em água destilada gelada. O tecido triturado em mortar com N_2 líquido, foi homogeneizado em tampão, adotando-se a proporção de 4 mL de tampão por grama de raízes e 20 % de polyclar AT, com base na massa fresca. O homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze, previamente lavadas e umedecidas com tampão de extração, e posteriormente centrifugado a 20.000 x g, por 20 min a 4°C. O volume do sobrenadante foi então mensurado e as proteínas foram precipitadas com sulfato de amônio [$(NH_4)_2SO_4$] a 75 % de saturação, correspondendo a 0,476 g/mL de extrato. A adição e mistura de sal ao extrato foram realizadas de forma gradual. O extrato foi centrifugado somente 30 min após completa dissolução do $(NH_4)_2SO_4$ (11.600 x g durante 10 min a 4^0C). Todo esse procedimento foi realizado com temperatura entre 0 e 4^0C. O sobrenadante foi então descartado e o pélete ressuspenso em 2,5 mL de tampão de extração, através de

movimentos circulares lentos com auxílio de bastão, sob temperatura entre 0 e 4^0C. As paredes dos tubos de centrífuga foram previamente limpas, com papel de filtro para retirada de possível excesso de sal aderido às paredes, o que poderia interferir na atividade da enzima. Após ressuspensão o extrato foi novamente centrifugado a 11.600 x g durante 10 min, a 4^0C. O sobrenadante foi então dessalinizado em coluna sephadex G-25 médio (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração para os ensaios enzimáticos posteriores.

3.5.9.1.2. Dosagem da atividade

A atividade da GS foi dosada pelo método semi-biossintético, segundo Cullimore *et al.* (1982). Nesse caso, foi realizada a medição de γ-glutamil hidroxamato, produto da reação obtido quando a hidroxilamina (NH_2OH) é utilizada como substrato alternativo para o NH_4^+. Este método foi utilizado para análise de rotina, devido a dificuldades em se obter uma rápida separação da glutamina, do substrato glutamato:

$$\text{Glutamato} + NH_2OH + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \gamma\text{-glutamil hidroxamato} + \text{ADP} + \text{Pi} + H_2O$$

Após terem sido padronizados o tempo de reação e o volume de extrato, de forma a se ajustar a velocidade de reação dentro da região de linearidade da curva da atividade enzimática, definiu-se os ensaios para nódulos e raízes conforme descrito abaixo.

O ensaio foi realizado em tubos contendo GLU, 100 mM; hidroxilamina 8,0 mM; ATP, 8,0 mM; $MgCl_2$, 16mM; Tris-HCl, 10 mM pH 7,8 e 100 µL de extrato bruto duas vezes diluído, para nódulos e 1000 µL de extrato bruto para raízes, em 2,0 mL de volume final. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação pré-incubado a 30^0C, seguida de agitação suave do tubo, e após 1 min da adição do extrato ao meio, foram retiradas

alíquotas de 500 μL nos tempos 0, 10, 20 e 30 min. A essas alíquotas foram acrescentados 600 μL de $FeCl_3$ (HCl 0,67 M; TCA 0,20 M e $FeCl_3$ 0,37 M), para interromper a reação (Ferguson & Sims, 1971). Em seguida foi realizada a centrifugação dessa mistura a 10.000 x g durante 5 min, à temperatura ambiente, para remoção das proteínas. Durante os ensaios, controles foram conduzidos, aos quais foram incluídos o extrato enzimático e todos os reagentes do meio de reação conforme descrito acima, exceto o ATP. Para os cálculos de atividade enzimática foram consideradas as leituras observadas nesses controles.

As absorbâncias a 535 nm foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia-Biotec), adotando-se como branco uma mistura de 600 μL do reagente paralizante e 500 μL de tampão do ensaio. A quantidade de γ-glutamil hidroxamato produzida foi estimada a partir de uma curva de calibração de γ-glutamil hidroxamato com concentrações de até 1 mM.

O método semi-biossintético (colorimétrico) foi adotado como ensaio de rotina para dosagem da atividade da GS após comparação prévia dos valores obtidos, por meio desse método, aos gerados pelo ensaio biossintético. Para isso foi utilizada a metodologia de Vézina *et al.* (1987). Nesse caso, a atividade foi dosada em meio de reação contendo imidazol, 100 mM, pH 8,0; GLU, 160 mM; $(NH_4)_2SO_4$, 14 mM; ATP, 24 mM; $MgCl_2$, 100 mM e extrato enzimático, 550 μL, resultando em volume final de 2,2 mL. A mistura foi incubada a 30°C e a reação iniciada pela adição do extrato enzimático. Após 1 min de pré-incubação do extrato enzimático com o meio de reação, a intervalos de 10 min até o tempo de 30 min, foram retiradas alíquotas de 500 μL e adicionados às mesmas 100 μL de ácido sulfosalicílico, 300 mg/mL, com o fim de paralizar a reação. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 10.000 x g durante 5 min à temperatura ambiente. As amostras foram neutralizadas para pH 9,5 e diluídas 10 vezes, para serem posteriormente analisadas para a

formação de GLN através de um sistema HPLC, após derivação com *o*-ftaldialdeído (OPA) baseado no método descrito por Jarret *et al.*, 1986 (conforme item 3.5.4.).

A uma alíquota de 100 µL do meio de reação acidificado foram adicionados 18 µL de NaOH 1,5 N, de forma a elevar o pH para 9,5 (pH do reagente OPA utilizado para derivação dos aminoácidos) e 882 µL de água milli-Q. Após mistura, as amostras foram filtradas em filtro millipore de 0,22 µm. Dessa mistura, neutralizada e filtrada, 10 µL foram misturados com 60 µL do reagente OPA-borato e após 2 min de reação, uma alíquota de 10 µL foi injetada no HPLC.

Foi adotado, como análise de rotina, o método semi-biossintético, por fornecer resultados confiáveis, relativamente próximos aos obtidos pelo método biossintético. Os valores de atividade obtidos por meio do ensaio colorimétrico (semi-biossintético) apresentaram cerca de 80 % dos valores de atividade estimados pelo método biossintético, 110± 6,93 e 133± 2,31 µmol GLN/gMF, respectivamente.

3.5.9.2. Glutamato sintase dependente de NADH (EC 1.4.1.14)

3.5.9.2.1. Extração

A extração da glutamato sintase (NADH-GOGAT) em nódulos, foi executada por homogeneização em almofariz previamente resfriado, de um grama de nódulos frescos com 5 mL de tampão de extração, Hepes 50 mM, pH 8,0, contendo 10 mM de DTT e 1 mM de EDTA, baseado no método de Chen & Cullimore (1988). O homogeneizado foi centrifugado a 11.600 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante dessanilizado em coluna de 10 mL, sephadex G-25 médio (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), previamente equilibada com tampão de extração, para posterior ensaio enzimático.

O extrato de raízes foi obtido a partir de cinco gramas da porção mediana do sistema radicular, coletadas no dia da extração e lavadas em água destilada gelada. O tecido foi homogeneizado com auxílio de N_2 líquido, adotando-se a proporção de 4 mL de tampão de extração por grama de raízes. O homogeneizado foi filtrado em quatro camadas de gaze e posteriormente centrifugado a 11.600 x g por 10 min, a 4°C. Após centrifugação, as proteínas do sobrenadante foram precipitadas a 75 % de saturação com $(NH_4)_2SO_4$. O extrato foi então novamente centrifugado a 11.600 x g durante 10 min, a 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspenso em 2,5 mL de tampão de extração. Após ressuspensão do pélete, nova centrifugação a 11.600 x g durante 10 min, a 4°C, foi realizada. O sobrenadante foi então dessalinizado em coluna sephadex G-25 médio (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração para os ensaios enzimáticos posteriores. Todos os procedimentos mencionados foram realizados sob temperatura entre 2 e 4°C.

3.5.9.2.2 Dosagem da atividade

A atividade da enzima foi avaliada por meio da medição da oxidação do NADH a 340 nm conforme descrito por Chen & Cullimore (1988). A mistura de reação foi constituída de tampão Hepes, 25 mM pH 8,0, GLN, 2,5 mM, α-KG, 1,0 mM, NADH, 0,16 mM e extrato enzimático, 75 µL para nódulos e 150 a 200 µL para raízes, em volume final de 1,2 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima e as mudanças em absorbância a 340 nm a 30°C, após pré-incubação do extrato com meio de reação, foram monitoradas em espectrofotômetro (Ultrospec 1000, Pharmacia-Biotech), por pelo menos um período de 15 min a intervalos de cinco minutos. Dois ensaios, um sem α-KG e outro sem GLN foram utilizados como controle.

O método espectrofotométrico adotado para determinação da atividade da NADH-GOGAT foi comparado com método que quantifica diretamente o GLU formado na reação, na forma de seu derivado com *o*-ftaldialdeído, através de cromatografia líquida de alto desempenho, com utilização de coluna de fase reversa, conforme descrito por Jarret *et al.*, 1986 (conforme item 3.5.4.). Outro ensaio absolutamente idêntico ao descrito acima foi conduzido, aumentando-se porém o tempo de incubação, de forma que todo, ou pelo menos a maior parte do NADH fosse consumida. Dessa forma, leituras de absorbância a 340 nm foram registradas a intervalos de 10 min, até um período de 30 min, para determinação da atividade da enzima pelo método espectrofotométrico. Nesses mesmos intervalos de tempo, alíquotas de 500 µL do meio de reação foram coletadas e a cada uma foram acrescidos 100 µL de ácido sulfossalicílico, 300 mg/mL. Essas alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min e armazenadas em geladeira a 6°C, para posterior análise em HPLC. Para análise, as amostras foram inicialmente tituladas para pH 7,0, diluídas duas vezes e filtradas com filtro millipore de 0,22 µm. A mistura filtrada consistia de 300 µL de amostra, 224 µL de água milli-Q e 76 µL de NaOH 1,5 N.

O método de determinação da atividade da NADH-GOGAT por medição da oxidação do NADH a 340 nm, foi adotado para análise de rotina, uma vez que apresentou valores muito próximos ao método de detecção direta do GLU formado (HPLC): 11,15± 0,12 µmol GLU/gMF e 10,04± 0,26 µmol GLU/gMF, respectivamente.

3.5.10. Determinação do teor de clorofilas

As dosagens foram realizadas a partir de solução extratora de dimetilsulfóxido (DMSO), com base em Hiscox & Israelstam (1979).

Discos foliares com 1,77 cm^2 foram retirados da folha expandida mais jovem, recém coletada, desprezando-se as nervuras centrais dos folíolos e colocados em DMSO, na proporção de um disco foliar para 7 mL de DMSO, em tubos de ensaio. Os tubos foram tapados com bolas de vidro e mantidos em banho-maria a 65 °C, durante 30 min. Posteriormente, após terem sido resfriados no escuro, foram registradas em espectrofotômetro as densidades óticas a 646 e 663 nm. Os teores de clorofilas totais (a + b) foram calculados com base na equação prosposta por Arnon (1949): $Ca+b = (20,2 \times A_{646}) + (8,02 \times A_{663})$.

3.6. Delineamento experimental

Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso com três ou quatro repetições onde um vaso com três plantas representava a unidade experimental. Aos dados quantitativos obtidos, foi aplicada a análise de variância e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade (Gomes, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição nitrogenada da seiva e constituinte do sistema aéreo e radicular de plantas noduladas e não-noduladas de soja

4.1.1. Na presença e ausência de nitrato

Um conjunto de experimentos foi conduzido com os objetivos de estabelecer os padrões de transporte de N no xilema de soja em diferentes sistemas de assimilação – fixação de N_2 e assimilação de NO_3^- e de NH_4^+ - e verificar se esses padrões são reflexo da reciclagem de aminoácidos via floema entre a parte aérea e sistema radicular .

As plantas noduladas de soja, totalmente dependentes da fixação de N_2, apresentaram altos teores de URE transportados no xilema, indicativos da fixação de N_2 plena (tabela 1). Em relação à composição aminoacídica, foi observada elevada proporção de ASN (55 %) seguida de GLN (20 %), como os principais aminoácidos transportados na seiva do xilema. Nas raízes, predominaram os aminoácidos ASN, ASP, GLU, SER, GABA, GLN e ALA e nos nódulos, ASN, GLU, GABA, ALA, SER e ASP (tabela 1). Composição semelhante foi observada em seiva de xilema de soja em outros trabalhos (Layzell *et al.*, 1981; Puiatti & Sodek, 1999), e em raízes e em nódulos (Puiatti & Sodek, 1999) de soja fixando plenamente o N_2 em relação às plantas onde predomina a assimilação do nitrato.

No caso de plantas noduladas tratadas com NO_3^- e não-noduladas cultivadas com o NO_3^- foi obtido outro padrão de transporte de N no xilema. A aplicação do NO_3^- na concentração de 15 mM a plantas noduladas provocou uma diminuição da proporção de ASP e de GLN e aumento de ASN no xilema (tabela 1). Um padrão semelhante foi obtido para plantas não-noduladas cultivadas com o NO_3^-, o que demonstra coerência com relação ao efeito do NO_3^- sobre o transporte de nitrogênio em plantas noduladas. Portanto, teores mais

Tabela 1. Composição de aminoácidos (mol %), teores de aminoácidos livres totais (ALT) e de ureídeos totais (URE) em seiva de xilema, em nódulos, em raízes e em floema de plantas simbióticas (NOD) de soja cv. IAC-17; noduladas nutridas com N-NO_3^- 15 mM durante sete dias (NOD c/N) e não noduladas cultivadas com N-NO_3^- (N/NOD)

	XILEMA			NÓDULOS		RAÍZES			FLOEMA	
	N/NOD	NOD	NOD c/N	NOD	NOD c/N	N/NOD	NOD	NOD c/N	NOD	NOD c/N
ASP	**3,88**	**12,95**	**4,83**	**13,02**	**15,44**	**2,80**	**9,12**	**5,87**	**23,09**	**20,45**
GLU	**0,31**	**0,49**	**0,26**	**21,54**	**30,41**	**4,38**	**5,75**	**3,67**	**18,11**	**19,12**
ASN	**82,80**	**54,84**	**74,59**	**14,68**	**9,43**	**80,78**	**21,07**	**43,07**	**17,25**	**13,87**
SER	0,81	1,60	1,31	14,04	10,00	2,10	12,00	6,90	13,20	14,97
GLN	**2,02**	**19,95**	**4,96**	**1,20**	**1,60**	**0,33**	**7,78**	**3,32**	**0,78**	**0,96**
ALA	0,15	0,43	0,21	15,79	18,20	2,25	5,79	3,52	3,18	2,39
GABA	0,29	1,72	0,44	9,81	8,99	1,19	6,98	6,02	6,57	5,45
GLY	0,58	0,78	0,85	0,69	0,31	0,37	0,48	0,66	3,33	2,39
Outros	9,16	7,24	12,55	9,23	5,62	5,80	31,03	26,97	14,49	20,40
ALT	7,96a** µmol/mL	4,98 c µmol/mL	5,98 b µmol/mL	9,18 a µmol/ gMF	5,54 b µmol/ gMF	6,72 a µmol/ gMF	1,90 c µmol/ gMF	3,14 b µmol /gMF	-	-
URE	0,46 c µmol/mL	8,85 a µmol/mL	2,16 b µmol/mL	6,69 a µmol/ gMF	4,39 b µmol/ gMF	1,18 c µmol/ gMF	2,77 a µmol/ gMF	2,32 b µmol/ gMF	-	-

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (< 3 %)

**Médias dos diferentes tratamentos dentro de cada parte da planta estudada seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade

elevados de GLN e ASP e teores mais baixos de ASN caracterizam plantas noduladas de soja fixando plenamente o N_2, em relação às plantas onde predomina a assimilação do nitrato.

O NO_3^- causou uma diminuição considerável do teor de URE da seiva do xilema, bem como dos nódulos e das raízes, indicando um decréscimo significativo do processo de fixação de N_2. Uma vez que o teor de ureídeos no xilema é um indicador confiável da fixação de N_2, pode-se estabelecer uma correlação positiva entre a quantidade de N na forma de ureídeos na seiva do xilema e a fixação de N_2 em espécies transportadoras de ureídeos como a soja (Herridge & Peoples, 1990; Herridge *et al.*, 1990).

De modo geral, proporções semelhantes dos aminoácidos transportados no xilema foram observadas nas raízes das plantas que receberam NO^-_3 e nas plantas dependentes da fixação, embora nas plantas noduladas a proporção de ASN tenha sido nitidamente menor. Os nódulos, por outro lado, apresentaram uma composição de aminoácidos bastante diferente das outras partes analisadas e pouco alterada pelos tratamentos com NO_3^-. A mudança mais evidente provocada pelo nitrato foi o menor teor de ASN, compatível com um decréscimo da assimilação de N nesse órgão. O teor de GLU mostrou um aumento e GLN não se alterou, possivelmente devido ao alto teor de GLU existente nesses órgãos, o que sugere uma reciclagem rápida da GLN formada, resultando numa proporção menor deste aminoácido e maior de GLU (tabela 1).

Acompanhando as variações no teor de URE na presença de NO_3^-, ocorreu um decréscimo do teor de aminoácidos totais nos nódulos e um aumento nas raízes e no xilema, o que juntamente com as alterações da composição aminoacídica da seiva do xilema, raízes e nódulos, sugere uma mudança na via de assimilação do N: o aumento da assimilacão do NO_3^- nas raízes em contrapartida à diminuição da fixação de N_2 nos nódulos. O maior grau de similaridade entre a composição aminoacídica transportada no xilema das plantas noduladas na presença de NO_3^- e a transportada em plantas não simbióticas reforçam essa hipótese (tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos com diferentes leguminosas (Pate *et al.*, 1980; McNeil & Larue, 1984). A razão para a presença do N inorgânico no meio radicular levar a decréscimos nas proporções relativas do N orgânico na seiva do xilema e na relação ureídeos/amidas parece estar ligada à economia de energia. De maneira global, uma quantidade maior de energia é requerida para fixar N_2 do que para utilizar o NO_3^- (Becana & Sprent, 1987).

O floema apresentou uma composição de aminoácidos também diferente das demais partes analisadas, com pouca diferença entre plantas tratadas com NO_3^- e sem NO_3^-. Dentre os

aminoácidos transportados, ASP, GLU, ASN e SER foram os predominantes, seguidos de GABA, GLY e ALA, caracterizando dessa forma a importância desses aminoácidos na reciclagem do N em soja (tabela 1). No entanto, a proporção desses aminoácidos no floema foi bastante diferente do observado na seiva do xilema. Por outro lado, Parsons & Baker (1996), verificaram que em *Lupinus albus* a composição aminoacídica transportada no xilema e no floema são semelhantes. Nessa espécie, os aminoácidos ASN e GLN constituem mais de 50 % do N transportado no floema, seguido de ASP e GLU. A VAL, ILE, LEU, PHE, LYS e ALA embora presentes em menor proporção, se destacaram como aminoácidos importantes do floema. Em *Triticum aestivum* o GLU foi o aminoácido mais abundante na seiva do floema, seguido de SER e de ASP (Caputo & Barneix, 1997). As diferenças encontradas na distribuição dos aminoácidos transportados no floema entre as diferentes espécies possivelmente refletem um metabolismo diferenciado dos compostos nitrogenados entre as espécies.

A composição de aminoácidos dos nódulos, bastante diferenciada daquelas transportadas na seiva do xilema e do floema em soja, pode indicar que os aminoácidos presentes adviram da fixação do N_2 ou da reciclagem de N, sobretudo aqueles encontrados em maior proporção. Em *Sesbania rostrata* apenas pequena fração do N fixado foi incorporada a aminoácidos do nódulo, contra uma significativa proporção originada da reciclagem do N através do xilema (Godber & Parsons, 1998). Em *Lupinus albus*, grande parte da GLN e principalmente da ASN encontrada no xilema não foi derivada do N recém fixado, mas de uma quantidade substancial de N reciclada dentro do nódulo antes de ser exportada, envolvendo o movimento entre xilema e floema (Parsons & Baker, 1996).

As folhas de plantas de soja que não receberam NO_3^-, eleitas para análise apresentaram proporções relativamente altas de ASP, GLU, SER, ALA e GABA e baixos teores de ASN e GLN e demais aminoácidos (tabela 2). A aplicação de NO_3^- em plantas

noduladas de soja induziu a mudanças nas proporções entre os aminoácidos presentes nas folhas. Entre os demais aminoácidos, a ASN mostrou um aumento considerável, independentemente da posição das folhas analisadas (tabela 2).

O teor de URE nas folhas mostrou não ser influenciado pelo tratamento com NO_3^- (tabela 2). Os baixos valores encontrados, mesmo no controle, podem indicar uma metabolização rápida desses compostos, visto que são sintetizados nos nódulos e transportados para a parte aérea via xilema, onde são degradados (Vadez & Sinclair, 2000). No entanto, nas folhas mais jovens (folha 07) sob o tratamento com NO_3^-, foram observados teores significativamente mais altos de URE. Isso pode estar associado a um ajuste temporário do metabolismo de N, uma vez que na presença de NO^-_3, a assimilação desse íon deve ter sido intensificada nessas folhas, as quais, por outro lado, funcionariam como um forte dreno de N, seja proveniente da fixação ou da assimilação de NO^-_3, pois se apresentavam em plena expansão (tabela 2).

Os teores de ALT nas folhas aumentaram significativamente na presença de NO^-_3, o que associado ao aumento de ASN, sugere também a assimilação do íon pela parte aérea (tabela 2). Por outro lado, o aumento de ASN pode também ter sido resultante do NO_3^- assimilado pelas raízes e transportado para a parte aérea, pois houve um aumento do teor de ASN transportado pelo xilema nas plantas que receberam NO_3^- (tabela 1). Esses resultados concordam com Harper (1972) e Crafts-Brandner & Harper (1982) que verificaram a contribuição da assimilação do N-NO_3^- em plantas de soja pelo sistema radicular e parte aérea.

O acúmulo de ASN na parte aérea de plantas noduladas pode constituir um mecanismo de sinalização e controle de N total da planta, regulando a atividade da nitrogenase por um mecanismo de "feedback" (Parsons *et al.*, 1993; Bacanamwo & Harper, 1997; Vadez *et al.*, 2000), uma vez que se observou o aumento de ALT e sobretudo de ASN nas plantas que receberam NO_3^- à semelhança desses trabalhos.

O teor de ASP variou com o tratamento e posição da folha analisada. O aumento de ASN esteve associado com uma diminuição de ASP, exceto para a folha 05, de posição intermediária na planta. Isso sugere um metabolismo diferenciado em relação às demais folhas, possivelmente devido à maior utilização de ASN.

Tabela 2. Composição de aminoácidos livres (mol%), composição de aminoácidos livres totais (ALT) e ureídeos totais (URE) em extrato de folhas de soja nodulada (NOD) cv. IAC-17, em estádio R2, cultivada em vermiculita na ausência de N e nutridas com NO^-_3 15mM durante sete dias (NOD c/N)

FOLHA **	Posição da folha / Tratamento					
	FOLHA 03*		FOLHA 05		FOLHA 07	
	NOD	NOD c/N	NOD	NOD c/N	NOD	NOD c/N
ASP	**13,44**	**6,26**	**3,95**	7,45	**5,51**	**2,65**
GLU	**13,17**	**10,42**	**14,12**	**10,53**	**14,18**	**6,28**
ASN	**0,65**	**12,61**	**0,51**	**15,66**	**0,72**	**10,39**
SER	4,77	3,61	2,65	4,97	3,79	4,30
GLN	**0,24**	**1,14**	**0,45**	**3,54**	**0,87**	**4,24**
ALA	14,51	19,46	29,33	16,74	18,88	18,20
GABA	36,35	35,79	34,49	27,45	26,43	27,91
Outros	16,87	10,71	14,50	13,66	29,62	26,03
ALT (µmol/gMF)	*** 5,07 b	8,13 a	5,58 b	13,65 a	5,44 b	7,87 a
URE (µmol/gMF)	0,28 a	0,34 a	0,32 a	0,39 a	0,30 b	1,74 a

* Posição da folha na planta levando-se em consideração a primeira folha trifoliolada da base em direção ao ápice da planta

** Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 5%)

*** Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada "grande coluna", não diferem entre si pelo Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade

A proporção (mol %) baixa de GLN das folhas do controle, em relação à proporção desse aminoácido transportado no xilema sugere uma utilização rápida dessa amida na parte aérea. Talvez devido à disponibilidade de N, foram observados aumentos

relativos na proporção desse aminoácido na presença do NO_3^- (tabela 2). Por outro lado, as diferenças encontradas com relação ao teor de GLN nas folhas, parece explicar muito pouco as variações encontradas no xilema frente ao tratamento com NO_3^- (tabelas 1 e 2).

O GLU diminuiu na presença de N, especialmente nas folhas mais jovens, possivelmente devido a uma reciclagem rápida desse aminoácido em função de um metabolismo mais intenso (folha em expansão), pois GLU é fonte de N para síntese dos demais aminoácidos.

A ALA e especialmente o GABA, foram os aminoácidos encontrados em maior proporção no controle, não apresentando uma alteração padrão em função do íon NO_3^-. Tendência semelhante foi também registrada para SER (tabela 2).

A absorção de NO_3^- não causou alterações substanciais na composição da seiva do floema em soja, ao contrário do observado na seiva do xilema, não ocorrendo aparentemente o acúmulo de um aminoácido como sinalizador da absorção do íon. Por outro lado, esses aminoácidos poderiam estar funcionando mais como nutrientes, em grande parte destinados ao crescimento do sistema radicular estimulado pelo NO_3^- (Granato & Harper, 1989) do que propriamente atuando como moléculas sinalizadoras. Gessler *et al.* (1998) trabalhando com plântulas de *Fagus sylvatica*, verificaram que entre os aminoácidos transportados no floema, especialmente GLN e ASP medeiam a regulação do NO_3^- absorvido, de forma a adaptar o processo de absorção do íon à demanda de N da planta inteira. Por outro lado, Tillard *et al.* (1998) trabalhando com plantas de mamona, não observaram essas mudanças e sugeriram que os aminoácidos transportados pelo floema não seriam os sinalizadores primários da parte aérea às raízes, de forma a controlar a absorção do NO_3^-. Sugeriram que muitas condições que levam à reciclagem desses aminoácidos nas raízes, resultariam em mudança do transporte para o sistema radicular de moléculas sinalizadoras desconhecidas, para a regulação da absorção do NO_3^-.

4.1.2. Na presença de amônio

O segundo experimento preliminar foi conduzido com o objetivo de estabelecer como parâmetro de referência, a composição nitrogenada do xilema de plantas noduladas e não-noduladas (nutridas com NO_3^-) na presença do íon NH_4^+, por quatro dias.

De forma inversa ao observado no tratamento com o NO_3^-, a presença do íon NH_4^+ causou um aumento da proporção de GLN transportada na seiva do xilema das plantas noduladas, mostrando um impacto ainda maior nas plantas não noduladas (nutridas com NO_3^-). Essas modificações foram acompanhadas de um aumento de ASN e redução de ASP (tabela 3)

O teor de URE diminuiu na presença de NH_4^+ nas plantas noduladas e nas não-noduladas mostrou-se baixo e inalterado (tabela 3). Evidentemente, o NH_4^+ inibe a fixação de N_2 da mesma maneira que o íon NO_3^-.

O aumento do teor de GLN no xilema inversamente ao teor de URE nas plantas noduladas, e também nas plantas nutridas com NO_3^-, sugere que a proporção deste aminoácido na seiva de xilema é dependente da concentração do íon NH_4^+, seja oriundo da fixação do N_2 ou da fertilização com N - NH_4^+.

O teor de ALT mostrou um acréscimo abrupto nas plantas que receberam NH_4^+, indicando um aumento da síntese de aminoácidos sobretudo nas plantas noduladas, em que o processo de fixação foi substituído pelo de assimilação de NH_4^+ aplicado (tabela 3). O aumento da síntese de aminoácidos induzido pelo NH_4^+ poderia ser justificado, pelo menos em parte, por não haver necessidade de reduzir N a NH_4^+ antes de ser incorporado em compostos orgânicos.

A composição (mol%) da seiva de floema de plantas de soja noduladas e não noduladas tratadas com o íon NH_4^+ praticamente não sofreu influências (tabela 4). Foi

Tabela 3. Composição de aminoácidos livres (mol %), teor de aminoácidos livres totais (ALT) (µmol/mL) e teor de ureídeos totais (URE) (µmol/mL) em exsudato de seiva de xilema de plantas de soja noduladas (NOD) e não noduladas (N/NOD), nutridas com NO^-_3 15 mM, cv. IAC-17, em estádio R2, cultivadas em vermiculita e submetidas a tratamento com $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM durante quatro dias

XILEMA	NOD	NOD c/$(NH_4)_2SO_4$	N/NOD	N/NOD c/$(NH_4)_2SO_4$
ASP	**15,59**	**4,96**	**2,94**	**0,48**
GLU	**0,64**	**0,58**	**0,99**	**0,18**
ASN	**48,68**	**60,98**	**81,76**	**84,14**
SER	0,92	1,11	0,73	0,29
GLN	**17,36**	**21,77**	**1,03**	**6,30**
ALA	0,16	0,44	0,28	0,08
GABA	0,85	0,53	1,16	0,17
Outros	15,80	9,63	11,11	8,36
ALT (µmol/mL)	2,85 b**	19,50 a	5,95 b	15,29 a
URE (µmol/mL)	6,23 a	2,86 b	1,19 a	1,12 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações mostraram-se baixas (≤ 2%); ** cada valor é a média de quatro repetições
**Letras diferentes na mesma linha, dentro de cada "grande coluna", significam diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan

Tabela 4. Composição aminoacídica (mol%) em seiva de floema de plantas noduladas de soja (NOD) e não noduladas (N/NOD) cultivadas com NO^-_3, cultivar IAC-17 em estádio R2, cultivadas em vermiculita e submetidas a tratamento com $(NH_4)_2SO_4$ 5 mM durante quatro dias

FLOEMA	NOD**	NOD C/$(NH_4)_2SO_4$ 5 mM	N/NOD	N/NOD C/$(NH_4)_2SO_4$ 5 mM
ASP	**23,23**	**26,18**	**11,92**	**13,58**
GLU	**18,34**	**17,14**	**10,63**	**9,95**
ASN	**16,08**	**19,61**	**41,67**	**40,16**
SER	10,00	8,41	7,48	7,23
GLN	**0,41**	**0,47**	**0,14**	**0,92**
GLY	3,27	4,60	13,95	11,24
ALA	2,10	2,91	2,93	4,81
GABA	11,07	6,14	3,36	3,57
Outros	15,50	14,54	7,92	8,54

*Foram detectados os aminoácidos HIS, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações mostraram-se baixas (≤ 3%); ** cada valor é a média de três repetições

observado, no entanto, que o controle de plantas não noduladas apresentou teores bem mais elevados de ASN e GLY na seiva, em comparação com plantas noduladas e menores níveis de ASP e GLU. A GLN, por outro lado, importante forma de transporte de N na seiva de xilema de plantas noduladas, esteve presente em baixos níveis na seiva do floema, de forma semelhante às plantas nutridas com NO^-_3, não sendo influenciada pela presença do íon NH_4^+.

Plantas noduladas de *Lupinus* que receberam NH_4^+Cl por duas semanas, aumentaram o teor de GLN transportado no floema. No tratamento com NO_3^- observaram-se aumentos em ASP e em tratamento com O_2 foram observados aumentos de LEU, PRO e ASP. Os demais aminoácidos não sofreram alterações (Parsons & Baker, 1996).

Os teores de GLN no floema nos tratamentos com N, NO_3^- ou NH_4^+, sugerem que esse aminoácido não é uma molécula sinalizadora do "*status*" de N em soja, mediando a queda na nitrogenase, conforme observado por Neo & Layzell (1997). Nesse trabalho, ocorreu uma mudança da composição da seiva do floema de plantas de tremoço e soja após aplicação de NH_4^+ na parte aérea, resultando num aumento do N, sobretudo de GLN. Foi sugerido que a elevação de GLN no floema causou o aumento da resistência do nódulo à difusão ao O_2, alterando por conseqüência, o metabolismo do nódulo e a atividade da nitrogenase ao controlar o suprimento de O_2 para as células infectadas com a bactéria.

4.2. Transporte de N em soja nodulada após transferência para sistema hidropônico

Uma vez caracterizada a composição nitrogenada transportada no xilema de soja nodulada e as alterações ocorridas na presença de N-inorgânico, foram conduzidos experimentos com hidroponia (com aeração), como tratamento alternativo ao efeito do N-combinado, para levar a inibição da fixação do N_2. O efeito inibitório da hidroponia sobre a fixação de N_2 está fundamentado na queda brusca de URE (Puiatti & Sodek, 1999) e em observações próprias, de que as plantas noduladas se desenvolvem lentamente nessa condição,

ao contrário das plantas não-noduladas que apresentam um bom desenvolvimento. Desta maneira, procurou-se ampliar os efeitos observados nos experimentos anteriores, associando ao tratamento hidroponia a presença/ausência de NO_3^- e presença/remoção dos nódulos radiculares.

De forma geral, as mudanças do transporte de N na seiva do xilema mostraram uma influência direta e combinada, em função da hidroponia, da remoção dos nódulos e presença de NO_3^-.

Os teores de URE na seiva do xilema diminuiram abruptamente nas plantas transferidas para hidroponia, em todos os tratamentos. Os efeitos se mostraram ainda mais intensificados quando os nódulos foram excisados, visto que são sítios de produção de ureídeos (tabela 5). Nas raízes, embora os efeitos tenham sido significativos em todos os tratamentos, as reduções foram menos pronunciadas do que as observadas nos nódulos (tabelas 6 e 7).

Os mecanismos de inibição do NO_3^- sobre a fixação de N_2 envolvem basicamente três hipóteses. A primeira sugere uma limitação de carboidratos, privando os bacteróides de poder redutor e de energia para a fixação de N_2, devido ao consumo dessas fontes no processo de redução do NO_3^-, o qual pode ocorrer na parte aérea, na raiz ou no nódulo (Drevon *et al.*, 1988a). A segunda hipótese baseia-se no efeito tóxico gerado pelo metabolismo do NO_3^- no nódulo (Becana & Sprent, 1989; Becana *et al.*, 1989) e a terceira , mais recente, baseia-se na limitação de O_2 para a atividade do bacteróide, proporcionada por uma barreira à difusão do O_2 no córtex do nódulo, intensificada pela presença do NO_3^- (Minchin *et al.*, 1989; Hunt & Layzell, 1993; Denison & Harter, 1995).

Uma possibilidade alternativa para o efeito direto do NO_3^- na fixação do N_2 é a dissipação do potencial transmembrana que poderia interferir com o transporte de ácidos

dicarboxílicos, malato e succinato, através da membrana peribacteróide (Udvardi & Day, 1989; Vassileva & Ignatov, 1996).

Tabela 5. Composição (mol %) de aminoácidos livres, teor de aminoácidos livres solúveis totais (ALT) e ureídeos totais (URE) de exsudatos de xilema de plantas de soja cv. IAC - 17 em estádio R2 cultivadas em vermiculita (V) sem N e quatro dias após transferência para hidroponia (H) na presença de NO_3^- 15 mM (N+) e ausência de N (N-), em combinação com a remoção (NOD-) ou presença de nódulos (NOD+)

XILEMA	V	V → H 4 d				V
	0 dia	N+/NOD+	N+/NOD-	N-/NOD+	N-/NOD-	4º dia
ASP	**15,14**	**3,87**	**3,91**	**43,13**	**27,98**	**13,74**
GLU	**1,21**	**0,60**	**0,24**	**6,17**	**1,96**	**0,95**
ASN	**42,87**	**75,90**	**76,70**	**19,77**	**19,02**	**43,50**
GLN	**20,17**	**2,92**	**2,33**	**2,23**	**1,57**	**21,05**
SER	3,97	0,35	0,95	4,88	4,95	2,75
ALA	0,36	0,86	0,23	1,05	1,24	0,37
GABA	1,85	1,12	1,53	3,39	2,06	1,88
Outros	14,43	14,38	14,11	19,38	41,22	15,76
URE (µmol/gMF)	9,14 a	0,48 bc	0,24 cd	0,64 b	0,13 d	9,29 a
ALT (µnol/mL)	2,33 b	4,12 a	4,04 a	0,98 c	0,14 d	2,35 b

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 3 %)
**Médias seguidas de mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade (n= 4)

Arrese-Igor *et al.* (1997) observaram que a aplicação de NO_3^- 10 mM em soja nodulada, no estádio vegetativo, causou um declínio rápido na fixação do N_2 e um conseqüente declínio dos ureídeos na seiva do xilema, de forma que o decréscimo da atividade da nitrogenase e a redução de URE mostraram-se paralelos. Não foi observado nenhum efeito sobre os componentes 1 e 2 da nitrogenase, e os níveis da proteína permaneceram inalterados durante os oito dias de avaliação e ainda estavam presentes aos 24 dias de suprimento com NO_3^-. O efeito do NO_3^- sobre à fixação do N_2 foi associado a um decréscimo da atividade da

nitrogenase ligado à respiração, a aumentos da resistência à difusão ao O_2 pelo nódulo e ao gasto de C durante a fixação de N_2.

A diminuição do processo de redução do N_2 frente aos tratamentos com NH_4^+, NO_3^- em vermiculita e NO_3^- associado com a hidroponia, pode ter envolvido qualquer um dos mecanismos propostos ou mesmo uma interação entre eles. Já para o tratamento envolvendo hidroponia sem N, a hipótese do aumento da resistência à difusão do O_2 para o interior do nódulo parece plausível, uma vez que a velocidade de difusão do O_2 é cerca de 100 vezes menor em água do que no ar (Thomson & Geenway, 1991) e mesmo concentrações de O_2 ambientes são limitantes à fixação de N_2 (Hunt *et al.*, 1989), além de ser detectado o processo de fermentação em alguns casos (Tajima & Larue, 1982; Heckman & Drevon, 1987). A possibilidade de danos causados nos nódulos e raízes por formas ativas de O_2 ($O^{\bullet}{}_2^-$, H_2O_2, $OH^{\bullet}$) induzidas pelos diferentes estresses não pode ser descartada (Becana & Klucas, 1992; Escuredo *et al.*, 1996).

Os teores de ALT transportados no xilema das plantas transferidas para hidroponia na ausência de N, diminuiram abruptamente. Este efeito foi ainda mais intenso quando os nódulos foram removidos. O menor teor de aminoácidos nesse tratamento, juntamente com a diminuição de ureídeos, evidencia a contribuição dos nódulos para o teor da fração nitrogenada transportada no xilema (tabela 5).

Os teores de ALT transportados no xilema das plantas na presença de NO_3^-, mostraram um acréscimo, independentemente da remoção dos nódulos. Respostas semelhantes foram observadas nas raízes das plantas submetidas a esses tratamentos (tabelas 5 e 6).

Pate *et al.* (1980) avaliaram a composição de N transportada no xilema de plantas noduladas feijão de corda e outras leguminosas transportadoras de ureídeos sob o efeito do NO_3^-. O aumento da dose de NO_3^-, causou uma elevação do teor de ALT e do NO_3^- e

diminuição do teor de URE transportados no xilema, à semelhança do observado em soja neste trabalho. Em nódulos, no entanto, a transferência das plantas para hidroponia causou uma

Tabela 6. Composição (mol %) de aminoácidos livres, teor de aminoácidos livres solúveis totais (ALT) e ureídeos totais (URE) de extratos de raízes de plantas de soja cv. IAC –17, em estádio R2, cultivadas em vermiculita (V) sem N e após quatro dias após transferência para hidroponia (H) na presença de NO_3^- 15 mM (N+) e ausência de N (N-), em combinação com a remoção (NOD-) ou presença de nódulos (NOD+)

RAIZ	V	V → H 4 d				V
	1º dia	N+/NOD+	N+/NOD-	N-/NOD+	N-/NOD-	4º dia
ASP	**10,20**	**5,52**	**5,67**	**9,48**	**8,97**	**11,88**
GLU	**6,72**	**3,47**	**3,05**	**5,81**	**5,35**	**6,92**
ASN	**10,67**	**53,64**	**54,33**	**6,50**	**6,88**	**8,75**
GLN	**10,11**	**2,47**	**1,79**	**4,45**	**2,27**	**9,31**
SER	6,37	3,47	2,69	5,35	5,45	7,00
ALA	6,13	2,89	2,95	4,94	4,11	4,69
GABA	7,43	5,16	4,70	9,72	9,55	5,07
Outros	42,37	23,38	24,82	53,75	57,42	46,38
URE (µmol/gMF)	0,90 a	0,53 b	0,62 b	0,57 b	0,53 b	0,86 a
ALT (µmol/mL)	1,66 b	2,46 a	2,51 a	1,36 d	1,48 c	1,61 b

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 4%)
**Médias seguidas de mesma letra , na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade (n= 4)

queda de ALT, tanto na presença quanto na ausência do NO_3^-, o que caracterizou uma diminuição de assimilação de N nesses órgãos (tabela 7).

Resultados obtidos com ervilha (Minchin & Pate, 1975), feijão-de-corda (Atkins *et al.*, 1988a) e soja (Puiatti & Sodek, 1999) demonstraram a influência da hidroponia em tornar deficiente a assimilação do N dessas espécies, quando em associação simbiótica com rizóbio.

O aumento de ALT associado com a diminuição do teor de URE no xilema e nas raízes, e diminuição de URE e de ALT nos nódulos sugere a assimilação de NO_3^- induzida nas raízes em detrimento da fixação de N_2 nos nódulos (tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 7. Composição (mol %) de aminoácidos livres, teor de aminoácidos livres solúveis totais (ALT) e ureídeos totais (URE) de extratos de nódulos de plantas de soja cv. IAC - 17 em estádio R2 cultivadas em vermiculita (V) sem N e após quatro dias após transferência para hidroponia (H) na presença de NO_3^- 15 mM (N+) e ausência de N (N-), em combinação com a remoção (NOD-) ou presença de nódulos (NOD+)

NÓDULO	V	V → H 4 d		V
	0 dia	N+/NOD+	N-/NOD+	4º dia
ASP	**5,96**	**7,06**	**9,53**	**5,55**
GLU	**14,79**	**21,02**	**19,04**	**13,36**
ASN	**20,80**	**7,19**	**7,14**	**19,64**
GLN	**0,93**	**1,03**	**1,04**	**0,90**
SER	8,93	5,18	5,98	7,58
ALA	9,81	8,79	11,89	9,49
GABA	15,76	21,59	20,93	16,83
Outros	23,02	28,14	24,45	26,65
URE (µmol/gMF)	2,13 a	0,54 c	1,11 b	2,02 a
ALT (µmol/mL)	19,24 a	16,04 b	14,24 c	19,23 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 3 %)
**Médias seguidas de mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade (n= 4)

A transferência da soja nodulada para cultivo hidropônico, causou alterações substanciais na composição dos aminoácidos transportados na seiva do xilema, especialmente com relação as amidas ASN e GLN, mostrando respostas diferenciadas em relação à associação com os tratamentos de remoção dos nódulos e/ou presença do íon NO_3^-.

O teor de ASN transportado na seiva de xilema elevou-se nas plantas transferidas para hidroponia em solução contendo NO_3^-, de forma semelhante ao observado nas raízes. Essa resposta parece ser conseqüência exclusiva da assimilação do NO_3^- pelas raízes, pois o aumento em ASN ocorreu na mesma intensidade nos tratamentos envolvendo a remoção ou presença dos nódulos (tabelas 5, 6 e 7). Por outro lado, as plantas transferidas para solução sem N apresentaram uma diminuição severa no teor de ASN e um aumento concomitante no teor de ASP, o que sugere que em condições limitantes à assimilação de N, a soja prioriza o transporte de ASP, em relação à ASN. O aumento mais pronunciado de ASP no xilema das plantas que não tiveram seus nódulos destacados, sugere serem os nódulos uma fonte importante desse aminoácido (tabela 5, 6 e7).

A proporção ASP/ASN nas raízes também aumentou em plantas que não receberam NO_3^- e diminuiu na presença desse íon. Nos nódulos houve um acréscimo na relação ASP/ASN na presença e na ausência de NO_3^-, não ocorrendo diferenças na intensidade de resposta, o que reforça a idéia de uma deficiência de fixação e de assimilação de N dos nódulos em ambos os sistemas (tabelas 6 e 7). Portanto, a diminuição de ASN no xilema no tratamento sem N parece ter uma correspondência mais direta com o decréscimo de ASN nos nódulos, como resultado da fixação diminuída e o aumento dessa amida no xilema de plantas sob o tratamento com NO_3^-, parece estar mais relacionado ao aumento da ASN nas raízes, como resultado da assimilação do íon. Estes resultados associados com as variações de URE no xilema, raízes e nódulos, nos diferentes tratamentos, concordam com vários trabalhos que registraram na presença de N inorgânico, uma mudança do transporte de ureídeos para amidas (Matsumoto *et al.*, 1977; Pate *et al.*, 1979; 1980; Paterson & Larue, 1983; McNeil & Larue, 1984).

De forma diferente à ASN, a GLN mostrou uma redução abrupta na seiva do xilema em todos os tratamentos, mesmo naqueles que receberam NO_3^-. A redução da GLN foi mais

pronunciada nos tratamentos com plantas que tiveram seus nódulos destacados (NOD-), acompanhando as variações observadas para os ureídeos, o que sugere ser esta amida o aminoácido estritamente relacionado com a atividade metabólica do nódulo (tabela 5).

A queda de GLN no xilema de plantas noduladas após transferência para solução sem N, pode explicar a redução de ASN (via asparagina sintetase) e o aumento do ASP. Uma vez que o N disponível para síntese de ASN está restrito, devido à queda da fixação do N_2, a síntese de GLN, precursora de ASN é limitada e ocorre a preferência pelo transporte de ASP. Por outro lado, na presença de NO_3^-, a síntese de GLN continuou inibida, devido à inibição do processo de fixação de N_2 pela hidroponia e NO_3^-. Porém, nesse caso, o aumento de ASN pode ser explicado pela redução e assimilação do N-NO_3^- nas raízes.

O aumento da razão GLU/GLN na seiva do xilema foi uma resposta comum a todos os tratamentos, principalmente devido à grande diminuição de GLN. Nos tratamentos sem N-NO_3^-, foi observado um leve aumento de GLU, especialmente na ausência de nódulos, sugerindo, em situação de deficiência de assimilação de N, uma importância relativa de GLU no transporte de N.

A diminuição dos teores de GLN no xilema manteve uma correspondência com os teores de GLN nas raízes, os quais decresceram com a transferência das plantas para hidroponia (tabelas 5 e 6).

Apesar de não terem sido observadas mudanças nos teores de GLN nos nódulos, ocorreu um aumento de GLU após transferência para hidroponia, o que poderia sugerir uma adaptação momentânea frente à deficiência de assimilação de N, uma vez que GLU é doador de N para biossíntese de compostos nitrogenados (tabela 7). Por outro lado, a proporção relativamente alta de GLU nos nódulos do controle, comparada à GLN, sugere que as mudanças bruscas encontradas na seiva do xilema com relação à GLN frente aos tratamentos testados, não envolve mudanças no tamanho do "pool" de GLU e de GLN nos nódulos. Além

disso, apesar de níveis razoavelmente altos de GLN terem sido observados no xilema do controle, em plantas transportadoras de URE, como a soja, GLN é preferencialmente utilizada na biossíntese de URE (Schubert, 1986), o que reforça os baixos níveis verificados nos nódulos.

Os teores relativamente baixos de GLN e ASP nos nódulos podem também refletir a sua rápida utilização na síntese de outros aminoácidos, como ASN, que foi o aminoácido encontrado em maior proporção nesses órgãos, conforme também observado por Rosendahl *et al.* (1990). Por outro lado, em experimentos realizados com soja, Streeter (1987a, 1987b) encontrou baixos teores de ASN no citossol da célula hospedeira e nos bacteróides, inclusive menores que os da GLN.

A ALA mostrou valores relativamente baixos na seiva do xilema, aumentando um pouco, no entanto, quando as plantas foram transferidas para solução isenta de N, independentemente da presença dos nódulos (tabela 5). Apesar dos níveis relativamente altos de ALA nos nódulos e raízes, os tratamentos utilizados não influenciaram de forma marcante o teor desse aminoácido. Observou-se no entanto, um pequeno decréscimo nas raízes sob os tratamentos que receberam NO_3^- (tabelas 6 e 7).

Os teores de GABA do xilema foram relativamente baixos, no entanto tenderam a um um aumento sob o tratamento sem N, à semelhança do observado nas raízes. Em nódulos, os aumentos observados foram independentes do N (tabela 5, 6 e 7). Serraj *et al.* (1998) observaram um aumento da concentração de GABA em seis vezes, em nódulos de plantas de soja submetidos a seis horas de hipóxia. Tratamento com PEG não causou nenhuma alteração. Raízes de plantas noduladas de *S. rostrata* também apresentaram proporções relativamente altas de ALA e GABA (Godber & Parsons, 1998). Por outro lado, os teores altos de GABA, ALA e GLU encontrados nos nódulos, em comparação com os encontrados na seiva de

xilema, mesmo nas plantas tratadas, sugere que esses aminoácidos desempenham funções específicas no metabolismo desses órgãos.

Vance & Heichel (1991), ao estudar o papel do GABA nos nódulos, considerou que este aminoácido pode exercer um papel importante no balanço de pH do nódulo, especificamente como um dreno de H^+.

O NH_4^+ tem sido considerado como a forma mais provável do N fixado liberado à planta, mas o possível envolvimento de aminoácidos tem sido sugerido, baseado nas descobertas de que simbiossomos de ervilha supridos *in vitro* com ácidos dicarboxílicos marcados radioativamente excretaram aminoácidos marcados radioativamente, principalmente ALA e ASP (Appels & Haaker, 1991; Rosendhal *et al.* 1992) e bacteróides de soja incubados com $^{15}N_2$ excretaram ^{15}N-alanina (Waters *et al.*, 1998).

Quando simbiossomos de ervilha e soja foram supridos com ^{14}C-malato sob condições microaeróbicas, a síntese e excreção de ALA em primeiro lugar e também de ASP e de GLU mostraram-se altas. Coletivamente estes compostos mostraram uma recuperação da radioatividade acima de 12 % da radiação como aminoácidos, após 30 min de incubação de uma mistura de reação (Rosendahl *et al.* 1992).

A exposição de bacteróides de *Bradyrhizobium japonicum* ao ^{14}C-succinato, ou nódulos inteiros de ervilha e soja ao $^{14}CO_2$, resultou em síntese substancial de ^{14}C-GLU, ^{14}C-ASP e ^{14}C-ALA (Rosendahl *et al.*, 1990; Salminen & Streeter, 1990). A marcação radiotiva do "pool" de GLU em soja transformou-se lentamente, sugerindo uma taxa baixa de metabolismo (Salminen & Streeter, 1987). A alta taxa de síntese do GLU foi atribuída à inibição do complexo α-KG do ciclo dos ácidos tricarboxílicos sob condições microanaeróbicas, devido a uma diminuição da razão $NADH/NAD^+$ (Salminen & Streeter, 1990).

4.3. Transporte e metabolismo de glutamina em soja após inibição e recuperação da fixação de nitrogênio

Nos experimentos anteriores foi sugerido que a redução dos níveis de GLN na seiva do xilema estava relacionada com a atividade metabólica dos nódulos. Com isso, levantou-se a hipótese de que mudanças profundas no metabolismo de GLN deveriam ocorrer em condições que limitassem a fixação do N_2. Com o objetivo de se estudar com maior detalhamento essa consideração, foi acompanhada a atividade da NADH-GOGAT em nódulos durante a transferência das plantas para hidroponia, na presença e ausência de NO_3^-. A atividade da enzima foi determinada também após o replantio das plantas em vermiculita, na ausência de N, como forma de verificar se a recuperação da atividade estava associada também com a elevação dos níveis de GLN. Além da NADH-GOGAT, a atividade da enzima GS em nódulos e em raízes de plantas, transferidas para hidroponia na presença e ausência de NO_3^-, foi também determinada e os resultados pertinentes a esses ensaios estão apresentados e discutidos no final desta seção.

A transferência das plantas para hidroponia ocasionou uma redução do teor de URE a níveis mínimos no xilema desde o primeiro dia de exposição aos tratamentos, não ocorrendo diferença quanto à presença do NO_3^-. Porém quando as plantas foram replantadas em vermiculita, a recuperação de URE se processou de forma gradual. Somente no tratamento com hidroponia sem N foi observado um nível de recuperação equivalente ao controle, no quinto dia de replantio. A recuperação dos teores de URE sob o tratamento com NO_3^- foi menos intensa e somente no oitavo dia de avaliação foram registrados valores próximos aos do controle (figura 1).

Em nódulos e raízes houve uma redução do teor de URE com os tratamentos de hidroponia, porém durante o replantio, a recuperação de URE nesses órgãos tendeu a ser mais

rápida à observada no xilema, apesar da maior variação de resposta (figura 1).

A concentração de ALT na seiva do xilema das plantas submetidas à hidroponia sem N mostrou uma redução grande, desde o primeiro dia de transferência, a qual foi acompanhada por reduções similares nos nódulos. Em raízes os efeitos não foram evidentes (figura 2).

Com o replantio, ocorreu um aumento gradativo do teor de ALT transportado no xilema. A mesma tendência foi observada em raízes e em nódulos. A recuperação foi praticamente completa aos seis dias após transferência para vermiculita, com relação ao tratamento sem N, fase em que o teor de URE se mostrou equivalente ao controle, demonstrando assim, o aumento da síntese dos aminoácidos transportados relacionado à recuperação da fixação do N_2 (figuras 1 e 2).

Atkins *et al.* (1984a) verificaram uma grande redução do N-total na seiva do xilema e em menor escala nos nódulos de feijão-de-corda, ao submeter o sistema radicular a um tratamento inibitório à fixação de N_2 com uma mistura de $Ar:O_2$ durante três dias. A supressão do tratamento causou um aumento relativamente rápido desses compostos, já durante as primeiras 6 h, apesar da recuperação completa não ter sido evidenciada até 48 h após retorno das plantas à atmosfera ambiente. A recuperação de ureídeos foi gradual, tanto no xilema quanto nos nódulos com o término do estresse.

Kuzma *et al.* (1999) ao submeterem nódulos de soja a níveis sub-ambientais de O_2, encontraram variações nos "pools" de adenilatos somente na fração correspondente aos bacteróides, atribuindo esse efeito como uma resposta à limitação do O_2 à respiração do bacteróide. No entanto, Guash *et al.* (2001) relacionaram a queda de atividade da nitrogenase em nódulos de tremoço submetidos a 1 % de O_2, à redução da respiração nodular, além da redução respiratória dos bacteróides. Segundo esses pesquisadores, ao se levar em consideração que o K_m da citocromo oxidase mitocondrial é 50 nmol/L e a oxidase terminal

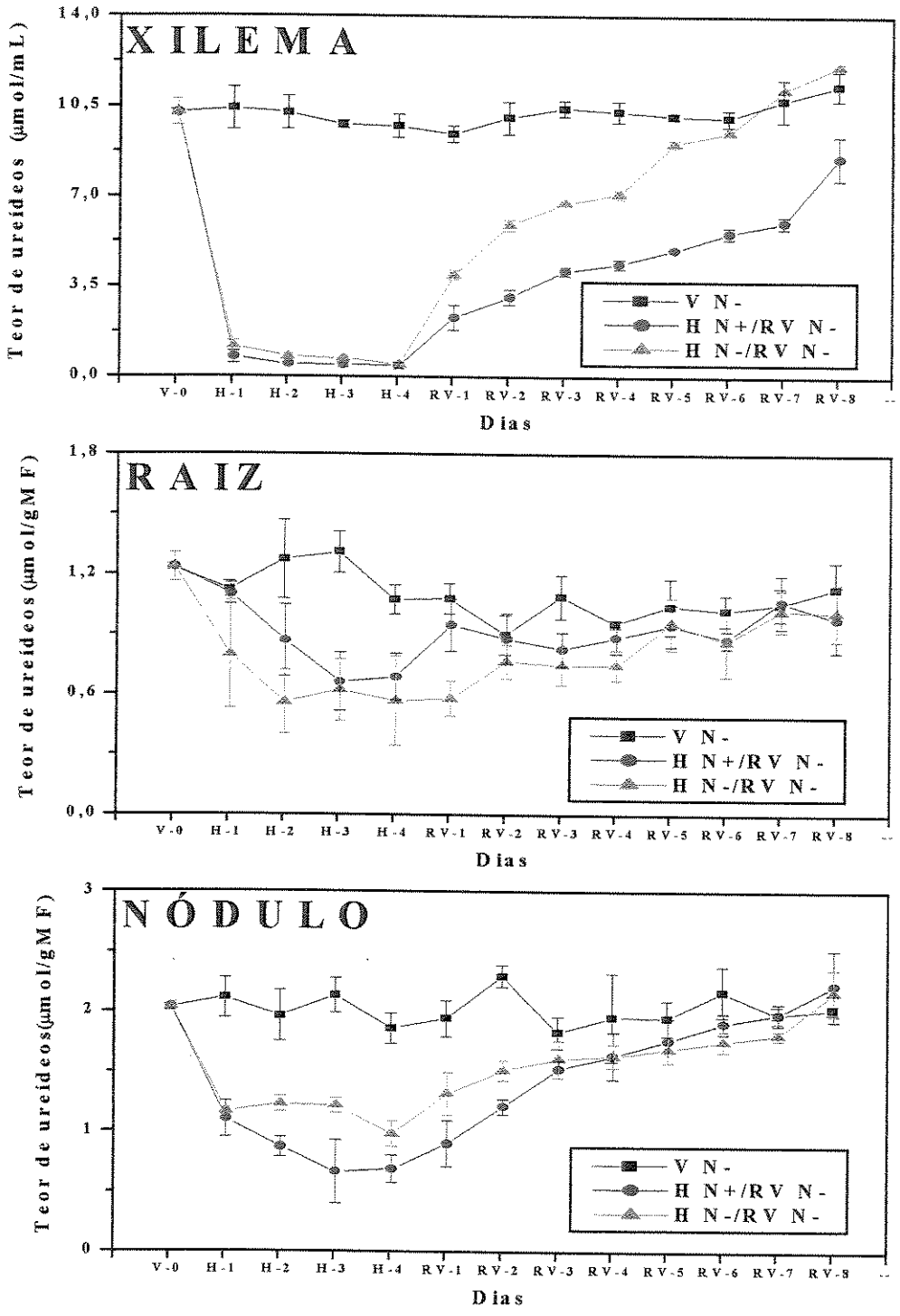


Figura 1. Teor de ureídeos em seiva de xilema, em raízes e em nódulos de plantas de soja cv. IAC-17 cultivadas em vermiculita sem N (V N-) e transferidas para hidroponia (H) durante 4 dias, em estádio R2, na presença de N-NO_3^- 15 mM (N+) e ausência de N (N-) com posterior replantio em vermiculita (RV N-) na ausência de N. Barra = E.P. (n= 3)

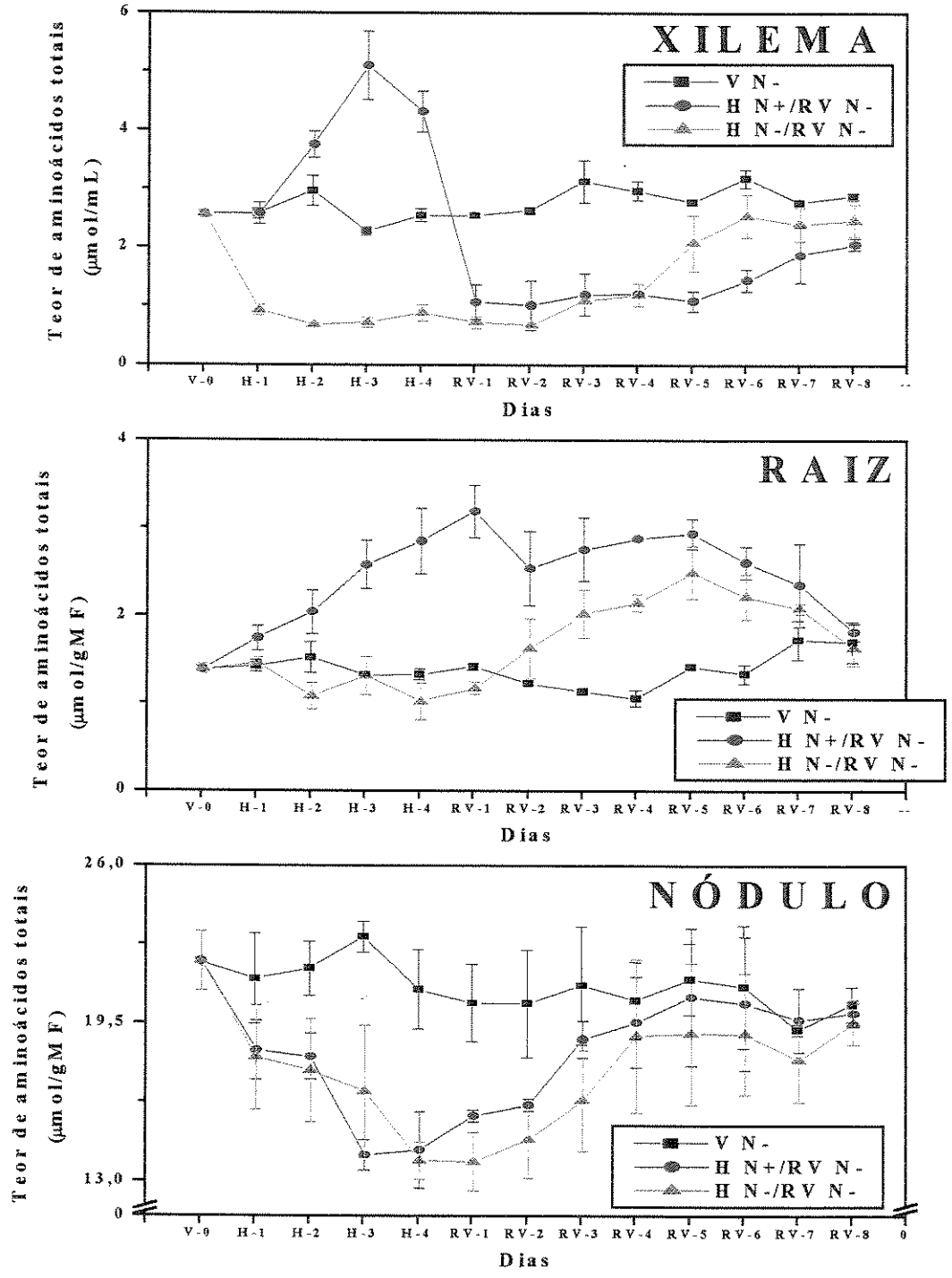


Figura 2. Teor de aminoácidos solúveis livres totais (ALT) em seiva de xilema, em raízes e em nódulos de plantas de soja cv. IAC-17 cultivadas em vermiculita sem N (V N-) e transferidas para hidroponia (H) em solução contendo NO_3^-, 15 mM (N+) e sem N (N-) com posterior replantio em vermiculita (RV N-) fertilizada com solução sem N. Barras = E.P. (n=3)

dos bacteróides tem um K_S de 7 nmol/L (Millar *et al.*, 1995), a respiração mitocondrial deveria sofrer sempre maior inibição. Portanto, é possível que o efeito inibitório da hidroponia sobre o metabolismo do nódulo, principalmente com relação à atividade da nitrogenase, tenha tido uma relação direta com a disponibilidade de O_2. Uma vez que a restrição à difusão ao O_2 ambiente é normalmente imposta por meio da barreira ao O_2 no nódulo (Bergersen, 1997b; Thumfort *et al.*, 1999), o envolvimento de água ao seu redor devido à hidroponia, deve ter potencializado esse efeito. Considerando que a difusão do O_2 é 100 vezes menor em água do que no ar (Thomson & Greenway, 1991), mesmo os teores de saturação de O_2 medidos no sistema hidropônico (em torno de 84 %), não foram suficientes para evitar uma situação de hipóxia nos nódulos.

Os teores de ALT foram elevados no xilema e em raízes e reduzidos nos nódulos das plantas transferidas para solução contendo NO_3^-, sugerindo que o aumento da assimilação do N esteve relacionado basicamente à assimilação de NO_3^- nas raízes, em detrimento dos nódulos (figura 2). Por outro lado, com o replantio, foi observada inicialmente uma queda abrupta do teor de ALT no xilema, seguido de uma recuperação gradual até o oitavo dia de observação. Nas raízes foi registrada uma diminuição do teor de ALT após o replantio e um aumento nos nódulos, que juntamente com as mudanças em URE no xilema, nas raízes e nos nódulos, sugere uma substituição gradual da assimilação do NO_3^- pela fixação do N_2 (figuras 1e 2).

As mudanças do teor de ALT estiveram associadas às oscilações do teor do NO_3^- na seiva do xilema, raízes e nódulos. Durante a permanência das plantas em hidroponia houve uma elevação do teor do NO_3^- na seiva do xilema, raízes e nódulos. Com o replantio, foi observada uma queda abrupta do teor desse íon no xilema e nas raízes, e de forma mais gradual nos nódulos (figuras 2 e 3).

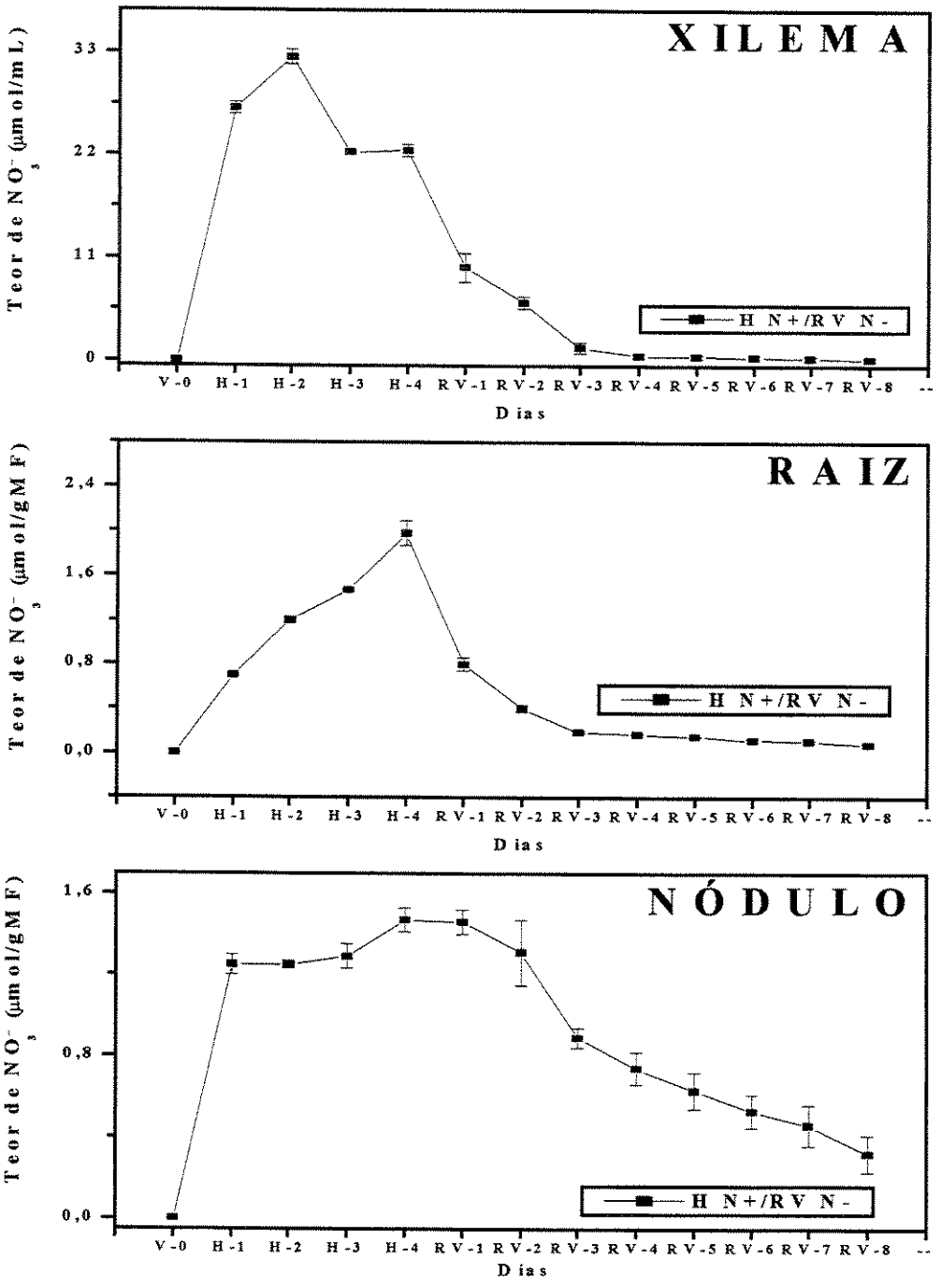


Figura 3. Teor de nitrato em seiva de xilema, massa fresca de nódulos e massa fresca de raízes de plantas de soja cv. IAC-17, cultivadas em vermiculita na ausência de nitrogênio (V N-) e transferidas para hidroponia (H) durante 4 dias, em estádio R2, na presença de NO^-_3 15 mM (N+) com posterior replantio em vermiculita (RV N-) fertilizada com solução nutritiva isenta de nitrogênio. Barras= E.P. (n=3)

O aumento de forma mais gradual do teor de URE na seiva do xilema com o replantio das plantas que se encontravam sob hidroponia com NO_3^-, em relação ao tratamento sem N, concordam com o trabalho de Heckmann & Drevon (1987), o qual demonstrou que a atividade da nitrogenase é menos estimulada pelo O_2 externo em presença do NO_3^-.

A presença do NO_3^- deve ter exercido um efeito adicional à hidroponia sobre a disponibilidade de O_2 para o funcionamento dos nódulos. Isso pode ser apoiado por observações de outros pesquisadores, como a de que o efeito adverso do NO_3^- na fixação do N_2 pode ser minorado pelo aumento da pressão parcial de O_2 (pO_2) (Drevon *et al.*, 1988a, Hunt *et al.*, 1989, Dakora & Atkins, 1990), ou pela adição de oxileg-hemoglobina à suspensão de bacteróides previamente ao NO_3^- (Becana & Sprent, 1987). No entanto, não pode ser descartado o efeito adverso do NO_3^- dentro do nódulo, levando à conversão de leg-hemoglobina à forma nitrosil (Kanayama *et al.*, 1990, Hunt & Layzel, 1993), ou mesmo o efeito direto do NO_3^- na membrana peribacteróide, causando desestabilização dessa, alterando o transporte de ácidos dicarboxílicos (malato e succinato) através da membrana, proporcionado pelo acúmulo de poli-β-hidroxibutirato, o qual atua inibindo a nitrogenase (Blumwald *et al.*, 1985, Udvardi & Day, 1989, Vassileva & Ignatov, 1996). Danos às células causados por formas de O_2 ativado, induzidas pelo estresse, podem também ter ocorrido (Becana & Klucas, 1992, Escuredo, 1996).

Com relação à composição de aminoácidos livres totais transportados no xilema, ocorreu uma queda imediata da GLN nos tratamentos utilizados. Com a permanência das plantas em hidroponia, os baixos teores de GLN foram acompanhados por um acréscimo de ASP e diminuição de ASN no tratamento sem N. Na presença de NO_3^- foi observado um aumento de ASN e uma redução dos teores de ASP, inicialmente aumentados com transferência das plantas para o sistema hidropônico (tabela 8).

Em nódulos, foi observada uma queda de ASN com a transferência das plantas para hidroponia, tanto na presença quanto ausência de NO_3^-, o que associado à diminuição de URE e ALT, demonstra um decréscimo de assimilação de N nesse órgão (tabela 9, figuras 1 e 2).

Os teores de GLN e de ASN encontrados nas raízes para os tratamentos HN-/HN+ mostraram uma correspondência direta às tendências observadas no xilema: diminuição de ASN/aumento de ASN e decréscimo de GLN em ambos os tratamentos. Essas observações associadas à queda de ASN nos nódulos em ambos tratamentos, sugerem que o aumento da ASN deve-se basicamente ao aumento da assimilação do NO_3^- pelas raízes e que a queda em GLN deve-se basicamente à queda de assimilação de N nos nódulos (tabelas 8, 9 e 10).

Com o replantio, houve uma recuperação dos teores de GLN na seiva do xilema. Os mesmos foram acompanhados por uma elevação dos teores de ASN e diminuição gradual de ASP das plantas submetidas à hidroponia sem N. No entanto, plantas provenientes do tratamento com NO_3^-, apresentaram uma recuperação mais lenta dos teores de GLN, os quais não foram correspondentes às variações encontradas com relação à ASN. Foi observada nesse tratamento uma queda do teor de ASN até o quarto dia. A partir desse ponto, os teores de ASN se aproximaram do controle (tabela 8). A transição do teor dessa amida no xilema, sugere uma deficiência momentânea de assimilação do N provocada pela restrição do NO_3^- disponível para sua síntese e início do reestabelecimento do processo de fixação de N_2 (tabela 8, figura 3).

Mesmo considerando as variações observadas, no que se refere à proporção de ASN no xilema, o aumento do transporte dessa amida nas plantas provenientes do tratamento com N e sem N após replantio, sempre esteve associado a uma diminuição do teor de ASP e aumento de GLN (tabela 8).

Ao se comparar a elevação da ASN do tratamento com NO_3^- com o tratamento sem N após o replantio, os maiores níveis de ASN encontrados na seiva do xilema desde o início da

Tabela 8. Composição aminoácidica (mol %) da seiva de xilema de plantas de soja cv. IAC-17 cultivadas em vermiculita sem N (V N-) e após transferência para hidroponia em solução contendo N-NO_3^- 15 mM (H N+) e em solução sem N (H N-) seguidas de replantio em vermiculita sem N (RV N-)

XILEMA	0 d V N-	1 d V N-	2 d V N-	3 d V N-	4 d V N-	1dR V N-	2dR V N-	3dR V N-	4dR V N-	5dR V N-	6dR V N-	7dR V N-	8dR V N-
ASP	6,25	4,48	6,03	8,24	9,52	9,86	6,37	8,56	6,69	5,15	5,73	5,65	2,91
GLU	0,77	0,65	0,94	0,73	0,81	0,58	0,65	0,62	0,54	0,39	0,51	0,40	6,70
ASN	52,96	54,45	52,79	51,65	50,11	39,67	44,51	49,00	46,18	43,65	39,73	40,65	40,76
SER	1,90	2,21	1,31	2,19	2,29	4,30	2,26	1,59	3,64	3,27	2,19	2,10	2,55
GLN	20,93	21,11	21,58	20,10	20,02	21,89	23,94	22,46	25,35	27,63	28,30	28,73	31,91
ALA	0,67	0,79	0,68	0,57	0,62	0,94	0,84	0,43	0,58	0,80	0,66	0,55	0,56
GABA	1,21	1,07	1,30	1,25	1,35	2,26	2,59	1,27	1,18	1,81	2,29	1,72	1,87
Outros	15,31	15,24	15,37	15,27	15,28	20,50	18,84	16,07	15,84	17,30	20,59	20,20	12,74

	1 d HN-	2 d HN-	3 d HN-	4 d HN-	1dHN-/RVN-	2dHN-/RVN-	3dHN-/RVN-	4dHN-/RVN-	5dHN-/RVN-	6dHN-/RVN-	7dHN-/RVN-	8dHN-/RVN-
ASP	43,32	56,59	59,40	61,51	58,31	36,71	24,82	19,02	14,53	10,08	10,00	8,65
GLU	12,79	8,74	7,71	6,80	2,46	1,42	1,28	1,48	0,59	0,69	1,05	0,40
ASN	23,68	20,29	19,85	11,93	14,32	25,93	28,58	34,12	41,51	42,08	52,83	51,76
SER	4,14	2,06	2,01	1,74	1,19	2,05	2,57	2,19	1,88	1,16	2,34	1,63
GLN	5,11	3,17	2,19	2,15	4,58	12,81	15,66	16,50	19,91	21,92	23,43	28,94
ALA	2,11	1,57	1,19	1,15	0,78	0,50	1,11	1,91	0,63	0,49	1,32	0,55
GABA	2,75	2,31	1,69	1,68	4,65	4,39	3,42	2,16	1,31	0,93	0,59	0,90
Outros	6,10	5,27	5,96	13,04	13,71	16,19	22,56	22,62	19,64	22,65	8,44	7,17

	1d HN+	2d HN+	3d HN+	4d HN+	1d HN+/ RVN-	2d HN+/ RVN-	3d HN+/ RVN-	4d HN+/ RVN-	5d HN+/ RVN-	6d HN+/ RVN-	7d HN+/ RVN-	8d HN+/ RVN-
ASP	20,20	13,68	6,38	5,10	24,45	36,29	25,29	24,09	21,85	17,94	15,16	7,64
GLU	4,01	1,96	0,95	0,81	1,39	0,85	1,58	1,48	2,17	3,66	1,85	0,28
ASN	39,88	61,58	66,58	72,90	54,75	33,87	31,90	32,03	36,03	40,33	39,46	39,03
SER	4,03	1,52	0,51	0,37	0,80	1,06	2,33	1,36	1,36	2,31	1,06	2,70
GLN	4,60	3,41	2,74	2,21	4,40	5,84	7,89	12,32	14,54	17,86	19,39	26,91
ALA	3,16	1,12	0,27	0,25	0,31	0,49	0,84	1,22	0,95	1,11	0,92	0,42
GABA	2,13	0,99	0,61	0,32	1,72	2,21	2,56	3,08	1,82	1,42	1,80	1,30
Outros	21,99	15,74	21,96	18,04	12,18	19,39	27,61	24,42	15,28	15,37	20,36	21,72

recuperação das plantas, em relação ao baixo teor de GLN, pode ser atribuído à assimilação do NO_3^- residual encontrado nas raízes e nos nódulos. Isso também pode em parte justificar a recuperação mais lenta da GLN e ureídeos nesse tratamento, visto que o íon foi utilizado em concentração inibitória à fixação de N_2 (tabela 8, figuras 1 e 3).

Em raízes, a elevação do teor de GLN mostrou uma tendência similar à detectada no xilema durante a recuperação das plantas submetidas ao tratamento sem N, ou seja, um aumento concomitante de ASN e de GLN. Já em plantas submetidas ao NO_3^- a elevação da GLN durante a recuperação, acompanhou um decréscimo contínuo dos teores de ASN mesmo quando os níveis de GLN se apresentavam próximos ao controle, o que pode ser reflexo de uma mobilização desta amida frente ao maior efeito do estresse nesse tratamento e adaptação exigida com o replantio (tabela 10).

Nos nódulos a recuperação da capacidade de assimilação do N foi evidenciada pela elevação dos teores de ASN. A recuperação se processou de forma mais lenta nas plantas submetidas ao tratamento com N demonstrando o maior impacto da presença do NO_3^- sobre a atividade do nódulo (tabela 9).

A proporção de ALA transportada no xilema, aumentou com a transferência das plantas para o sistema hidropônico, tendendo a diminuir com o tempo de exposição aos tratamentos, sobretudo na presença de NO_3^-. Em nódulos os valores tenderam a ser mais elevados durante a permanência das plantas em hidroponia e em raízes não foram observadas mudanças substanciais (tabelas 8, 9 e 10).

Com o replantio os níveis de ALA no xilema e nos nódulos, mantiveram-se baixos, próximos ao controle desde o primeiro dia de transferência, sugerindo uma recuperação imediata de uma possível situação de hipoxia no sistema radicular (Puiatti & Sodek, 1999), resultante do tratamento com hidroponia (tabelas 8, 9 e 10).

Os níveis de GABA transportados no xilema mostraram um leve aumento com a transferência das plantas para hidroponia no tratamento sem N e diminuição com o tratamento com NO_3^-. Em nódulos e raízes os níveis de GABA foram sempre mais altos com a transferência das plantas para a hidroponia (tabelas 8, 9 e 10). O acúmulo de ALA e GABA foi associado

com a deficiência de O_2 por Reggiani *et al.* (1988) e Reggiani (1999).

Tabela 9. Composição aminoácidica (mol %) de nódulos de plantas de soja cv. IAC-17 cultivadas em vermiculita sem N (V N-), transferidas para hidroponia por quatro dias em solução contendo N-NO_3^- 15 mM (H N+) e em solução sem N (H N-) e posteriormente replantadas em vermiculita sem N (RV N-)

NÓDULO	0 d V N-	1 d V N-	2 d V N-	3 d V N-	4 d V N-	1dR V N-	2dR V N-	3dR V N-	4dR V N-	5dR V N-	6dR V N-	7dR V N-	8dR V N-
ASP	**10,18**	**11,92**	**12,51**	**13,73**	**12,34**	**14,01**	**12,04**	**14,10**	**19,89**	**15,86**	**17,53**	**14,05**	**13,52**
GLU	19,57	20,53	15,38	23,01	19,27	11,02	11,73	16,92	16,71	15,18	19,04	20,03	19,56
ASN	**18,00**	**17,29**	**17,00**	**16,98**	**17,75**	**20,15**	**20,29**	**22,12**	**18,93**	**19,86**	**20,36**	**19,94**	**20,44**
SER	10,38	10,72	10,86	8,46	8,29	11,02	11,59	7,98	7,41	7,58	8,56	7,45	7,33
GLN	**0,93**	**0,90**	**0,88**	**0,79**	**0,76**	**0,48**	**0,31**	**0,46**	**0,34**	**0,47**	**0,45**	**0,42**	**0,58**
ALA	10,12	10,15	11,20	9,70	10,83	11,31	10,14	8,09	9,76	11,53	7,12	9,88	7,20
GABA	15,93	16,11	16,69	15,14	14,68	17,63	16,03	15,85	14,39	14,45	15,58	14,97	14,03
Outros	14,89	12,38	15,48	12,19	16,08	14,38	17,87	14,48	12,57	15,07	11,36	13,26	17,36
	1 d HN-	**2 d HN-**	**3 d HN-**	**4 d HN-**	**1dHN-/RVN-**	**2dHN-/RVN-**	**3dHN-/RVN-**	**4dHN-/RVN-**	**5dHN-/RVN-**	**6dHN-/RVN-**	**7dHN-/RVN-**	**8dHN-/RVN-**	
ASP	**14,77**	**15,09**	**10,44**	**9,52**	**16,98**	**18,68**	**14,97**	**17,34**	**12,72**	**16,51**	**17,36**	**12,66**	
GLU	20,18	19,88	21,35	19,34	17,08	10,34	20,20	16,97	15,31	12,95	16,49	19,91	
ASN	**5,29**	**4,29**	**3,36**	**1,99**	**5,82**	**7,15**	**14,51**	**14,77**	**19,85**	**21,24**	**20,95**	**21,22**	
SER	10,81	8,13	7,68	7,30	11,12	12,26	8,54	7,36	5,28	7,22	5,77	7,28	
GLN	**0,79**	**0,76**	**0,80**	**0,87**	**0,34**	**0,27**	**0,26**	**0,39**	**0,23**	**0,49**	**0,31**	**0,47**	
ALA	13,94	14,53	13,01	12,98	9,80	9,83	9,72	9,07	7,16	8,63	10,16	10,29	
GABA	21,45	20,40	19,71	19,90	21,03	21,42	19,48	17,26	15,02	14,89	14,59	15,03	
Outros	12,77	16,92	23,65	28,10	17,83	20,05	12,32	16,84	24,43	18,07	14,37	13,14	
	1d HN+	**2d HN+**	**3d HN+**	**4d HN+**	**1d HN+/ RVN-**	**2d HN+/ RVN-**	**3d HN+/ RVN-**	**4d HN+/ RVN-**	**5d HN+/ RVN-**	**6d HN+/ RVN-**	**7d HN+/ RVN-**	**8d HN+/ RVN-**	
ASP	**14,04**	**11,74**	**9,72**	**4,28**	**10,06**	**17,29**	**10,77**	**16,61**	**18,45**	**18,87**	**18,09**	**6,88**	
GLU	23,13	21,87	21,46	25,60	19,18	15,62	25,69	22,32	16,91	14,55	19,14	15,83	
ASN	**3,38**	**3,06**	**1,36**	**0,79**	**3,02**	**5,28**	**10,40**	**11,70**	**13,93**	**17,96**	**19,17**	**22,43**	
SER	12,48	9,45	8,71	7,08	7,60	9,46	8,07	7,31	5,32	7,72	7,56	8,08	
GLN	**0,99**	**1,16**	**1,05**	**1,16**	**0,41**	**0,31**	**0,26**	**0,31**	**0,45**	**0,30**	**0,34**	**0,69**	
ALA	10,11	10,95	12,39	13,01	11,23	10,04	9,58	9,53	8,62	8,09	8,97	8,40	
GABA	21,73	20,38	19,75	19,58	20,78	19,85	17,04	15,88	15,79	15,41	15,29	14,27	
Outros	14,14	21,39	25,56	28,50	27,72	22,15	18,19	16,34	20,53	17,1	11,44	23,42	

No início da recuperação, a proporção de GABA (mol %) do xilema das plantas mantidas em hidroponia sem N mostrou-se relativamente alta, tendendo a valores próximos ao

controle no quarto dia de replantio. Nas plantas provenientes do tratamento com N os valores de GABA foram sempre próximos ao controle. Em raízes e nódulos, os teores de GABA diminuiram com o replantio, atingindo níveis próximos ao controle no quinto dia de transferência (tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 10. Composição aminoácidica (mol %) de raízes de plantas noduladas de soja cv. IAC-17 cultivadas em vermiculita sem N (V N-), transferidas para hidroponia por quatro dias em solução contendo N-NO_3^- 15 mM (H N+) e em solução sem N (H N-) e posteriormente replantadas em vermiculita sem N (RV N-)

RAIZ	0 d V N-	1 d V N-	2 d V N-	3 d V N-	4 d V N-	1dR V N-	2dR V N-	3dR V N-	4dR V N-	5dR V N-	6dR V N-	7dR V N-	8dR V N-
ASP	12,54	10,51	16,06	14,90	12,01	10,75	11,89	12,56	12,94	9,87	11,83	12,13	11,05
GLU	7,40	7,21	7,85	8,85	9,18	7,00	10,63	11,38	10,72	7,59	7,62	9,26	10,03
ASN	19,02	17,93	18,93	18,69	19,32	17,98	18,87	19,00	17,63	18,70	20,17	21,71	19,95
SER	6,88	7,35	6,95	7,82	8,01	8,36	6,82	6,71	6,86	7,35	7,48	6,21	7,03
GLN	7,02	7,35	6,88	6,25	7,21	5,94	5,97	7,28	7,02	6,51	6,26	6,58	7,31
ALA	2,78	2,19	4,51	3,43	4,39	3,55	2,50	4,03	3,27	4,82	4,45	2,77	3,23
GABA	5,93	6,55	5,88	7,02	6,77	7,34	6,58	5,43	6,95	7,46	7,31	5,95	5,44
Outros	38,43	40,91	32,94	33,04	33,11	39,08	36,74	33,61	34,61	37,70	34,88	35,39	35,96

	1 d HN-	2 d HN-	3 d HN-	4 d HN-	1dHN-/RVN-	2dHN-/RVN-	3dHN-/RVN-	4dHN-/RVN-	5dHN-/RVN-	6dHN-/RVN-	7dHN-/RVN-	8dHN-/RVN-
ASP	13,55	16,83	15,85	17,12	9,27	6,73	10,34	14,39	11,27	10,45	9,60	10,50
GLU	9,20	8,23	7,85	8,01	8,38	14,46	10,13	7,50	7,60	7,46	6,22	9,04
ASN	4,34	3,88	2,05	1,91	4,78	7,89	15,51	16,77	21,75	23,31	23,45	24,61
SER	6,33	6,13	6,02	5,98	7,32	7,35	5,02	4,33	4,58	5,52	5,63	7,35
GLN	5,32	3,96	3,57	1,98	2,92	2,87	3,01	3,57	4,74	5,97	6,83	7,01
ALA	5,42	4,53	4,88	5,03	4,43	3,42	4,11	3,62	2,81	3,48	4,28	2,28
GABA	6,85	7,03	8,85	9,35	8,38	8,32	9,52	8,10	8,81	8,62	8,67	5,02
Outros	48,99	49,41	50,93	50,62	54,52	48,96	42,36	41,72	38,44	35,19	35,32	34,19

	1d HN+	2d HN+	3d HN+	4d HN+	1d HN+/ RVN-	2d HN+/ RVN-	3d HN+/ RVN-	4d HN+/ RVN-	5d HN+/ RVN-	6d HN+/ RVN-	7d HN+/ RVN-	8d HN+/ RVN-
ASP	18,67	15,97	12,12	10,79	12,37	10,91	11,16	12,15	10,24	11,54	9,55	9,50
GLU	8,81	7,63	5,35	4,98	6,94	10,61	11,10	7,25	6,55	7,00	8,14	12,53
ASN	14,51	20,43	22,39	33,42	33,05	28,13	26,29	26,64	23,08	22,62	18,50	19,99
SER	7,51	6,97	4,96	4,75	5,09	5,29	4,86	6,32	4,55	5,12	3,82	5,94
GLN	3,59	2,61	1,72	1,37	1,82	2,89	3,76	4,15	4,23	4,58	4,78	5,06
ALA	3,98	3,56	5,03	5,43	2,86	2,47	3,49	3,80	4,66	3,69	3,68	2,66
GABA	8,02	7,83	8,01	8,35	9,66	8,18	9,14	8,37	7,98	7,02	7,35	5,99
Outros	34,91	35,00	40,42	30,91	28,21	31,52	30,20	31,32	38,71	38,43	44,18	38,33

A atividade da NADH-GOGAT no nódulo sofreu redução linear e intensa com o tempo de exposição aos tratamentos de hidroponia, mostrando efeitos mais acentuados na presença do NO_3^-. A queda de atividade foi acompanhada de uma redução significativa dos teores de GLN e de ureídeos transportados na seiva do xilema (figuras 1 e 4).

A recuperação da atividade da NADH-GOGAT foi rápida nas plantas submetidas ao tratamento de hidroponia sem N e gradual nas plantas provenientes do tratamento de hidroponia com NO_3^- (figura 4). Nesse caso também, a elevação da atividade da enzima mostrou tendência semelhante à recuperação do teor de ureídeos e de GLN no xilema (figuras 1 e 4).

A disponibilidade de NH_4^+ fornecida pela fixação do N_2 pode ser uma das principais causas da atividade da NADH-GOGAT ter acompanhado o nível de ureídeos e de GLN no xilema. Uma vez que a síntese de ureídeos depende de GLN e a síntese desta amida depende do N fixado e de GLU, a atividade da NADH-GOGAT poderia estar relacionada à quantidade de GLN sintetizada.

Schubert (1986) sugeriu que em leguminosas exportadoras de ureídeos como a soja, deve haver uma competição pela GLN disponível, entre a NADH-GOGAT e as enzimas que requerem GLN na rota biossintética de purinas. Nesse caso, a atividade da NADH-GOGAT pode exercer um papel chave em regular o fluxo de GLN entre GLU e a biossíntese de purinas (Chen & Cullimore, 1989).

Atkins *et al.* (1984a) observaram um retorno rápido da exportação de solutos nitrogenados em feijão-de-corda e tremoço, após inibição da fixação de N_2 por incubação de nódulos não destacados do sistema radicular, em mistura de $Ar:O_2$ (80:20; v/v) por três dias. Cerca de duas horas após transferência para a atmosfera ambiente, o principal produto de exportação foi GLN, refletindo a estabilidade relativa da atividade da GS frente ao tratamento

aplicado. Posteriormente, a GLN diminuiu e os produtos de sua assimilação predominaram na composição de N transportada, o que foi consistente com o aumento da atividade das enzimas responsáveis pela síntese de ASN em tremoço e pela síntese de ureídeos em feijão-de-corda. A atividade da NADH-GOGAT, severamente reduzida com o tratamento, aumentou para níveis superiores ao controle, em nódulos de feijão-de-corda somente após três dias de reexposição ao ar. Em plantas de tremoço, mesmo após 96 horas de supressão do tratamento inibitório à nitrogenase, a atividade da NADH-GOGAT permanecia reduzida. Os resultados foram interpretados como um efeito de longo alcance da produção de amônia pelos bacteróides sobre uma grande variedade de enzimas, possivelmente através do controle do "turnover" de proteínas, mais do que um efeito específico da amônia, ou de algum produto de sua assimilação, sobre poucas enzimas.

A queda mais acentuada e a recuperação mais lenta da atividade da NADH-GOGAT sob o tratamento com N podem estar relacionadas à maior inibição da fixação do N_2 em relação ao tratamento sem N, pois além do efeito da hidroponia sobre a atividade dos nódulos, existia a influência somatória do NO_3^-, em nível inibitório à fixação do N_2, o que deve ter causado efeitos deletérios bem maiores em todo o sistema responsável pela fixação e assimilação do N_2.

A possibilidade da assimilação do íon NO_3^- pelas células da fração vegetal do nódulo parece ser pouco provável, uma vez que a atividade da NADH-GOGAT diminuiu com o tempo de exposição ao íon. Por outro lado, é possível que o decréscimo de atividade da enzima tenha estado relacionado com a queda da nitrogenase, devido à diminuição de NH_4^+ necessário para síntese de GLN, substrato da GOGAT. Nesse caso, o efeito do NO_3^- pode ter sido apenas adicional ao estresse provocado pela hidroponia, pois a queda de GOGAT sob hidroponia N- foi também acentuada.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Schuller *et al.* (1986) registraram um decréscimo de 48 % da atividade da nitrogenase em nódulos de soja na presença de NO_3^- 10 mM, após dois dias de tratamento. No entanto, a atividade da nitrogenase em bacteróides isolados e a atividade *in vitro* da GS e GOGAT (contrariamente ao observado em nosso experimento), xantina desidrogenase, uricase e alantoinase não foram influenciadas nesse período. Os pesquisadores sugeriram então que deve ser muito pouco provável a existência de uma inibição por "feedback" da atividade da nitrogenase devido a um declínio das enzimas de assimilação de NH_4^+.

A recuperação quase que imediata da atividade da NADH-GOGAT submetida ao tratamento de hidroponia sem N, não correspondeu na mesma intensidade, à recuperação do nível de GLN e de ureídeos transportados no xilema. Isso parece indicar que a baixa quantidade de GLN disponível para sua atividade nos primeiros dias de recuperação, não tem uma relação direta com a quantidade de proteína enzimática presente nos nódulos, sob o efeito dos quatro dias de tratamento. No entanto, somente o estudo da expressão da enzima nessas condições poderia esclarecer melhor o fenômeno.

O grande aumento da atividade da NADH-GOGAT durante o desenvolvimento de nódulos de alfafa é correspondente a um aumento da proteína enzimática e do mRNA (Gregerson *et al.*, 1993). Esse aumento da expressão parece estar restrito a nódulos capazes de fixar o N_2. Em contraste, outras enzimas envolvidas na assimilação do N_2, que têm sua atividade aumentada no nódulo com o aumento da fixação do N_2, como a aspartato aminotransferase (AAT), GS, fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e ASN sintetase (AS), foram expressas tanto em nódulos efetivos quanto inefetivos, apresentando portanto expressão independente da atividade da nitrogenase. Por outro lado, um controle pós-transcrição através da efetividade dos nódulos, mostra estar envolvido na regulação da atividade da PEPC, GS e AAT (Groat & Vance, 1981; Vance & Grant, 1992; Vance *et al.*, 1994).

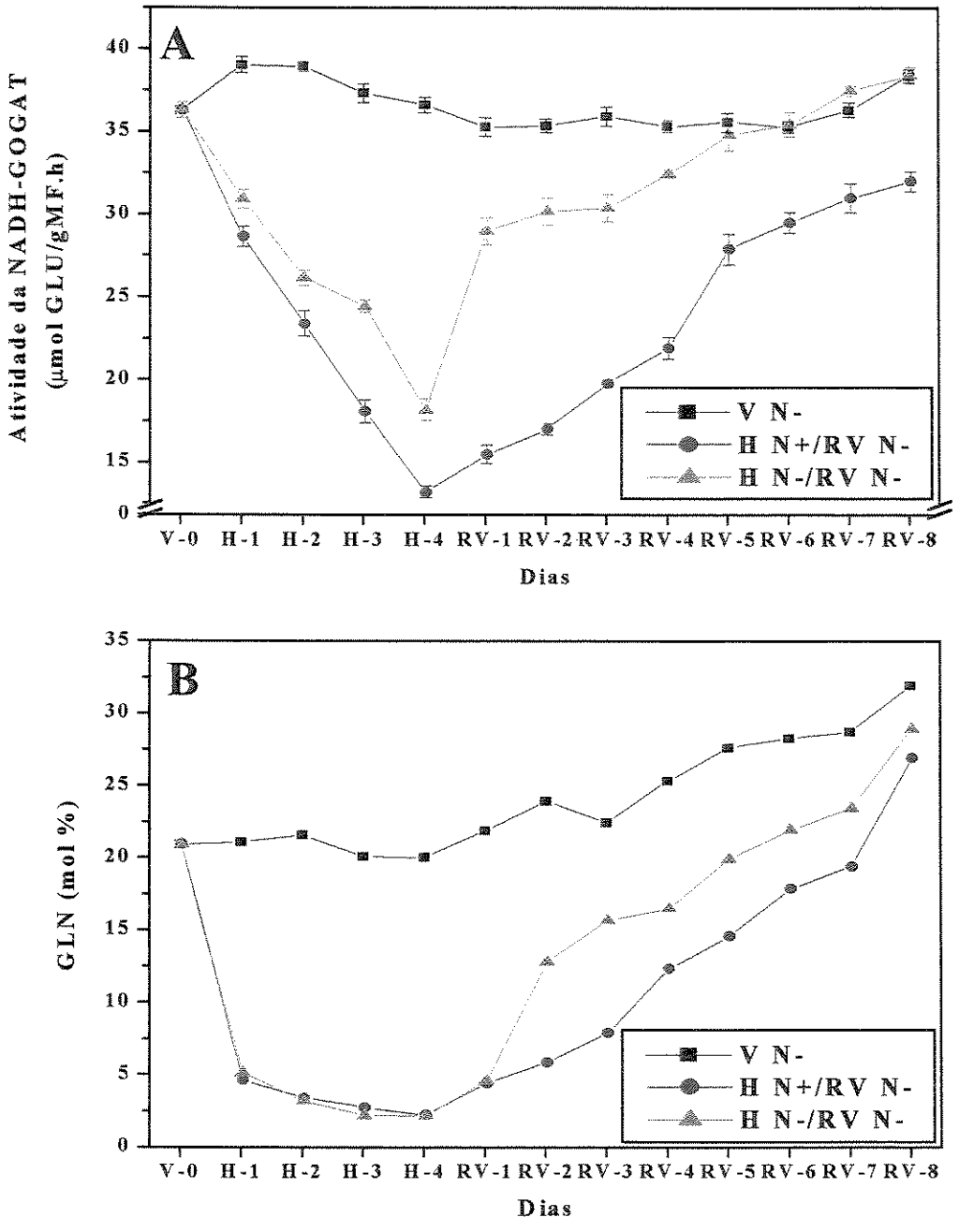


Figura 4. Atividade da glutamato sintase (NADH-GOGAT) em nódulos (A) e concentração de glutamina (mol %) na seiva do xilema (B) de plantas de soja cv. IAC-17 cultivadas em vermiculita sem N (V N-) e transferidas para hidroponia (H) em soluções contendo NO_3^-, 15 mM (N+) e sem N (N-), com posterior replantio em vermiculita fertilizada com solução sem N (RV N-). Barras = E.P. (n=4)

Trepp *et al.* (1999) detectaram o acúmulo de transcritos de NADH-GOGAT, durante o desenvolvimento de nódulos de alfafa, em células de nódulos efetivos e não efetivos em fixar o N_2.. Observaram que a enzima é codificada por um único gene e que os transcritos se acumulam principalmente na região infectada das células da região fixadora de N_2, mas não requerem fixação ativa de N_2 para sua expressão inicial.

A atividade da GS nos nódulos mostrou valores bem superiores de atividade aos encontrados para a NADH-GOGAT, cerca de vinte vezes mais, e respondeu diferenciadamente nos tempos analisados, um e quatro dias de exposição aos tratamentos (figura 5).

Chen & Cullimore (1989) observaram que a atividade da GS foi duas vezes superior à atividade da NADH-GOGAT na região central de nódulos de feijão fixando ativamente o N_2. Ao analisarem a proporção de atividade dessas duas enzimas durante a nodulação, sugeriram que as mesmas podem ser coordenadamente reguladas de acordo com o requerimento de produção de GLN. Sugeriram também que a atividade da NADH-GOGAT é o passo limitante da velocidade da assimilação de amônio, pelo menos em relação à atividade da GS, cuja função em nódulos seria de suportar a atividade dessa enzima.

A atividade da GS nos nódulos, tanto sob a presença de NO_3^- (15 mM) como na ausência de N, não foi influenciada com 24 horas de tratamento. Portanto, a redução do teor de GLN no xilema com 24 horas de exposição aos tratamentos, não pode ser atribuída a uma resposta direta da atividade da GS. Embora a GS apresente atividade dependente do teor de NH_4^+ proveniente da fixação de N_2, é possível que um dia de tratamento não tenha influenciado a quantidade da enzima ou mesmo sua regulação. Por outro lado, mesmo considerando a hipótese de que a diminuição do teor de ASN nos nódulos estaria relacionada à sua degradação pela asparaginase (Ireland & Joy, 1990), liberando ASP e NH_4^+, a quantidade

de substrato liberado não foi suficiente para o aumento da atividade da GS (figura 5).

De maneira geral é atribuída à GS uma importância central no metabolismo do nódulo, por constituir o sítio primário de assimilação de NH_4^+ liberado pelos bacteróides (Cullimore & Bennet, 1988). Por outro lado, foi demonstrado que os transcritos de GS, AAT e PEPC acumulam-se prontamente em nódulos inefetivos, enquanto que o acúmulo de transcritos de GOGAT permanece ao nível daqueles encontrados em raízes (Gregerson *et al.*, 1993; Vance *et al.*, 1994), mostrando que a fixação ativa do N_2 é requerida para a máxima expressão da GOGAT (Temple *et al.*, 1998). De forma que nódulos inefetivos têm não somente um número reduzido de células que expressam a NADH-GOGAT, mas também uma menor quantidade de transcritos (Trepp *et al.*, 1999).

Com o aumento do tempo de exposição aos tratamentos para quatro dias, a atividade da GS em nódulos apresentou uma redução significativa, não ocorrendo diferença de resposta com relação ao íon NO_3^-, apesar de valores um pouco mais baixos terem sido observados nesse caso (figura 5).

A diminuição da atividade da GS e NADH-GOGAT nos nódulos do tratamento sem N, podem coletivamente, justificar os baixos teores de ASN transportados no xilema, visto que sob deficiência de N, a síntese de GLN e GLU, precursores desse aminoácido, encontrava-se diminuída (figuras 4, 5 e 6 e tabela 8).

A redução da atividade da GS e da NADH-GOGAT nos nódulos pode estar em parte relacionada com os baixos teores de GLN transportados via xilema, visto que a síntese desse aminoácido em plantas noduladas depende fundamentalmente da quantidade de NH_4^+ fixada simbioticamente, e nesse caso, a fixação de N_2 foi mínima, demonstrada pelo baixo teor de ureídeos nos tratamentos com hidroponia, mesmo com um dia de exposição (figuras 1, 4 e 5). Nesse caso, poderia haver um "efeito cascata": a redução da fixação limitaria a GS, que por

conseqüência limitaria a NADH-GOGAT, devido à diminuição de GLN. Por outro lado, a possibilidade da queda de atividade da GS nos nódulos ser resultado da ação de radicais livres gerados nos nódulos, como resultado dos tratamentos impostos, sobretudo na presença de NO_3^-, não pode ser descartada.

Foi sugerido que atividade da GS pode ser regulada pela disponibilidade de seu substrato, influenciando o "turnover" da proteína (Temple *et al.*, 1996; Ortega *et al.*, 1999; Suganuma *et al.*, 1999) e também pela estabilidade do seu RNA mensageiro (Temple *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 2001). Nódulos inefetivos de soja apresentaram níveis significativamente reduzidos de atividade de GS e de polipeptídeos GS_1 (forma citossólica), o que foi atribuído ao "turnover" da holoproteína na ausência do substrato, resultante da fixação deficiente de N_2 (Temple *et al.*, 1996). Da mesma forma, em ervilha, foram registrados níveis baixos de polipeptídeos e de atividade de GS em nódulos inefetivos sem alteração significativa do nível de mRNA de GS, em comparação a nódulos efetivos. Após aplicação exógena de NH_4^+ ocorreu um aumento da atividade da GS e de seus polipeptídeos em nódulos inefetivos mas pouco aumentou o nível de mRNA (Suganuma *et al.*, 1999).

Ortega *et al.* (1996) sugeriram que a GS está sempre presente nas plantas, com a finalidade de metabolizar qualquer amônia que possa ser produzida, evitando que essa se acumule em níveis tóxicos. No entanto, o processo de "turnover" da GS é contínuo: quando o substrato é limitante, o "turnover" da enzima é iniciado. Quando o substrato está disponível, a enzima é estabilizada, evitando sua degradação. A queda da GS nos nódulos pode, por esse ponto de vista, ter estado relacionada com um maior "turnover" da enzima, uma vez que a fixação do N_2 esteve deficiente, proporcionando pouco NH_4^+ para estabilização da molécula de GS.

Ortega *et al.* (2001), observando a superexpressão do gene que codifica a GS_1,

introduzido em alfafa, propuseram um modelo mais amplo de regulação da GS, por meio de múltiplas etapas. A primeira seria ao nível de transcrição, a qual não está esclarecida. A segunda etapa está relacionada à estabilidade do transcrito, a qual pode ser controlada pela razão GLN/GLU, razão ATP/ADP ou balanço redox. Na presença de N em excesso, os esqueletos carbônicos e ATP se tornam limitados, que por sua vez, têm um controle de "feedback" negativo sobre o transcrito de GS. O terceiro nível de regulação se refere à estabilidade da enzima e envolveria a inativação da GS por radicais de oxigênio gerados por reações de óxido-redução, particularmente sob condições de excesso de esqueletos carbônicos ou limitação de substratos nitrogenados.

Alcantar-Gonzales *et al.* (1990) estudando o efeito do NO_3^- sobre a atividade da GS, redução do acetileno (ARA) e redutase do NO_3^- do bacteróide e da planta, em nódulos de soja cultivadas sob baixa concentração de NO_3^- (20 μM), inoculadas com duas estirpes diferentes e transferidas para hidroponia durante quatro dias na presença de NO_3^- 5 mM, em contato apenas com o sistema radicular (nódulos na camada superior, fora da solução), obtiveram resultados diferentes dos obtidos nesse experimento. Em uma das associações observou-se uma elevação da GS nos nódulos, como resultado do aumento da assimilação do NO_3^- pela redutase do NO_3^- do tecido. Esse aumento processou-se após assimilação do NO_3^- pela redutase do NO_3^- do bacteróide e conseqüente queda do ARA. Em outra associação, com estirpe diferente, esses efeitos não foram evidenciados. Portanto, o sistema simbiótico parece também influenciar nas respostas da assimilação primária do N frente ao estresse. Por outro lado, Becana *et al.* (1984) observaram que a aplicação de NO_3^- (0 a 200 mM) em plantas noduladas de alfafa durante uma semana, causou um decréscimo da atividade da NADH-GOGAT nos nódulos, em paralelo com a queda da nitrogenase, com o aumento das doses. Em contraste, a atividade da GS diminuiu com concentrações de NO_3^- entre 0 e 20 mM, o

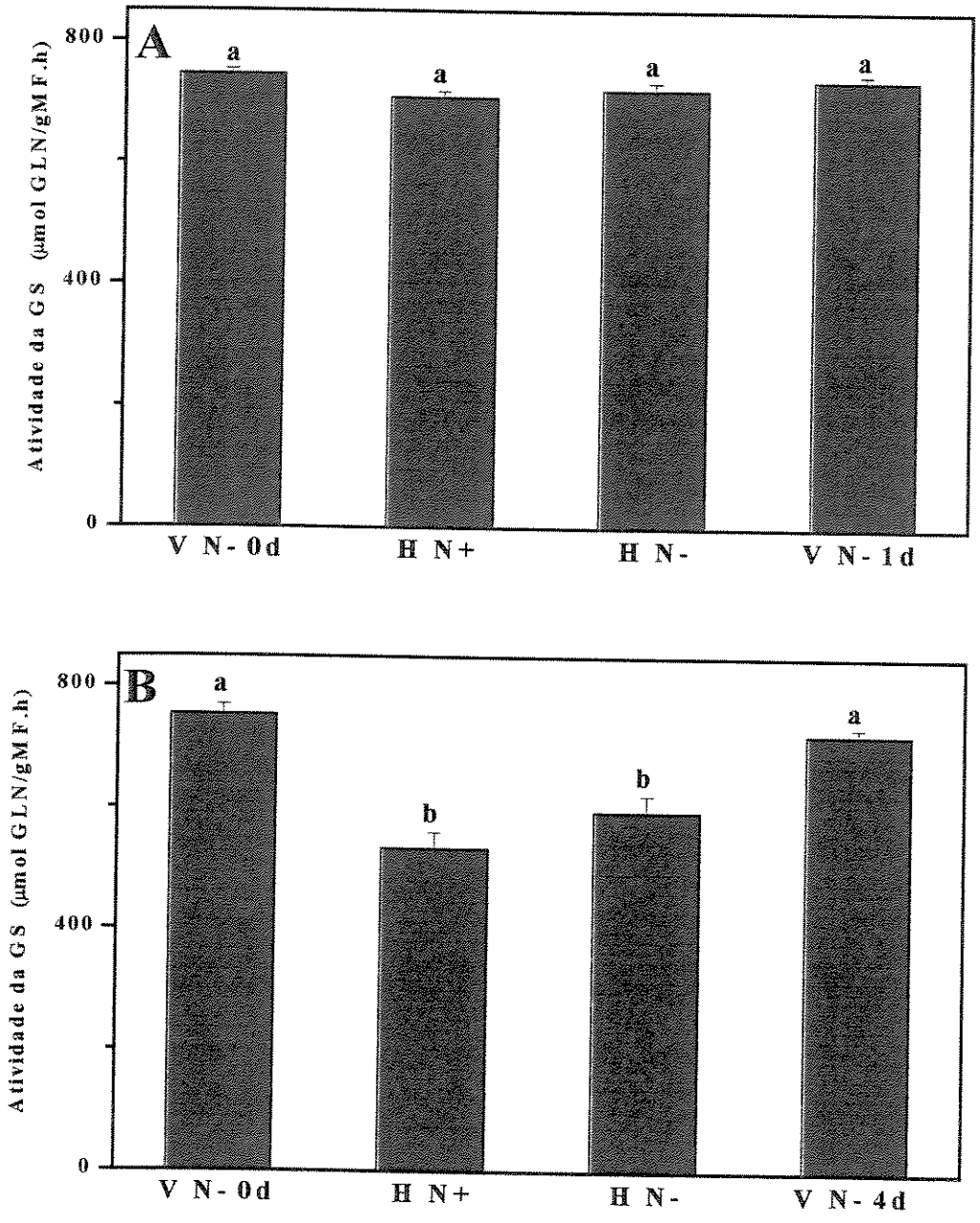


Figura 5. Atividade da glutamina sintetase (GS) em nódulos de soja cv. IAC-17, cultivada em vermiculita sem N (V N-) e transferida para hidroponia em estádio R2, na presença de NO_3^- 15 mM (H N+) e ausência de N (H N-), durante um dia (A) e quatro dias (B) de exposição aos tratamentos . Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. Barras = E.P. (n=4).

que foi condizente com o decréscimo do NH_4^+ formado pela nitrogenase, mas concentrações acima de 20 mM estimularam grandemente as atividades da GS e da glutamato desidrogenase (NADH-GDH), o que foi atribuído a uma senescência rápida induzida nos nódulos, produção de NH_4^+ via redução de NO_3^- e desaminação de aminoácidos.

O processo de redução de NO_3^- dentro do nódulo, ocorrendo no citossol da célula vegetal e/ou no bacteróide pode gerar competição por energia com o processo de fixação de N_2 dentro do nódulo, limitando carboidratos para o funcionamento do bacteróide e em conseqüência inibir a fixação de N_2. A incorporação de NH_4^+ no esqueleto carbônico, catalisada pelo par GS/GOGAT dentro do nódulo, consome um oxaloacetato, um NADPH e um ATP. O consumo de substratos de C e de poder redutor no metabolismo de NO_3^- pode, portanto, competir com o suprimento de energia para os bacteróides (Drevon *et al.*, 1988a).

Atkins *et al.* (1984a) ao provocar a interrrupção da síntese de NH_4^+ em nódulos intactos de feijão-de-corda e tremoço, por tempo superior a três dias, por exposição a atmosferas de $Ar:O_2$ (80:20; v/v) observaram uma redução severa da síntese e exportação dos principais solutos nitrogenados produzidos pelas duas simbioses (ureídeos em feijão-de-corda e amidas em tremoço). A GS e nitrogenase (ARA) não sofreram grandes reduções em suas atividades, porém as atividades das enzimas que utilizam GLN, como NADH-GOGAT em ambas as espécies, ASN sintetase em tremoço e síntese *de novo* de purinas, em feijão-de-corda, diminuiram drasticamente, o que reforça os resultados obtidos com GS e GOGAT em nosso trabalho.

As atividades da GS e da NADH-GOGAT em raízes do controle foram muito inferiores às encontradas em nódulos, 100 vezes e entre 10 e 12 vezes menores, para a GS e NADH-GOGAT, respectivamente. A atividade da GS em relação à NADH-GOGAT em raízes foi de aproximadamente duas vezes. Apesar de grandes, as diferenças de atividades dessas

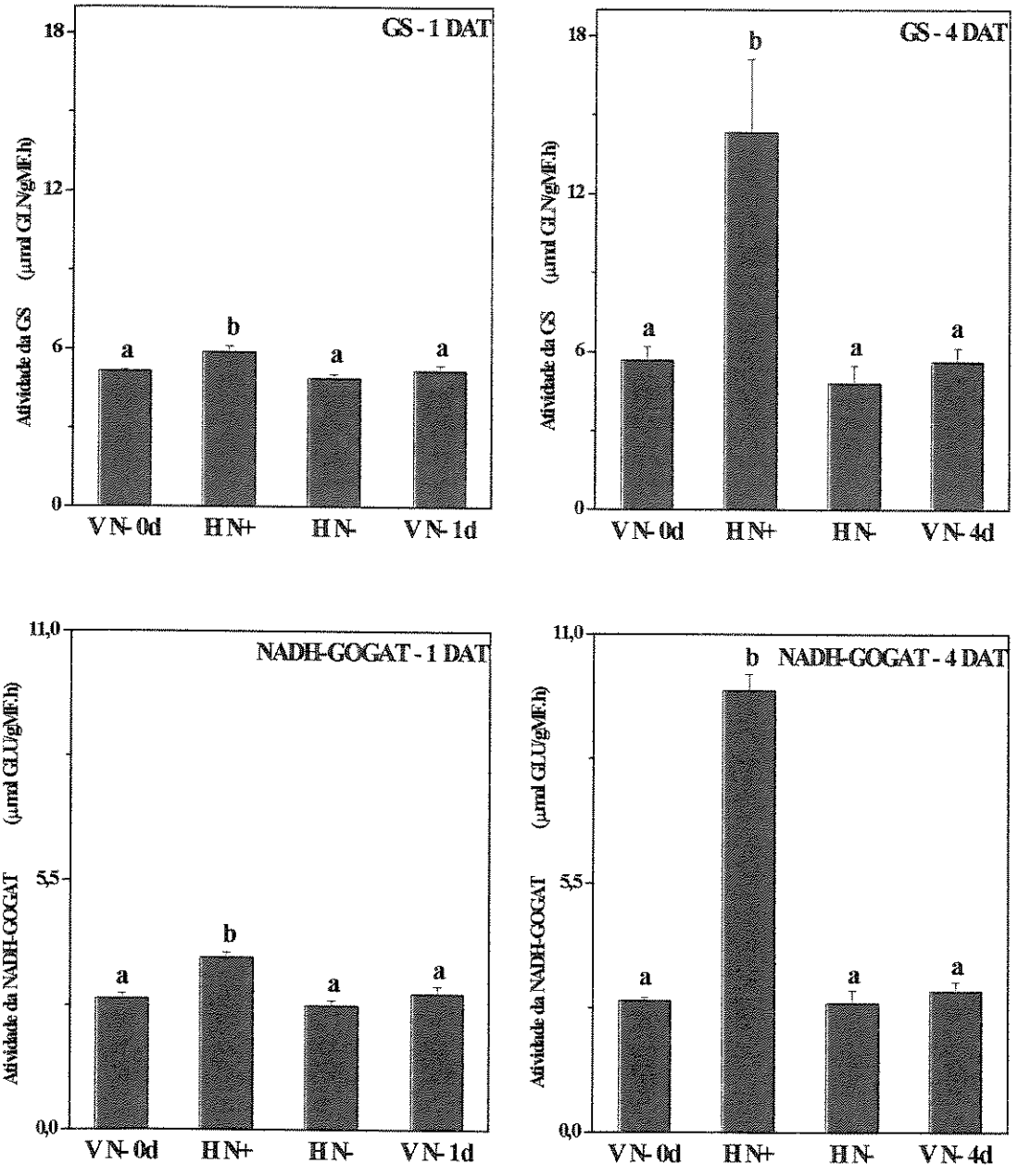


Figura 6. Atividade da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (NADH-GOGAT) em raízes de soja de soja cv. IAC-17, cultivada em vermiculita sem N (V N-) e transferida para hidroponia em estádio R2, na presença de NO_3^- 15 mM (N+) e ausência de N (N-), durante um e quatro dias de exposição aos tratamentos (DAT). Letras minúsculas diferentes significam diferenças estatísticas entre os tratamentos, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. Barras = E.P. (n=4).

enzimas em raízes e nódulos, devem ser reflexo da função fisiológica de cada órgão na assimilação do N_2 fixado (figuras 4, 5 e 6).

Em alfafa (Egli *et al.*, 1989) e em feijão (Chen & Cullimore, 1988; 1989) a atividade da NADH-GOGAT é baixa ou não detectável em raízes e tem um grande aumento durante o desenvolvimento de nódulos efetivos. Em feijão os valores de atividade foram 27 vezes menores nas raízes do que em nódulos e a atividade foi atribuída a uma única forma da enzima - NADH-GOGAT I - diferente do observado em nódulos que possui duas isoformas - NADH-GOGAT I e II. A maior parte da atividade da GOGAT em nódulos foi atribuída à segunda isoforma da enzima.

De forma inversa ao observado em nódulos, a transferência das plantas para hidroponia com NO_3^-, causou um aumento significativo das atividades de GS e NADH-GOGAT em raízes, não havendo influência do tratamento sem N. Ao ter sido aumentado o tempo de tratamentos para quatro dias, ocorreu uma intensificação desse efeito (figura 6). Os valores de atividade foram superiores a duas e três vezes o controle, para GS e NADH-GOGAT, respectivamente, o que suporta os aumentos de ASN observados nas raízes e na seiva do xilema, nesses tratamentos (tabelas 8 e 10). Na ausência de N não ocorreu nenhuma mudança expressiva de atividade de ambas enzimas com o aumento do tempo de tratamento (figura 6). Portanto o aumento em ASN no xilema pode ser atribuído à assimilação do NO_3^- nas raízes.

Ortega *et al.* (1999) registraram um aumento de três vezes na atividade da GS e nível de polipeptídeos da enzima em raízes de plantas tratadas com NH_4NO_3, durante quatro dias. No entanto, não foi observado um aumento significativo correspondente no nível de transcritos de GS com esse tratamento, sugerindo-se no entanto, um controle traducional ou pós-traducional dos níveis de GS. Atribuiu-se a maior atividade da GS à estabilidade da

holoenzima, pelo substrato GLU, cuja formação foi induzida pela assimilação do N-combinado, impedindo-a portanto, de sofrer modificação oxidativa, primeiro passo do "turnover" da molécula. Aqueles pesquisadores sugeriram que na presença do substrato, o sítio ativo da enzima é menos acessível à modificação oxidativa ou a produção de radicais de oxigênio é aumentada sob condições de baixa disponibilidade de N.

4.4. Inundação de soja nodulada: efeito de diferentes tempos de inundação e supressão dos tratamentos sobre a recuperação da composição nitrogenada transportada no xilema

Uma vez caracterizados a composição nitrogenada da seiva do xilema de soja nodulada e os efeitos ocorridos sob o tratamento de hidroponia com aeração, onde os teores de O_2 não atingiram valores hipóxicos, para os processos respiratórios das raízes, buscou-se com esse experimento, a influência da inundação sem aeração em diferentes tempos, sobre o transporte de N na seiva do xilema. Associados aos tratamentos de inundação, foram avaliados os tempos de recuperação aos tratamentos empregados. Os resultados estão apresentados na tabela 11.

Os URE e a GLN sofreram reduções a níveis mínimos e equivalentes, independentemente do tempo de inundação do sistema radicular: 5 horas, 1 e 4 dias. Houve uma redução do ASP, ao contrário do que foi observado com a transferência das plantas para hidroponia, em todos os tempos de alagamento e um decréscimo em ASN que se acentuou com o tempo de tratamento. As proporções de ALA, de GABA e de SER aumentaram com os tratamentos, sendo que ALA e SER diminuiram um pouco no quarto dia de inundação, provavelmente como início de uma resposta adaptativa da planta ao estresse (tabela 11).

Com a supressão dos tratamentos, ocorreu uma elevação dos níveis de URE, de GLN e de ASN com o aumento do tempo de recuperação. A elevação da GLN mostrou um

Tabela 11. Composição aminoacídica (mol %) e ureídeos totais (URE) da seiva de xilema de plantas noduladas de soja cv. IAC-17 (C), em estádio R2, submetidas a diferentes tempos de inundação do sistema radicular (I) em combinação com diferentes tempos de supressão dos tratamentos (R)

	Controle (sem inundação)												
	5 h	**1 d**	**2 d**	**4 d**	**1d**	**1 d**	**2 d**	**4 d**	**4 d**	**1 d**	**2 d**	**4 d**	**10 d**
ASP	**16,04**	**10,55**	**19,72**	**22,7**	**20,5**	**23,11**	**14,40**	**17,75**	**20,05**	**18,93**	**18,93**	**14,75**	**12,03**
GLU	0,57	0,94	0,25	0,52	0,62	0,67	1,04	0,54	0,63	0,88	0,83	1,04	0,40
ASN	**34,15**	**42,99**	**44,63**	**36,29**	**34,35**	**38,86**	**52,00**	**47,68**	**36,78**	**38,95**	**44,15**	**50,9**	**53,00**
SER	2,38	1,22	0,92	1,33	1,29	1,35	1,52	1,55	1,80	1,12	1,13	0,92	0,85
GLN	**20,24**	**22,64**	**18,97**	**18,58**	**19,06**	**19,00**	**19,00**	**19,25**	**18,85**	**18,60**	**20,05**	**19,85**	**23,55**
ALA	0,36	0,43	0,17	0,33	0,27	0,32	0,55	0,31	0,34	0,32	0,41	0,55	0,38
GABA	2,42	2,87	2,77	1,07	1,84	1,77	3,04	2,1	2,51	2,02	1,85	3,04	0,91
Outros	23,84	18,36	12,57	19,18	22,07	14,92	8,45	10,82	19,04	19,18	12,65	8,95	8,88
	Tratamento Inundação (I)/Recuperação (R)												
	5 h - I	**1 d - R**	**2 d - R**	**4 d - R**	**1d - I**	**1 d - R**	**2 d - R**	**4 d - R**	**4 d - I**	**1 d - R**	**2 d - R**	**4 d - R**	**10 d- R**
ASP	**14,41**	**39,20**	**26,27**	**15,31**	**9,70**	**44,34**	**27,94**	**23,61**	**11,47**	**27,99**	**42,85**	**22,33**	**11,33**
GLU	2,54	0,66	0,91	0,45	2,21	0,45	0,33	4,37	3,71	3,02	1,25	1,10	0,65
ASN	**29,79**	**21,62**	**32,54**	**38,45**	**16,66**	**13,00**	**25,37**	**33,65**	**9,87**	**13,33**	**15,76**	**21,90**	**45,00**
SER	4,28	0,92	1,00	0,81	10,14	1,62	1,46	2,63	6,63	2,94	3,21	2,33	0,99
GLN	**1,88**	**8,41**	**14,86**	**20,45**	**1,81**	**7,35**	**15,60**	**19,60**	**1,63**	**6,87**	**13,17**	**18,99**	**24,15**
ALA	4,29	0,17	0,29	0,23	22,04	0,25	0,13	0,28	12,64	3,68	1,56	0,65	0,18
GABA	6,28	2,67	2,69	2,80	11,21	8,26	3,48	4,09	9,36	11,83	7,73	4,02	1,03
Outros	36,53	26,35	21,44	21,5	26,23	24,73	25,69	11,77	44,69	30,34	14,47	28,68	16,67

URE - C (µmol/mL)	8,23 a*	8,5 a	7,88 a	8,23 a	7,95 a	7,85 a	7,75 a	9,00 a	8,58 a	8,45 a	8,86 a	9,25 a	9,43 a
URE - I (µmol/mL)	0,64 b	7,26 a	7,43 a	7,82 a	0,54 b	6,31 a	6,45 a	8,85 a	0,43 b	5,05 b	5,45 b	9,08 a	9,52 a

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

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade

acréscimo semelhante durante os períodos de recuperação, de forma independente dos tempos de inundação utilizados. O incremento da proporção de GLN transportada no xilema acompanhou a elevação de ASN durante a recuperação do alagamento de menor tempo (5 horas). Com o aumento do tempo de inundação, os níveis de recuperação de ASN acompanharam mais lentamente a elevação de GLN, sendo que para o tratamento com quatro dias de inundação não ocorreu a recuperação dos níveis de ASN. No entanto foi observado aos 10 dias de recuperação, uma composição aminoacídica bastante próxima ao controle. O ASP apresentou um aumento abrupto quando o tratamento com inundação foi suprimido, efeito comum a todos os tempos de inundação. Com o aumento dos tempos de recuperação, ocorreu um decréscimo da proporção desse aminoácido transportado no xilema (tabela 11).

Os resultados obtidos com tratamentos de inundação do sistema radicular de diferentes espécies de leguminosas (Minchin *et al.*, 1978; Pugh, *et al.*, 1995; Puiatti & Sodek, 1999) sobre a inibição da fixação simbiótica do N_2 e recuperação após supressão dos tratamentos, parecem demonstrar que a intensidade de inibição e de recuperação são dependentes do tempo de tratamento e da espécie, envolvendo diferentes respostas adaptativas.

Os níveis de ALA diminuiram bruscamente já no primeiro dia de recuperação, atingindo níveis iguais ao do controle para 5 e 24 h de inundação. Nas plantas submetidas a quatro dias de inundação, esse decréscimo se processou de forma menos rápida.

Com relação ao GABA, ocorreu uma redução imediata de seus níveis no xilema já no primeiro dia de recuperação para 5 horas de inundação. Nos tempos superiores de inundação foram observados níveis equivalentes aos do controle apenas aos quatro dias de recuperação. Os níveis de SER reduziram bruscamente logo no primeiro dia de recuperação para 5 e 24 horas de inundação. Para quatro dias de alagamento, essa redução foi mais lenta (tabela 11).

Os decréscimos rápidos de GLN conjuntamente com URE, mais uma vez sugerem ser essa amida uma indicadora confiável da fixação de N_2, assim como URE. A recuperação de ambos com o retorno das condições originais, de forma mais rápida que os demais aminoácidos, reforça a hipótese de ambos compostos serem sinalizadores do aumento da fixação de N_2, embora nesse caso, os teores de URE aparentemente tenham apresentado uma elevação um pouco mais rápida que GLN.

Os aumentos de ALA e de GABA foram relativamente rápidos com a inundação do sistema radicular, sugerindo que uma condição de hipoxia foi rapidamente atingida após o alagamento do sistema radicular e intensificada com o tempo de tratamento.

Uma vez que o alagamento causa uma grande diminuição da disponibilidade de O_2 ao sistema radicular, visto que a difusão do O_2 é cem vezes mais lenta na água do que no ar (Thomson & Geenway, 1991), é provável que uma condição de hipoxia tenha atingido rapidamente não apenas os nódulos, mas também as raízes, devido ao fato de não existir aeração e portanto, disponibilidade adequada de O_2 às raízes.

Guash *et al.* (2001) verificando o efeito de diferentes concentrações de O_2 sobre a atividade da nitrogenase em nódulos de tremoço, atribuiram a concentração interna de O_2 no nódulo como sendo o fator limitante à fixação de N_2 e que os nódulos podem manter sua atividade se as condições hipóxicas não forem muito prolongadas. Após três dias sob O_2 a 1 % as plantas recuperaram somente 30 % da atividade da nitrogenase das plantas controles, apesar do conteúdo dos dois componentes da nitrogenase ser equivalente. Com dez dias de tratamento os efeitos foram irreversíveis. Por outro lado, os resultados desse experimento sugerem uma recuperação total da atividade da nitrogenase, mesmo nas plantas submetidas a quatro dias de inundação.

Serraj *et al.* (1998) observaram um grande aumento de GABA transportado no

xilema de plantas de soja submetidas a estresse por déficit hídrico e hipóxia, em relação aos demais aminoácidos. Essas mudanças não estiveram associadas a mudanças da atividade da glutamato descarboxilase (GAD) no citossol de células do nódulo ou bacteróides. Os dados não permitiram associar o decréscimo da permeabilidade ao O_2 e uma conseqüente privação de O_2 para o interior dos nódulos que pudesse estimular a atividade da GAD *in vitro*, ao acúmulo de GABA. No entanto, os autores sugeriram um possível efeito do estresse por hipoxia ou seca sobre a atividade *in vivo* da GAD.

Puiatti & Sodek (1999) observaram que a transferência de soja nodulada para cultivo hidropônico sem aeração, ou inundação de plantas cultivadas em vermiculita, conduziram a um aumento, no xilema, da proporção de ALA e, em menor extensão de SER, às expensas de ASN. O ASP foi sugerido como a fonte de N para a formação de ALA. Esses efeitos se mostraram reversíveis quando as plantas voltaram às condições iniciais, de forma que as concentrações desses aminoácidos estiveram associados com o estresse por O_2. O aumento de ALA no xilema, nessas condições, mostrou ser resultado de alterações metabólicas do sistema radicular, sobretudo nas raízes e em menor escala nos nódulos. Reggiani *et al.* (1988) também sugeriram ASP e amidas como fontes de N para o acúmulo de ALA e GABA em raízes de arroz sob anoxia. Nesse caso, haveria uma interconversão, com a conseqüente liberação de NH_4^+, que pode ser reassimilado pelo sistema GS/GOGAT (Vanlerberghe *et al.*, 1990; Reggiani *et al.*, 2000) e GLU desidrogenase, ativada sob hipoxia (Fan *et al.*, 1997). Como nesse experimento a fonte de assimilação de N nas plantas foi oriunda exclusivamente da fixação simbiótica, e a atividade da nitrogenase estava limitada, o decréscimo do transporte de ASN no xilema esteve relacionado à diminuição de sua síntese, aliado à sua utilização como fonte de N e C para as novas condições impostas.

A diminuição de ASP, conjuntamente com os acréscimos de ALA e GABA pode

indicar a sua participação indireta na síntese desses aminoácidos, através de GLU (Streeter & Thompson, 1972 a,b; Roberts *et al.*, 1992), uma vez que, pelo menos em raízes de soja (Souza, 2001), à semelhança de cevada (Good & Crosby, 1989), a enzima alanina aminotransferase não aceitou ASP como doador do grupo NH_2. Não se pode descartar, no entanto, a contribuição do nódulo à proporção de ALA transportada no xilema e nesse caso, a possibilidade de um metabolismo diferenciado com relação a esse aminoácido.

As principais interconversões entre os aminoácidos livres em raízes deficientes em O_2, foram esclarecidas por meio de estudos metabólicos e enzimáticos, e atribuídas a um ajuste do metabolismo para regular o pH celular (Fan *et al.*, 1988; Reggiani *et al.*, 1988; Crawford *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998). Dessa forma, a ALA e o GABA são derivados de GLU, sendo o GABA por α-descarboxilação e a ALA por transaminação com o PYR, numa reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase (Good & Crosby, 1989).

4.5. Efeito do alagamento do sistema radicular de plantas de soja nodulada na presença e ausência de aeração sob o transporte de glutamina e de ureídeos

Conforme foi observado nos experimentos anteriores envolvendo transferência das plantas de soja para hidroponia em combinação com a excisão de nódulos (itens 3.2 e 3.3) e experimentos envolvendo inundação de soja (item 3.4), ocorreu uma queda consideravelmente rápida de ureídeos e de GLN em relação à ASN. Buscou-se, com base nessa observação, uma investigação mais detalhada sobre os efeitos de curtos períodos de estresse na assimilação de soja fixando plenamente o N_2, de forma a se averiguar uma possível relação entre os ureídeos, considerados produtos específicos da fixação de N_2 e os teores de GLN, segundo aminoácido em maior proporção no xilema de soja e de grande parte de leguminosas transportadoras de

ureídeos.

Os resultados do experimento em que se procedeu à transferência das plantas noduladas, cultivadas em vermiculita sem N, para solução em hidroponia sem N como forma de simular o efeito do alagamento sem indução de hipoxia, estão apresentados na figura 7 e tabela 12. Ocorreu uma queda rápida da proporção de GLN (mol %) no xilema, logo nas primeiras horas após a transferência das plantas. Após 8 horas, esses valores foram inferiores a 50 % do controle, chegando a cerca de 80 % de inibição com 18 h de tratamento. Após esse período, as reduções continuaram, porém de forma menos intensa. Os decréscimos em GLN acompanharam a queda de ureídeos, sugerindo que a GLN assim como os ureídeos, é produto específico da fixação simbiótica de N_2, de forma que seus níveis refletem a atividade metabólica do nódulo. Essa consideração pode ser salientada pelo fato de que alterações substanciais no teor de ASN - principal amida transportada no xilema em soja – iniciaram-se apenas com 18 horas de transferência, momento em que os níveis de GLN e ureídeos estavam muito baixos. É possível que seja necessário o consumo quase que completo de ureídeos e de GLN para que se processe o esgotamento de forma substancial do "pool" de ASN, já que a síntese desse aminoácido depende de GLN (Fujihara & Yamaguchi, 1980). A ASN é produzida pela enzima asparagina sintetase (AS; EC 6.3.5.4), que transfere o grupo amida da GLN para o ASP, com hidrólise simultânea de ATP em AMP e PPi (Lea & Ireland, 1999).

A GLN, apesar de estar sempre presente em exsudatos de xilema de plantas noduladas, não é o principal produto da fixação de N_2 exportado dos nódulos, e sim os derivados de seu metabolismo, ASN e ureídeos, alantoína e ácido alantóico (Atkins, 1987). No entanto, níveis relativamente altos desse aminoácido caracterizam plantas de soja fixando o N_2 plenamente (Puiatti & Sodek, 1999; confirmado pelos resultados deste trabalho). Plantas de feijão-de-corda cujos nódulos foram tratados com alopurinol, inibidor da síntese de ureídeos,

mostraram um grande decréscimo de URE e de GLN transportados no xilema. O teor dos demais aminoácidos não foi influenciado. A atividade da nitrogenase diminuiu concomitantemente, mostrando no entanto, recuperação em tratamentos com elevação da concentração de O_2 (Atkins *et al.*, 1988a).

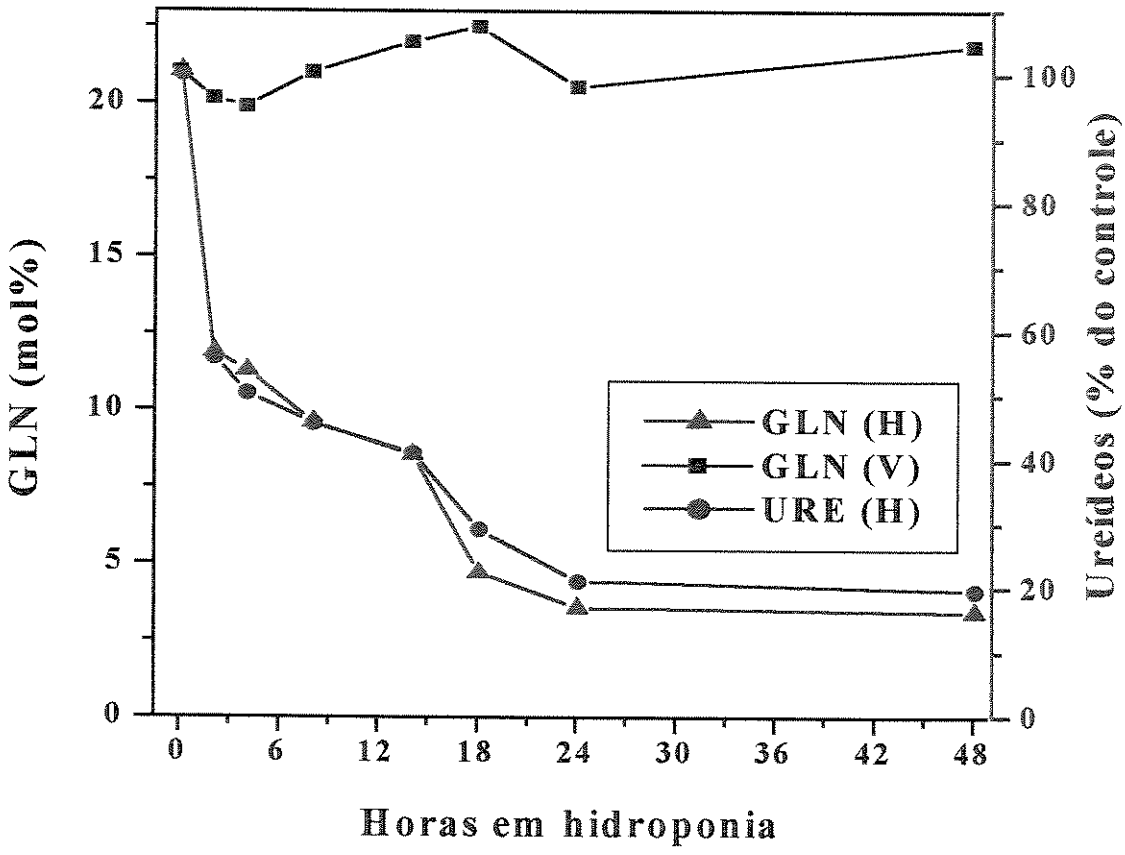


Figura 7. Efeito da transferência de plantas noduladas de soja cv. IAC-17 para sistema hidropônico (H) sobre a glutamina (GLN) (mol%) e ureídeos totais (URE) (% do controle) transportados na seiva do xilema. As plantas foram cultivadas em vermiculita (V) na ausência de N e transferidas em estádio R2 para hidroponia sem N.

Tabela 12. Composição de aminoácidos (mol%) em seiva de xilema de plantas noduladas de soja cultivar IAC-17, em estádio R2, cultivadas em vermiculita sem N e transferidas para sistema hidropônico com solução Hoagland sem nitrogênio

	Vermiculita (Controle)							
	0 h	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**14 h**	**18 h**	**24 h**	**48 h**
ASP	**5,94**	**5,29**	**6,99**	**5,60**	**5,47**	**5,30**	**5,18**	**5,92**
GLU	0,58	0,82	0,92	0,79	0,80	0,78	1,04	0,47
ASN	**54,77**	**52,65**	**51,86**	**53,00**	**54,27**	**53,15**	**55,43**	**50,21**
SER	3,52	2,28	1,94	2,03	2,21	1,78	2,11	2,05
GLN	**21**	**20,15**	**19,88**	**21,00**	**22,00**	**22,50**	**20,52**	**21,86**
ALA	0,30	0,38	0,47	0,38	0,40	0,38	0,64	0,30
GABA	0,99	1,34	1,47	1,40	1,35	1,22	1,74	1,33
Outros	12,9	17,09	16,47	15,8	13,5	14,89	13,34	17,86

	Vermiculita → Hidroponia						
	2 h	**4 h**	**8 h**	**14 h**	**18 h**	**24 h**	**48 h**
ASP	**8,26**	**9,75**	**10,57**	**13,22**	**35,16**	**55,03**	**59,72**
GLU	1,91	2,02	2,07	2,89	3,44	3,43	4,23
ASN	**58,75**	**60,56**	**64,43**	**59,74**	**39,42**	**24,96**	**17,91**
SER	3,27	3,22	3,02	2,80	2,79	1,28	1,54
GLN	**11,85**	**11,25**	**9,58**	**8,54**	**4,68**	**3,54**	**3,40**
ALA	1,43	1,31	1,51	1,27	1,60	0,60	0,75
GABA	2,60	2,09	1,61	1,17	1,47	1,00	1,79
Outros	11,93	9,8	7,21	10,37	11,44	10,16	10,66

Os níveis de saturação de O_2 presentes na solução hidropônica apresentaram valores médios de 84 %, suficientes para suprir a demanda de O_2 pelo sistema radicular. No entanto, a queda de fixação de N_2, demonstra que a aeração não foi suficiente para impedir a inibição da nitrogenase. Isso possivelmente ocorreu em vista da difusão diminuída do O_2 em meio aquoso, que associada à presença da barreira de difusão ao O_2 presente nos nódulos, deve ter agravado a disponibilidade de O_2 ao bacteróide.

Após detectada em outro experimento, a queda relativamente rápida de GLN e de URE, em sistema hidropônico, o fenômeno foi verificado numa condição de alagamento sem aeração em tempos bastante curtos (minutos). Levando-se em consideração a hipótese de que

nas primeiras horas de tratamento haveria disponibilidade de O_2 num nível que não caracterizava situação de hipoxia, a falta de aeração poderia dificultar ainda mais a difusão do O_2 presente na solução para o interior dos nódulos, em relação à hidroponia. A ausência de manipulação das plantas nesse sistema, existente no processo de transferência das plantas para hidroponia, isentaria a dúvida de ser esse procedimento um fator de interferência nos dados observados no experimento anterior.

Os resultados referentes aos teores de GLN e de ureídeos e da composição aminoacídica da seiva do xilema de plantas de soja nodulada submetidas à inundação estão representados na figura 8 e tabela 13, respectivamente.

A queda na proporção de GLN e no teor de ureídeos totais transportados na seiva do xilema foram iniciadas poucos minutos após a aplicação da inundação, sugerindo uma interferência imediata do tratamento sobre a fixação do N_2.

Dez minutos após o início da inundação, a GLN sofreu uma redução próxima a 40 %. Em torno de 30 min de tratamento a inibição do transporte de GLN oscilou entre 70 e 90 %, variando em função do tempo em que as plantas foram seccionadas para se iniciar a coleta. Após esse período, os teores de GLN continuaram decrescendo com o tempo de inundação, atingindo níveis próximos a 2 % (mol %) com 60 min de tratamento, ou mesmo valores mais baixos em tempos maiores (figura 8 e tabela 13).

Em todos os tempos de inundação foi observada uma queda abrupta do teor de URE transportados na seiva do xilema. Com tendência análoga à queda da GLN, o decréscimo iniciou-se imediatamente após a inundação das plantas, atingindo uma inibição de 40 % já aos 10 min de inundação e 70 % aos 30 min. Em uma hora de tratamento a inibição do transporte de URE chegou a aproximadamente 90 %, atingindo praticamente 100 % com quatro horas de inundação, maior tempo verificado (figura 8).

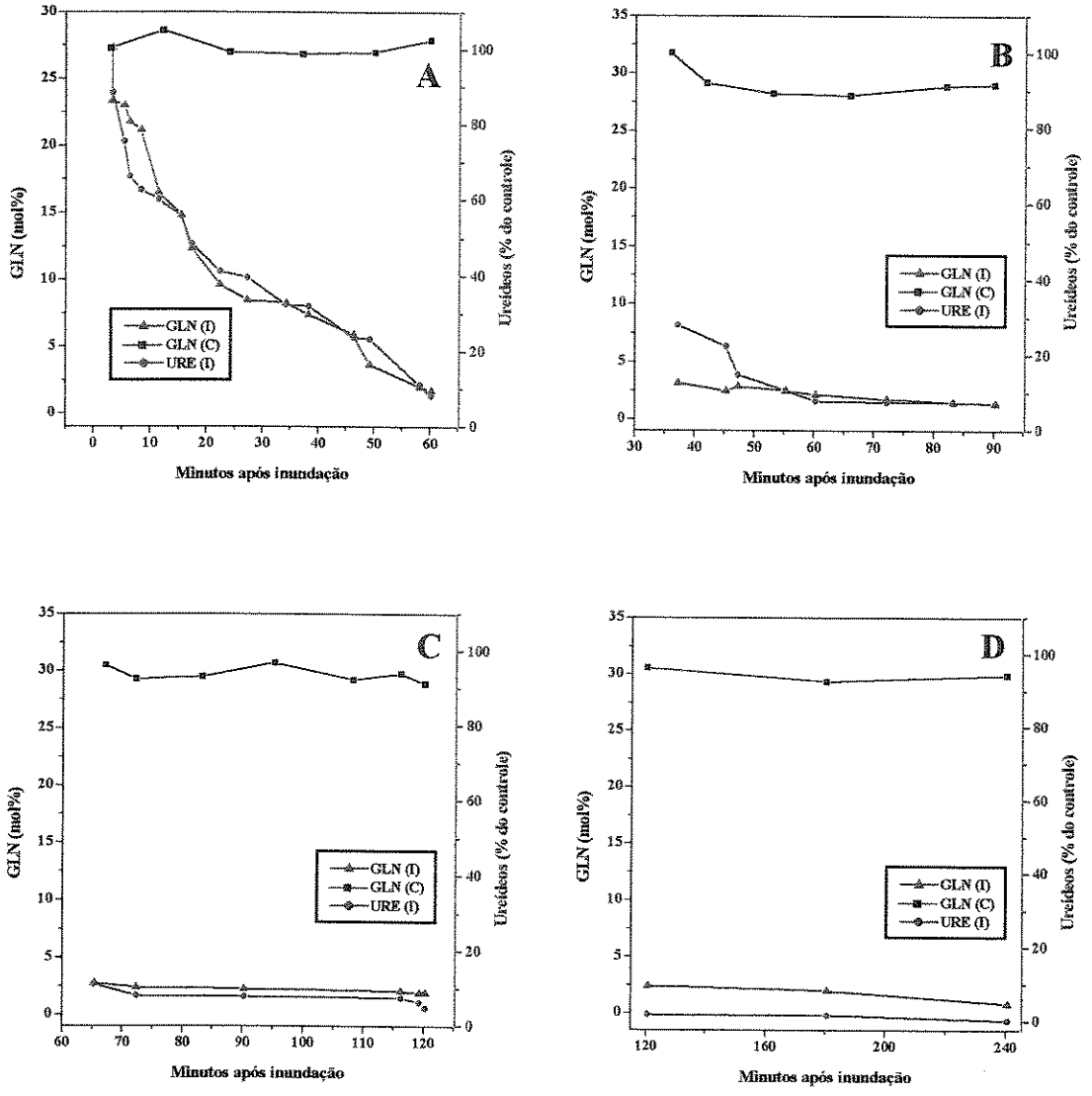


Figura 8. Efeito da inundação de plantas de soja cv. IAC-17, em estádio R2, sobre a glutamina (GLN) (mol%) e os ureídeos (URE) (% do controle) transportados no xilema. As plantas foram seccionadas e iniciadas as coletas de seiva, nos tempos zero (A), 30 (B) e 60 (C) min após a inundação. A coleta foi fracionada em lotes sucessivos de 50 μL correspondentes aos tempos indicados. Em (D) os valores são provenientes do volume total coletado durante uma hora, iniciada nos tempos indicados. **I**= plantas inundadas e **C**= plantas não inundadas.

Tabela 13. Composição aminoacídica (mol %) da seiva de xilema de plantas noduladas de soja cv. IAC-17, em estádio R2, em diferentes tempos de coleta após inundação do sistema radicular

	Tratamentos														
	A Coletas no intervalo (0 – 60 min) após inundação em 0 min														
	03	05	06	08	11	15	17	22	27	34	38	46	49	58	60
ASP	15,31	15,73	16,32	16,82	19,56	22,15	23,23	25,49	27,66	25,84	24,16	21,26	20,56	18,14	18,92
GLU	1,50	1,20	1,66	0,61	1,17	1,44	0,75	1,16	1,48	1,60	1,67	2,07	2,53	2,89	3,03
ASN	33,44	33,54	31,99	34,57	35,77	34,63	36,55	36,16	37,36	37,42	39,78	40,59	39,02	38,95	46,72
SER	6,20	6,51	7,00	6,95	6,38	7,38	7,35	6,95	6,86	7,35	7,53	7,85	8,36	8,88	9,00
GLN	23,31	23,00	21,76	21,14	16,47	14,76	12,29	9,61	8,45	8,19	7,33	5,85	3,61	1,94	1,66
ALA	0,54	0,85	1,01	1,12	1,23	1,51	1,55	2,01	2,65	2,75	3,18	3,70	3,77	4,05	4,39
GABA	1,43	1,48	1,55	1,58	1,70	1,69	1,75	2,21	2,28	2,35	2,55	2,70	2,77	3,23	3,74
Outros	18,27	17,69	18,71	17,21	17,72	16,44	16,53	16,41	13,26	14,50	13,80	15,98	19,38	21,92	12,54

	B Coletas no intervalo (30 – 90 min) após 30 min de inundação								C Coletas no intervalo (60 – 120 min) após 60 min de inundação					
	37	45	47	55	60	72	83	90	65	72	90	116	119	120
ASP	15,99	17,68	19,82	19,04	21,69	22,66	20,01	14,40	12,83	11,53	10,06	7,60	7,06	7,65
GLU	6,50	7,12	4,41	4,68	4,59	3,88	3,72	3,50	9,25	6,64	5,35	4,78	4,83	4,58
ASN	38,19	38,27	35,49	34,35	33,89	33,41	35,23	37,96	38,46	35,03	37,69	35,77	34,17	33,71
SER	8,90	7,65	7,53	7,09	6,09	6,37	7,44	6,94	6,07	6,77	8,93	9,92	10,02	10,15
GLN	3,12	2,43	2,84	2,41	2,09	1,71	1,45	1,30	2,70	2,31	1,87	2,22	2,03	1,89
ALA	2,31	2,52	2,71	2,87	2,95	3,02	3,17	3,37	2,43	2,65	2,99	3,81	3,85	3,92
GABA	3,76	4,57	5,56	6,49	7,50	8,10	8,67	8,82	7,01	8,65	9,15	9,90	10,23	11,05
Outros	21,23	18,76	21,64	23,07	21,2	20,85	20,31	23,71	21,25	26,42	23,96	26,00	27,81	27,05

	D Coleta no intervalo (120 – 240 min) após 120 min de inundação			E Controle (0 –240 min)											
	120	180	240	03	12	24	37	50	60	72	83	116	120	180	240
ASP	9,65	7,33	6,86	7,69	7,50	12,61	13,26	11,62	8,65	7,49	8,86	9,03	9,12	9,02	8,71
GLU	9,14	8,65	9,45	1,28	0,86	0,52	0,54	0,59	0,55	0,45	0,44	0,39	0,52	0,53	0,58
ASN	30,86	25,23	22,50	35,90	34,59	34,53	34,84	33,89	36,45	34,94	36,15	39,42	39,02	39,17	38,45
SER	9,05	11,67	12,41	6,49	6,51	2,46	3,37	3,25	2,63	4,76	3,24	2,08	2,45	2,32	2,72
GLN	2,38	1,80	0,81	27,26	28,60	27,00	26,86	27,00	27,91	29,32	29,54	29,77	29,87	29,32	29,87
ALA	4,88	7,68	8,37	0,64	0,60	0,37	0,34	0,36	0,31	0,44	0,47	0,23	0,32	0,38	0,30
GABA	9,56	12,36	18,28	1,68	2,44	1,92	2,16	1,53	1,84	1,31	1,72	1,15	0,93	1,02	1,12
Outros	24,48	25,28	21,32	19,06	18,9	20,59	18,63	21,76	21,66	21,29	19,58	17,93	17,77	18,24	18,25

As plantas foram seccionadas e iniciadas as coletas de seiva, nos tempos zero (A), 30 (B) e 60 (C) min após a inundação. A coleta foi fracionada em lotes sucessivos de 50 µL correspondentes aos tempos indicados. Em (D) os valores são provenientes do volume total coletado durante uma hora, iniciada nos tempos indicados.

A coleta de seiva foi realizada individualmente em cada uma das três plantas de um mesmo vaso, em intervalos de 30 min entre uma planta e outra, de forma que num tempo total de duas horas de coleta por vaso 1 hora correspondesse a um período comum de coleta entre as três plantas. Esse procedimento foi realizado tanto para plantas inundadas, como para plantas do controle e, teve por objetivo, verificar uma possível interferência entre plantas de um mesmo vaso nos resultados obtidos. Conforme mostram os resultados na figura 8, isso não influenciou a queda de ureídeos e de GLN, mostrando inclusive, valores próximos entre o tempo de coleta e a proporção desses metabólitos para as diferentes plantas. No entanto, foram observados na coleta iniciada com tempo de 30 min de inundação, valores mais baixos de GLN e de ureídeos em relação a plantas em que se iniciou a coleta já a partir do início do tratamento. Isso possivelmente deve ter ocorrido em função do fluxo mais rápido de seiva transportada via xilema dessas plantas, quando comparado àquelas que tiveram suas partes aéreas cortadas no início do tratamento, onde o fluxo foi diminuindo.

Apesar dos efeitos intensos dos tratamentos com hidroponia e com inundação sobre o transporte de URE e de GLN no xilema, foi constatada uma diminuição bem rápida e em maior grau desses compostos nas plantas inundadas. A aeração no sistema hidropônico parece ter aliviado pelo menos durante certo período, o efeito do aumento da resistência à difusão do O_2 para o interior dos nódulos em meio aquoso, de forma que níveis relativamente mais altos de GLN e de URE foram observados como resultado desse experimento e também uma resposta de inibição bem menos rápida (figuras 7 e 8).

O fato da queda de GLN e de URE transportados no xilema terem sido detectados logo após a inundação do sistema radicular, sugere que o tratamento interferiu rapidamente sobre a barreira de difusão de O_2, inibindo a nitrogenase, e portanto a síntese de NH_4^+, fonte de N para síntese desses compostos.

A resposta simultânea entre a queda de ureídeos e de GLN sugere a inibição de uma conversão rápida e sincronizada entre a GLN sintetizada no citoplasma e as várias outras etapas de síntese de ureídeos processadas entre os diferentes tipos de células do nódulo e compartimentos subcelulares, que envolvem a biossíntese de ureídeos nos nódulos.

Nesse processo de inibição, o baixo suprimento de O_2 para os nódulos possivelmente exerceu papel crucial em dois processos metabólicos importantes: inibindo a atividade da nitrogenase, diminuindo assim o NH_4^+ disponível para síntese de GLN e conseqüentemente de ureídeos e também, limitando uma das etapas finais para a produção de ureídeos, a síntese de alantoína, no peroxissomo de células não infectadas, a qual é dependente de O_2 (Rainbird & Atkins, 1981; Lucas, *et al.* 1983).

A rota de síntese de ureídeos envolve a assimilação de NH_4^+, produzida pela nitrogenase, para formar GLN e outros aminoácidos (GLU, ASP e GLY) nas células infectadas. Estes são utilizados pela síntese *de novo* de nucleotídeos para formar bases purínicas (xantina e hipoxantina) (Atkins, 1991). A xantina desidrogenase dependente de NAD^+, também presente nas células infectadas, oxida as bases em ácido úrico, porém a reação seguinte, oxidação de ácido úrico à alantoína pela uricase, ocorre em células não infectadas e requer O_2 (Shelp *et al.*, 1983; Atkins *et al.*, 1997). Apesar da uricase ser altamente expressa, compreendendo 1-2 % da proteína solúvel dos nódulos (Sanchez *et al.*, 1987) e estar concentrada em microcorpos alargados de células não infectadas da zona central do nódulo (Newcomb & Tandon, 1981), a síntese de alantoína seria negligenciável se os níveis de pO_2 da ordem daqueles mantidos em células infectadas, também ocorressem em células não infectadas. Em nódulos de *Vigna sinensis* o Km (O_2) da uricase é cerca de 30.000 nM em solução aquosa (Rainbird & Atkins, 1981), valor que é cerca de 1000 vezes a concentração de O_2 livre que mantém as taxas máximas de fixação de N_2 sustentadas nas células infectadas

adjacentes (10 a 60 nM em solução) (Kuzma *et al.*, 1993).

A difusão baixa de O_2 em meio aquoso, faz com que tecidos circundados por água, como de raízes em solos alagados, estejam sob hipoxia (Ricard *et al.*, 1994). Em hidroponia, mesmo com borbulhamento constante de ar, é provável que grande parte da superficie do sistema radicular- raízes e nódulos – esteja envolta por uma película de água, o que segundo os autores, caracterizaria a hipoxia nesses tecidos. Nessa base, o sistema radicular das plantas inundadas, desenvolveriam bem mais rapidamente os sintomas de tecidos sob deficiência de O_2, em função do maior contato do sistema radicular com a superficie aquosa, o que justificaria a maior rapidez e intensidade dos efeitos nesse tratamento.

Thumfort *et al.* (1999) simularam um modelo para a difusão e reação do O_2 nos nódulos de leguminosas com base nas células infectadas com rizóbio e células adjacentes, não infectadas. O modelo prevê uma distribuição compartimentalizada e distinta da $[O_2]$ entre as células infectadas e não infectadas. Altas concentrações de O_2 estariam presentes nas células não infectadas, sendo consistentes com o requerimento necessário para a operação eficiente da uricase e síntese de ureídeos, e baixas concentrações de O_2 ao longo da maioria das células infectadas, fornecendo um ambiente adequado para a fixação de N_2. Essa compartimentalização do O_2 considera um fluxo de O_2 significativo entre os dois tipos de células e que deve haver uma resistência significativa à difusão de O_2 através da interface célula:célula, devido à plasmalema e paredes celulares.

Por outro lado, apesar da alta afinidade da citocromo-oxidase do bacteróide pelo O_2 (Vance & Heichel, 1991) e da difusão do O_2 ser facilitada pela leg-hemoglobina (Appleby, 1984; Vance & Heichel, 1991), o O_2 parece ser limitante mesmo sob condições ambientes (21 %) para a atividade da nitrogenase em nódulos de soja (Drevon *et al.*, 1988b; Hunt *et al.*, 1989), uma vez que nessas condições a fixação de N_2 é aumentada pela elevação da pO_2

(Hunt *et al.*, 1989). Foi verificado também o processo de fermentação em nódulos, mesmo em presença de O_2 no ambiente externo (Tajima & Larue, 1982; Heckman & Drevon, 1987). Em hidroponia e sobretudo nos tratamentos sob inundação, esses efeitos seriam grandemente intensificados, uma vez que a velocidade de difusão do O_2 é cerca de 100 vezes menor em água do que em ar (Thomson & Greeway, 1991).

Apesar de ASN ser o aminoácido transportado em maior proporção no xilema, dependendo também da síntese de GLN, ele praticamente não se alterou frente aos diferentes tempos de tratamento, possivelmente devido ao tamanho do "pool" encontrado nos nódulos. Apenas nas plantas submetidas à inundação foi observado o início de um decréscimo com duas 2 horas de exposição (tabelas 12 e 13). Uma diminuição mais expressiva certamente requer um maior tempo de tratamento, sobretudo nos tratamentos com hidropoia, conforme observado nos experimentos anteriores (itens 3.2 , 3.3 e 3.4).

Quando as plantas foram inundadas, ALA e GABA aumentaram gradualmente com o tempo, após aplicação do tratamento. Respostas um pouco mais expressivas foram observadas a partir de 30 min de inundação, sendo que para tempos superiores a 60 min, o GABA mostrou maiores acréscimos em relação à ALA. Em hidroponia as mudanças foram muito pequenas, reforçando a idéia que a presença de aeração minimizou os efeitos da hipoxia, apesar de limitar o O_2 para o funcionamento adequado dos nódulos (tabelas 12 e 13).

4.6. Transporte de glutamina e de ureídeos em soja nodulada sob efeito da ausência de N_2 atmosférico e de O_2

Com base nos experimentos anteriores, foi observado que em condições limitadoras à fixação do N_2, como presença de NO_3^-, hidroponia ou inundação, a queda em GLN no xilema sempre acompanhou a queda de ureídeos, sugerindo que flutuações de seus níveis

UNICAMP

encontrados no xilema, refletem mudanças da atividade metabólica do nódulo.

Com o propósito de fundamentar mais a hipótese de que a GLN transportada no xilema de plantas noduladas, pode ser considerada um produto da fixação de N_2, assim como os ureídeos, foi avaliado o efeito de tratamentos que inibem a nitrogenase especificamente. Os sistemas radiculares das plantas foram incubados em um sistema de fluxo de gases, com diferentes composições. O $Ar:O_2$ (80 %:20 %) e N_2 puro, constituiram a ausência de N_2 e de O_2, respectivamente. Dois controles foram conduzidos. Em um deles o sistema radicular foi submetido a um fluxo de gases com composição equivalente à atmosfera ambiente e no outro não foi aplicado o fluxo. Um tratamento com inundação das plantas, foi conduzido como referência.

Na tabela 14 estão apresentados os resultados obtidos com os diferentes tratamentos sobre a composição nitrogenada transportada no xilema.

A GLN diminuiu sensivelmente com a aplicação durante uma hora do N_2 ou mistura $Ar:O_2$ à semelhança das plantas inundadas. O tratamento com N_2 provocou maior efeito sobre a queda da GLN, reduzindo-a a valores próximos a zero. O efeito do $Ar:O_2$, apesar de intenso, foi bem menos pronunciado do que o tratamento com N_2. É possível que nesse sistema, durante a condução do tratamento, existisse alguma quantidade de N_2 disponível para a fixação, presente nos tecidos, de forma a permitir a síntese de pequena quantidade de GLN. Por outro lado, a indisponibilidade de oxigênio para que a fixação de N_2 se processasse normalmente causou efeitos mais rápidos, como pode ser demonstrado também pelo baixo teor de GLN no xilema das plantas alagadas. Isso parece coerente, uma vez que o O_2 é utilizado não somente pelos bacteróides mas por todos os tecidos vivos do sistema radicular.

O teor de URE diminuiu significativamente com os tratamentos utilizados, não ocorrendo diferença estatística entre os efeitos causados entre tratamentos. Isso demonstrou

que as oscilações observadas no teor de GLN das plantas submetidas aos tratamentos inibitórios à fixação de N_2, não foram suficientes para causar diferenças marcantes do teor de URE entre os tratamentos. Isso possivelmente ocorreu devido a síntese de GLN envolver apenas a incorporação do NH_4^+, ao passo que a síntese de ureídeos envolve uma via complexa.

Ao contrário dos ureídeos, o teor de ALT não mostrou redução com os tratamentos empregados durante o período de execução do experimento, sugerindo que os ureídeos, apesar de em maior concentração são os primeiros produtos a terem seu transporte severamente inibido (tabela 14).

O controle com fluxo de gases com igual composição do ar atmosférico demonstrou que o sistema utilizado não influenciou a composição nitrogenada transportada no xilema (tabela 14).

Com relação à composição nitrogenada das raízes foi verificado um decréscimo em GLN apenas nos tratamentos com N_2 e inundação, provavelmente devido ao maior impacto desses tratamentos sobre o processo de fixação de N_2. Da mesma forma, o nível de ALA e de GABA mostraram elevação apenas nas plantas submetidas a esses tratamentos. Os demais aminoácidos e teores de ALT e URE não apresentaram mudanças em seus níveis nas raízes submetidas aos diferentes sistemas (tabela 15).

A composição aminoacídica dos nódulos apresentou um aumento pronunciado dos teores de ALA e GABA nos tratamentos com N_2 e inundação das plantas, de forma semelhante ao ocorrido nas raízes. Os demais aminoácidos e o teor de ALT e URE não se alteraram significativamente com os tratamentos impostos (tabela 16). Em nódulos de soja submetida à inundação por cinco dias, foi constatada uma resposta semelhante por Puiatti & Sodek (1999). Nesse caso, essas alterações foram acompanhadas por decréscimos em GLU, ASP e ASN, sugerindo a participação desses aminoácidos na síntese de ALA e GABA, sob

deficiência de O_2 no sistema radicular.

King & Layzell (1991) verificaram que a exposição do sistema radicular nodulado de soja à atmosfera sem N_2 ($Ar:O_2$; 80:20) causou reduções da atividade da nitrogenase e da respiração dos nódulos. A concentração interna de O_2 (estimada pela oxigenação da leg-hemoglobina) diminuiu para 56 % de seu valor inicial, após 60 min de exposição ao tratamento. O declínio de entrada do O_2 nas células infectadas resultou na diminuição da permeabilidade do nódulo a gases, à semelhança de outros trabalhos (Hunt *et al.* 1987; Diaz

Tabela 14. Composição aminoacídica (mol%), teor de aminoácidos livres totais (ALT) e teor de ureídeos totais (URE) em seiva de xilema de plantas noduladas de soja cv. IAC-17, em estádio R2-R3, cultivada em pedrisco, e submetidas a diferentes tratamentos com fluxo de gases e inundação no sistema radicular*

XILEMA	CONTROLE SEM FLUXO DE GASES	CONTROLE COM FLUXO DE AR ATMOSFÉRICO	FLUXO COM GÁS DINITROGÊNIO	FLUXO COM ARGÔNIO: OXIGÊNIO (80:20)	INUNDAÇÃO
ASP	7,83	8,80	0,51	12,68	2,48
GLU	1,78	1,40	2,72	2,79	3,48
ASN	41,89	43,83	41,25	42,00	41,72
SER	1,80	2,74	8,22	2,87	7,69
GLN	**21,97**	**20,12**	**0,49**	**4,26**	**1,05**
ALA	0,94	1,05	20,37	1,61	12,51
GABA	2,57	1,69	6,51	3,48	11,31
Outros AAs	21,22	20,37	19,93	30,31	19,76
ALT (µmol/mL)	*** 3,72 a	3,41 a	3,76 a	3,41 a	2,82 a
URE (µmol/mL)	11,08 a	9,44 a	4,44 b	4,57 b	1,69 b

*O início da coleta da seiva foi realizado após as plantas se submeterem a uma hora de tratamento. Durante a condução dos tratamentos o fluxo inicial dos gases através dos vasos foi ajustado para 500mL/min durante dois minutos. Levou-se em consideração o espaço poroso dos vasos, em torno de 600mL. Passado dois minutos, o fluxo foi ajustado para 200mL/min até o término da coleta da seiva do xilema.
**Foram detectados os aminoácidos HIS, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE e LEU e LYS, porém suas concentrações foram menores que 10%.
***Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

del Castillo *et al.*, 1992; Kuzma *et al.* 1993), a qual ocorreu gradualmente, durante a exposição ao Ar. Com base nessas informações, caso tenha ocorrido o mesmo no tratamento com Ar em nosso experimento, a queda da concentração de O_2 no interior do nódulo parece não ter sido suficiente para induzir uma condição de hipoxia nos tecidos de forma a induzir o processo de fermentação e conseqüentemente desencadear a síntese de ALA ou mesmo GABA (tabelas 14 e 16).

Os aumentos de ALA e GABA verificados no xilema das plantas submetidas aos tratamentos com N_2 e inundação corresponderam a aumentos observados em raízes e nódulos.

O aumento em SER no xilema correspondeu apenas a um pequeno aumento observado nos nódulos das plantas submetidas a esses tratamentos (tabelas 14 e 16).

Tabela 15. Composição aminoacídica (mol%), teor de aminoácidos livres totais (ALT) e teor de ureídeos totais (URE) em extrato de raízes de plantas noduladas de soja cv. IAC-17, em estádio R2-R3, cultivada em pedrisco e submetidas a diferentes tratamentos com fluxo de gases e inundação no sistema radicular

RAIZ	CONTROLE SEM FLUXO DE GASES	CONTROLE COM FLUXO DE AR ATMOSFÉRICO	FLUXO COM GÁS DINITROGÊNIO	FLUXO COM ARGÔNIO: OXIGÊNIO (80:20)	INUNDAÇÃO
ASP	8,90*	8,55	10,90	12,67	9,72
GLU	9,58	8,85	9,30	12,72	12,05
ASN	7,83	8,01	6,23	6,36	6,80
SER	9,37	8,88	8,75	8,65	8,50
GLN	**4,11**	**4,06**	**2,54**	**3,97**	**1,54**
ALA	4,75	3,97	10,04	3,74	7,76
GABA	7,00	6,53	12,59	5,18	14,01
Outros AAs	48,46	51,15	39,65	46,71	39,62
ALT (µmol/gMF)	**1,83 a	1,45 a	1,44 a	1,25 a	1,65 a
URE (µmol/gMF)	0,75 a	0,94 a	0,70 a	1,14 a	0,41 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram menores que 10%.
**Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Concomitante a essas variações, foi observada uma diminuição em ASP (tabelas 14 e 16) à semelhança dos trabalhos conduzidos por Roberts *et al.* (1992) e Edwards *et al.* (1998) e no experimento conduzido com diferentes tempos de inundação de soja nodulada (item 3.4), em que os teores de ASP tornaram-se mínimos, logo no início da hipoxia.

Minchin *et al.* (1983) verificaram que a exposição de nódulos de leguminosas à privação de N_2 com $Ar:O_2$ ou tratamento com 10 % de acetileno, causou um declínio da atividade da nitrogenase Este declínio esteve associado com um decréscimo aparente na permeabilidade do nódulo, causando redução da concentração de O_2 na célula infectada, limitando portanto o O_2 para o nódulo.

Em nódulos de *Coriaria arborea* a atividade de redução do acetileno decresceu para uma atividade estável sem recuperação. Em resposta ao tratamento com $Ar:O_2$, a respiração e a permeabilidade de difusão a gases também decresceram, sugerindo a presença de um mecanismo de resistência à difusão variável nesta espécie (Harris & Silvester, 1994).

Lundquist (2000) determinou a relação entre a atividade da nitrogenase, concentração de O_2, e depleção de N_2 por curtos períodos em nódulos radiculares intactos de *Alnus incana*. A pO_2 a 20 % forneceu uma atividade máxima da nitrogenase. Abaixo de 20 %, a atividade da nitrogenase pareceu limitada pelo suprimento de O_2, uma vez que decresceu com o pO_2 e foi estimulada com um retorno a valores mais altos de pO_2.

Curioni *et al.* (1999) investigaram as interações entre a atividade da nitrogenase, assimilação de NH_4^+ e glicólise em nódulos de sistemas radiculares de alfafa submetidos a curta exposição (30 a 240 min) à mistura $Ar:O_2$ (80:20). O acúmulo de intermediários glicolíticos permitiu sugerir que o fluxo glicolítico foi inibido nos passos catalisados pela fosfofrutoquinase, piruvato quinase e fosfoenolpiruvato carboxilase. O declínio da atividade da nitrogenase foi seguido por um aumento dramático na razão GLU/GLN, evento que

precedeu a inibição da glicólise. Os autores propuseram que o aumento na razão GLU/GLN ocorreu como resultado do declínio da atividade da nitrogenase e em conseqüência do ciclo GS/GOGAT e que essa razão pode atuar como um sinal para o decréscimo da glicólise em nódulos de leguminosas.

No tratamento com $Ar:O_2$ de nosso experimento, não foram observadas grandes alterações na proporção dos aminoácidos GLU e GLN nos nódulos, apenas um pequeno acréscimo, à semelhança do tratamento com N_2, visto que em soja os nódulos apresentam alta proporção de GLU em relação à GLN. No entanto, com relação à composição da seiva do

Tabela 16. Composição aminoacídica (mol%), teor de aminoácidos livres totais (ALT) e teor de ureídeos totais (URE) em extrato de nódulos de plantas de soja cv. IAC-17, em estádio R2-R3, cultivadas em pedrisco e submetidas a diferentes tratamentos com fluxo de gases e inundação no sistema radicular

NÓDULO	CONTROLE SEM FLUXO DE GASES	CONTROLE COM FLUXO DE AR ATMOSFÉRICO	FLUXO COM GÁS DINITROGÊNIO	FLUXO COM ARGÔNIO: OXIGÊNIO (80:20)	INUNDAÇÃO
ASP	10,00*	8,65	6,27	8,23	6,09
GLU	16,83	17,25	20,70	18,55	16,02
ASN	19,87	14,17	13,77	15,75	14,68
SER	5,36	6,40	10,21	6,10	8,82
GLN	**0,69**	**0,43**	**0,88**	**0,74**	**0,36**
ALA	10,02	9,84	20,85	11,01	19,72
GABA	9,97	12,16	17,08	8,96	15,13
Outros AAs	27,26	31,00	10,24	30,66	19,18
ALT (µmol/gMF)	**24,54 a	26,25 a	19,46 a	27,17 a	20,46 a
URE (µmol/gMF)	2,37 a	2,95 a	2,00 a	1,82 a	2,63 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram menores que 10%

**Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade

xilema foi observada uma grande mudança da relação GLU/GLN nas plantas submetidas aos

tratamentos inibitórios à fixação de N_2, apesar da pequena proporção de GLU em relação à GLN no controle. Considerando que o teor de GLN no xilema é um sinalizador da atividade metabólica do nódulo, frente às respostas obtidas com os diferentes tratamentos (Ar, N_2 e inundação), a proporção dessa amida no xilema de leguminosas simbióticas que a transportam, poderia ser um indicador mais confiável que a razão GLU/GLN nos nódulos.

4.7. Atividade da glutamina sintetase e transporte de nitrogênio em soja em diferentes estádios do processo de nodulação

Conforme foi sugerido nos experimentos anteriores (itens 4.1., 4.2., 4.3., 4.4. e 4.5.), as alterações ocorridas no teor de GLN transportada na seiva do xilema estão relacionadas a mudanças da atividade metabólica do nódulo sob condições que limitam a fixação/assimilação primária do N_2. Buscou-se com esse experimento, relacionar o transporte de GLN e a atividade da GS, enzima responsável pela biossíntese dessa amida, com o desenvolvimento do nódulo em soja.

Durante a fase de formação do nódulo foram observadas mudanças marcantes no transporte de N no xilema (tabela 17). Na fase inicial de desenvolvimento, V2, ocorreu um forte aumento do teor de ASP e uma diminuição abrupta de ASN e de GLN, e do teor de ALT e baixo teor de URE na seiva do xilema (tabela 17 e figura 9C e 9A). Concomitantemente, foi observada a maior queda no conteúdo de clorofilas, o que pôde ser visualizado pelo aspecto amarelecido das plantas (figura 9A). Da mesma forma foi detectada uma proporção baixa de ASN nas raízes e nos nódulos nesse estádio (tabelas 18 e 19).

O conjunto desses efeitos foi caracterizado como uma fase de deficiência de N, provavelmente devido à falta de sincronização entre a depleção das reservas nitrogenadas cotiledonares e o estabelecimento da fixação de N_2, já que nesta etapa a formação do nódulo

estava se iniciando. Essa fase de deficiência de N pode ser atribuída ao fato do primeiro N_2 fixado ser usado prioritariamente ao crescimento do nódulo, em detrimento do transportado para a parte aérea, cujas folhas em expansão requerem alto teor de N (Cookson *et al.*, 1980; Franco e Muns, 1982; Jones *et al.*, 1981; Yoneyama e Yshizuki, 1982; Atkins *et al.*, 1989).

Os teores de URE em raízes e nódulos não apresentaram grandes mudanças em todas as épocas avaliadas. Em raízes, o teor de ALT não foi alterado durante o desenvolvimento dos nódulos, mesmo na fase de "fome de N", caracterizada por baixos teores de ALT e URE na seiva do xilema. No entanto, a concentração de ALT em nódulos aumentou significativamente após o estádio V3 (tabelas 17, 18 e 19), fase em que a "deficiência de N" já havia sido recuperada (tabela 17 e figura 9C). Coletivamente, esses resultados reforçam novamente o argumento de que a soja na fase de estabelecimento da fixação de N_2 prioriza o N disponível para o desenvolvimento dos nódulos e raízes.

Sprent & Raven (1985) estimaram que durante a germinação cerca de um terço do N da semente de feijão é requerido para a formação do nódulo. Atkins *et al.* (1984b) ao utilizarem sementes marcadas com ^{15}N em feijão-de-corda verificaram que durante os primeiros estádios de formação dos nódulos (seis dias após a iniciação) mais de 50 % do N nos bacteróides e da fração vegetal do nódulo foram derivados dos cotilédones. Posteriormente, assim que a fixação de N_2 se iniciou, mais de 90 % do N do bacteróide foram derivados da fixação.

O modelo de partição do N para os nódulos e o desenvolvimento de sintomas de "fome de N" mostrou variações entre estirpes de *Rhizobium* em feijão (Hungria *et al.*, 1991) e entre cultivares de feijão-de-corda (Atkins *et al.*, 1989). Com base nessas diferenças, a seleção de estirpes e cultivares pode conduzir a uma associação que permita o estabelecimento precoce da fixação de N_2, evitando o desenvolvimento dos sintomas de deficiência de N (Hungria *et*

al., 1991).

Em V3 foram observadas características de plantas com sistema de fixação de N_2 eficiente: aumento da massa nodular (figura 9B) e do teor de ureídeos no xilema (figura 9C) e posteriormente aumento da clorofila (figura 9A). Nesta fase a composição aminoacídica da seiva do xilema revelou uma diminuição de ASP e aumento de GLN e ASN, acompanhado de aumento da atividade da GS (tabela 17 e figura 9D). No entanto, foi constatado que em V3 a atividade da GS, assim como o teor de URE, não atingiram os níveis máximos à semelhança de GLN. Os teores de URE e a atividade da GS aumentaram ainda posteriormente ao aumento máximo de GLN, o que parece coerente, uma vez que GLN é precursora biossintética de URE, e o teor desses, exportados pelos nódulos, dependem portanto, da atividade da GS. Posteriormente a V3 os níveis GLN na seiva do xilema mostraram-se estáveis, os quais foram

Tabela 17. Composição aminoacídica (mol%) e aminoácidos livres totais (ALT) (µmol/mL) em seiva de xilema de soja cv. IAC-17 em diferentes épocas de desenvolvimento após a inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463

XILEMA	Estádio fenológico da soja /dias após primeira inoculação							
	V1	V2	V3	V4/V5	R1	R2/R3	R4	R5
	04 DAT	13 DAT	19 DAT	23 DAT	27 DAT	33 DAT	38 DAT	44 DAT
ASP*	**12,89**	**77,18**	**18,74**	**18,58**	**10,19**	**9,89**	**10,07**	**10,02**
GLU	1,30	1,89	0,28	0,40	0,56	0,69	0,86	1,62
SER	1,23	1,25	2,30	3,60	2,85	2,93	2,93	4,66
ASN	**59,36**	**5,32**	**35,05**	**40,14**	**45,56**	**45,81**	**46,14**	**43,65**
GLN	**2,98**	**0,46**	**21,76**	**20,20**	**21,00**	**21,30**	**23,66**	**22,90**
ALA	0,79	0,58	0,27	0,54	0,53	0,58	0,61	0,37
GABA	2,20	1,37	1,33	1,57	2,13	1,51	1,97	1,33
Outros	19,25	11,95	20,27	14,97	17,18	17,29	13,76	15,45
ALT (µmol/mL)**	4,5 c	0,65 f	2,22 e	2,31 de	3,28 d	3,33 d	6,05 b	7,84 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 3 %)

**Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade (n= 3)

acompanhados por uma elevação gradual de ASN transportada e presente nos nódulos e raízes.

Por outro lado, o teor de GLN nas raízes não apresentou uma elevação significativa e nos nódulos, manteve-se em proporções bastante reduzidas durante toda a coleta (tabelas 17, 18 e 19).

Os aminoácidos GLU, ALA, GABA e SER apresentaram-se em proporções relativamente baixas na seiva do xilema e bem superiores em nódulos e raízes, durante todos os estádios de nodulação analisados. Essas diferenças sugerem funções metabólicas específicas desses aminoácidos em raízes e nódulos (tabelas 17, 18 e 19).

Tabela 18. Composição aminoacídica (mol%), aminoácidos livres totais (µmol/gMF) e ureídeos totais (µmol/gMF) em extrato de raízes de soja cv. IAC-17 em diferentes épocas de desenvolvimento após a inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463

RAIZ	Estádio fenológico da soja /dias após primeira inoculação							
	V1	V2	V3	V4/V5	R1	R2/R3	R4	R5
	04 DAT	13 DAT	19 DAT	23 DAT	27 DAT	33 DAT	38 DAT	44 DAT
ASP*	**12,10**	**10,36**	**11,18**	**13,50**	**7,53**	**6,89**	**8,11**	**9,50**
GLU	5,32	8,27	6,85	7,16	7,65	7,54	8,51	5,04
ASN	**35,84**	**3,89**	**15,40**	**18,75**	**19,58**	**20,69**	**22,92**	**20,63**
SER	2,93	8,69	9,23	7,38	6,46	8,70	8,32	7,74
GLN	**2,08**	**4,14**	**5,14**	**5,26**	**5,99**	**6,10**	**6,51**	**5,96**
ALA	2,81	5,13	4,51	4,06	4,88	6,09	6,03	6,14
GABA	3,08	3,61	4,08	4,58	7,90	6,08	6,70	4,92
Outros	35,84	55,91	43,61	39,31	40,01	37,91	32,90	40,07
ALT (µmol/gMF)**	2,37 a	1,67 a	1,42 a	1,46 a	1,65 a	1,68 a	1,42 a	1,28 a
URE (µmol/gMF)**	0,82 a	0,69 a	0,69 a	0,72 a	0,79 a	0,84 a	0,90 a	0,79 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 3 %)

**Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade (n= 4)

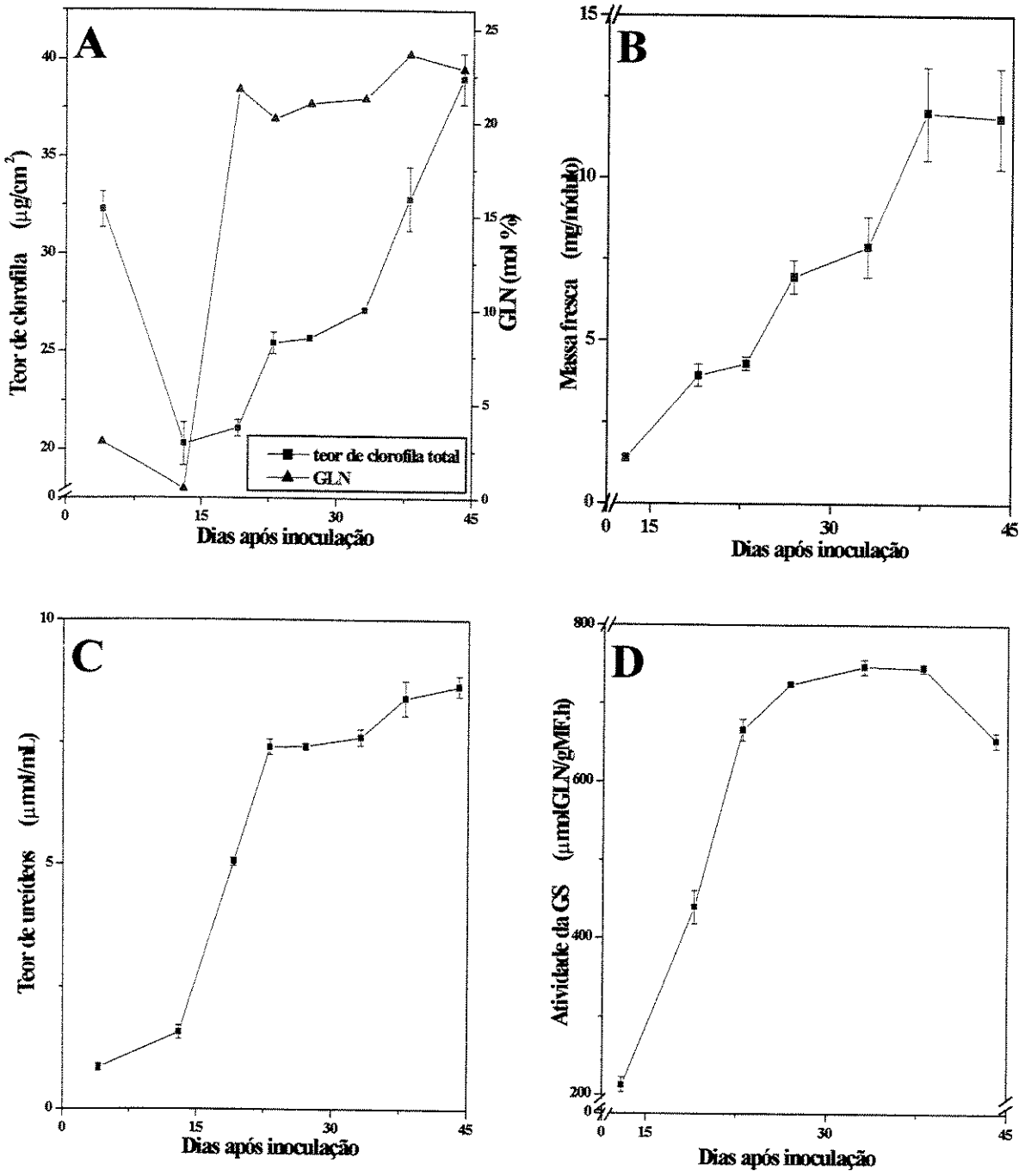


Figura 9. Teor de clorofila total da última folha expandida e de GLN na seiva do xilema (A); massa fresca/nódulo (B); ureídeos totais na seiva de xilema (C) e atividade da glutamina sintetase (GS) em nódulos de soja (D), cultivar IAC-17, em diferentes épocas após a primeira inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463. Barras= E.P. (n=3)

As mudanças de atividade da GS concordam com resultados que demonstram que um aumento rápido da atividade da nitrogenase e conteúdo de leg-hemoglobina nos nódulos são acompanhados por aumentos similares das atividades da GS (Robertson *et al.*, 1975; Hungria *et al.*, 1991; Temple *et al.* 1996), o que também é consistente com a elevação de glutamina transportada na seiva do xilema, já evidenciado em plantas cuja fixação do N_2 torna-se ativa (Puiatti e Sodek, 1999). No estádio R1, 27 dias após a primeira inoculação com rizóbio, os valores de atividade da GS mostraram-se entre os mais altos, associados com níveis altos de ureídos transportados na seiva do xilema, demonstrando um aumento da fixação de N_2 bem como da demanda de N pela parte aérea em função do início do período reprodutivo.

Tabela 19. Composição aminoacídica (mol%), aminoácidos livres totais (µmol/gMF) e ureídeos totais (µmol/gMF) em extrato de nódulos de soja cv. IAC-17 em diferentes épocas de desenvolvimento após a inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SMS 463

NÓDULO	V2	V3	V4/V5	R1	R2/R3	R4	R5
	13 DAT	19 DAT	23 DAT	27 DAT	33 DAT	38 DAT	44 DAT
ASP	**9,67**	**12,45**	**18,90**	**10,21**	**6,58**	**11,31**	**15,07**
GLU	14,61	14,72	9,73	15,16	13,17	12,89	14,81
ASN	**0,71**	**7,13**	**8,04**	**10,78**	**10,52**	**10,79**	**9,88**
SER	10,62	9,99	12,56	10,62	8,57	10,40	9,03
GLN	**2,11**	**1,32**	**1,25**	**0,72**	**0,45**	**0,66**	**0,53**
ALA	2,69	5,58	6,11	5,76	8,50	9,73	14,01
GABA	6,19	10,00	9,61	12,53	13,28	13,03	11,99
Outros	53,40	38,81	33,80	34,22	38,93	31,19	24,68
AL T (µmol/gMF)	13,86 c	14,64 c	17,73 b	18,07 b	20,53 a	20,62 a	17,36 b
URE (µmol/gMF)	1,44 a	1,54 a	1,65 a	1,67 a	1,68 a	1,80 a	1,56 a

*Foram detectados os aminoácidos HIS, GLY, THR, ARG, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS, porém suas concentrações foram baixas (≤ 3 %)

**Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade (n= 4)

4.8. Efeito do alagamento e do nitrato sobre a composição nitrogenada da seiva do xilema de espécies leguminosas transportadoras e não transportadoras de ureídeos

Os resultados dos experimentos anteriormente conduzidos sugerem fortemente que a presença de GLN no xilema está estritamente relacionada com a atividade metabólica dos nódulos em soja, de forma que as oscilações observadas no teor transportado acompanharam os níveis de URE, produtos específicos da fixação de N_2 nessa espécie. Buscou-se neste experimento determinar se o efeito de tratamentos inibitórios à fixação de N_2, NO_3^- e inundação do sistema radicular, sobre o teor de GLN transportada no xilema é comum a outras espécies de leguminosas, exportadoras de ureídeos e exportadoras de amidas.

Nas tabelas 20 e 21 são apresentados os dados referentes à composição de aminoácidos livres, URE e de ALT transportados na seiva do xilema de leguminosas transportadoras de ureídeos – soja, feijão-de-corda e feijão - fixando plenamente o N_2 e submetidas ao alagamento ou presença de NO_3^-.

A concentração de O_2 medida na solução drenada dos vasos em que se processou a inundação das plantas, atingiu valores inferiores a 1,0 mg/L já com um dia de inundação, o que caracterizou uma situação de hipoxia para as diferentes espécies estudadas (Sousa, 2001).

4.8.1. Soja

As duas cultivares de soja estudadas, IAC-17 e Maple Arrow, quando em associação com *Bradyrhyzobium elkanii* estirpe 463 ou *Rhizobium japonicum* estirpe 06, fixando o N_2 plenamente, evidenciado pelo alto teor de ureídeos, apresentaram altos níveis de ASN seguido de GLN. Ao se proceder à inundação do sistema radicular por 48 h, houve uma redução sensível do teor de uréideos, da GLN, seguida da ASN em ambas cultivares, independente da estirpe de rizóbio em associação, indicando uma queda abrupta do processo de fixação e assimilação primária do N_2. De forma similar foi observado um grande aumento nos teores de

ALA, resposta mais intensa na cultivar IAC-17. Os níveis mais altos de ALA nessa cultivar devem-se provavelmente ao metabolismo anaeróbico intensificado em decorrência do desenvolvimento bem mais pronunciado do sistema radicular, ocupando praticamente todo o espaço do vaso, o que provavelmente induziu a um consumo mais rápido de oxigênio durante o tratamento. O mesmo pode ser suposto pela redução do ASP em IAC-17 em relação à Maple Arrow.

O GABA sofreu aumentos marcantes com a inundação em ambas as cultivares. No entanto, esse aumento foi menos intensificado nas duas cultivares quando inoculadas com *Rhizobium japonicum* estirpe 06 (tabela 20).

Dentre os aminoácidos analisados, os teores de SER e de VAL transportados no xilema aumentaram consideravelmente com a inundação em ambas as cultivares e combinações com os dois rizóbios, e em menor grau, LEU, ILE, GLY e THR. A LYS foi transportada em maior quantidade sob inundação nas plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* estirpe 463. Esses resultados sugerem que plantas noduladas de soja sob condição inibitória à fixação de N_2, imposta por deficiência de O_2, apresentam uma alteração substancial no metabolismo de aminoácidos, interferindo em maior escala na assimilação primária do N, o que foi observado pela redução substancial das amidas GLN e ASN e em menor escala na síntese ou conversão dos demais aminoácidos (tabela 20).

O efeito da adição do NO_3^- sobre o N transportado na cultivar IAC-17 mostrou-se semelhante para as duas associações com rizóbio. Houve uma redução grande do nível de URE e de GLN acompanhada por um aumento substancial de ASN.

O teor de ALT na seiva do xilema mostrou reduções significativas com a inundação do sistema radicular, mostrando ser um efeito comum às cultivares de soja e associações com rizóbio. O teor de ALT nas plantas submetidas ao NO_3^- não sofreu alterações significativas (tabela 20).

Tabela 20. Composição aminoacídica (mol%), teor de ureídeos totais (URE) e teor de aminoácidos livres totais (ALT) em seiva de xilema de plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merril] das cultivares IAC-17 e Maple Arrow cultivadas em vermiculita, inoculadas com *Bradyrhyzobium elkanii* estirpe 463 ou *Rhizobium japonicum* estirpe 06 (NOD); não inoculadas, nutridas com NO^-_3 (N/NOD); noduladas recebendo NO^-_3 15mM (NOD c/N) durante quatro dias e noduladas inundadas durante dois dias (NOD/I) em R2

	Glycine max - Tratamento/ Cultivar de soja/ Estirpe de rizóbio									
	NOD – cv. IAC-17		NOD/I – cv. IAC-17		NOD c/N – cv. IAC-17		NOD – cv. Maple Arrow		NOD/I cv. Maple Arrow	
	Estirpe		Estirpe		Estirpe		Estirpe		Estirpe	
	463	06	463	06	463	06	463	06	463	06
ASP	**19,35**	**17,05**	**13,68**	**11,20**	**22,17**	**9,05**	**7,89**	**4,15**	**11,65**	**8,91**
GLU	**1,34**	**0,97**	**3,25**	**1,89**	**0,27**	**0,69**	**0,33**	**0,64**	**3,53**	**2,07**
ASN	**41,48**	**40,44**	**12,06**	**27,59**	**57,70**	**71,48**	**51,96**	**58,07**	**31,31**	**38,33**
SER	1,05	3,45	11,22	9,41	0,38	0,51	1,05	0,87	6,46	6,57
GLN	**21,02**	**18,01**	**0,59**	**0,72**	**2,58**	**3,10**	**21,00**	**16,39**	**0,68**	**2,03**
HIS	2,35	3,28	2,04	1,44	2,74	2,34	3,07	2,99	1,04	1,66
GLY	0,82	0,52	2,12	1,62	0,10	0,15	0,45	0,56	2,76	1,77
THR	2,95	2,04	3,66	2,51	1,42	1,52	1,69	1,58	2,64	3,17
ARG	1,49	2,00	2,19	1,30	1,16	0.84	3,37	4,16	2,80	3,01
ALA	**0,57**	**0,38**	**11,48**	**17,87**	**0,36**	**0,18**	**0,57**	**0,89**	**4,98**	**6,52**
TYR	0,22	0,26	0,43	0,65	0,39	0,33	0,40	0,39	0,52	0,88
MET	0,51	0,40	0,83	0,89	0,43	0,37	0,67	0,74	0,86	0,78
VAL	0,87	0,81	4,58	3,40	2,29	2,33	1,05	1,03	3,41	3,04
PHE	0,33	0,66	0,94	1,31	0,59	0,53	0,45	0,54	0,67	1,00
ILE	0,45	0,52	2,44	1,89	1,00	1,01	0,55	0,64	2,49	2,53
LEU	0,48	0,51	2,06	2,01	0,91	1,03	0,42	0,60	1,64	1,95
LYS	3,45	6,87	12,49	6,68	3,91	3,56	4,02	4,54	6,17	4,68
GABA	**1,02**	**0,85**	**11,49**	**4,93**	**1,01**	**0,17**	**1,00**	**1,20**	**11,32**	**5,30**
Outros	0,25	0,98	2,45	2,69	0,59	1,65	0,06	0,02	5,07	5,8
URE (µmol/mL)	7,79 b**	8,89 b	0,35 d	0,53 d	0,90 d	0,99 d	13,4 a	13,1a	0,54 d	2,52 c
ALT (µmol/mL)	4,71bc	3,45 d	2,20ef	1,64 f	4,43 c	2,71de	7,51a	5,51 b	2,71de	1,57f

*Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

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

4.8.2. Feijão-de-corda

As plantas de feijão-de-corda quando noduladas apresentaram no transporte da seiva do xilema altos níveis de URE e dentre a fração aminoacídica, elevada GLN seguida de ASN. As proporções de LYS e de VAL também foram relativamente altas quando comparadas aos outros aminoácidos. De forma inversa, plantas não noduladas, nutridas com NO_3^- apresentaram níveis elevados de ASN no xilema, seguidos de GLN (tabela 21).

A inundação das plantas noduladas provocou um decréscimo abrupto dos teores de URE para níveis próximos a zero. As reduções da proporção de GLN no xilema atingiram valores inferiores a 1 % . Em menor escala ocorreu um decréscimo do ASP seguido da ASN e da LYS. A ALA e o GABA se elevaram bruscamente com a inundação. Esses resultados foram comuns para as duas estirpes testadas, demonstrando que o efeito dos tratamentos sobre as alterações da composição aminoacídica não é determinado pela estirpe inoculada (tabela 21).

A aplicação de NO_3^- causou redução significativa do teor de ureídeos, aumento pronunciado na razão ASN/ASP e uma redução em menor proporção na GLN. Com essas alterações, a composição nitrogenada dessas plantas tornou-se equivalente à de plantas não noduladas (tabela 21).

Os teores de ALT transportados no xilema foram mais elevados nas plantas não noduladas. Não houve influência dos tratamentos sobre a concentração dos aminoácidos transportados no xilema para os diferentes sistemas utilizados (tabela 21).

4.8.3. Feijão

À semelhança do feijão-de-corda, plantas de feijão noduladas apresentaram altos níveis de GLN transportados no xilema, seguido de LYS e de ASN. A inundação das plantas reduziu sensivelmente os níveis de URE e dos aminoácidos GLN, ASN, ASP e LYS. O GABA aumentou drasticamente e ALA em menor escala (tabela 22).

A aplicação de NO_3^- provocou um aumento em ASN e decréscimo em GLN, tornando os níveis de ASN superiores aos de GLN, à semelhança de plantas não noduladas. Houve também uma redução sensível nas concentrações de URE. Os teores de LYS também decresceram, tornando-se próximos aos de plantas não noduladas, o que sugere ser este aminoácido uma importante fonte de transporte de N no xilema de plantas de feijão em simbiose com rizóbio (tabela 22).

O teor de ALT mostrou não sofrer influência com a inundação das plantas ou com a aplicação de NO_3^- (tabela 22).

Tabela 21. Composição aminoacídica (mol%), teor de ureídeos totais (URE) e teor de aminoácidos livres totais (ALT) de seiva de xilema de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.)] cv. Vita 07 cultivadas em vermiculita, inoculadas com *Bradyrhyzobium spp* estirpe USDA 3458 e estirpe 6002 (NOD); não inoculadas, nutridas com NO^-_3 (N/NOD); noduladas recebendo NO^-_3 15 mM (NOD c/N) durante quatro dias; noduladas inundadas durante dois dias (NOD/I) e não noduladas recebendo solução contendo NO^-_3 (5 mM) no início do período reprodutivo

	Vigna unguiculata - Tratamentos/Estirpe					
	NOD		NOD c/N	NOD/I		N/NOD
	Estirpe		Estirpe	Estirpe		
	USDA 3458	6002	USDA 3458	USDA 3458	6002	
ASP	**17,72**	**18,36**	**4,13**	**2,35**	**4,08**	**16,15**
GLU	**4,37**	**5,85**	**1,26**	**3,41**	**4,41**	**2,27**
ASN	**11,65**	**14,26**	**51,13**	**9,45**	**10,89**	**42,35**
SER	1,73	0,61	1,56	9,33	10,20	1,94
GLN	**32,14**	**24,20**	**12,47**	**0,82**	**0,92**	**10,59**
HIS	3,19	2,99	2,40	1,27	1,92	2,07
GLY	0,51	0,73	0,29	1,68	1,48	0,64
THR	2,75	2,74	2,78	3,31	4,16	2,66
ARG	2,28	2,45	3,62	0,90	1,65	4,21
ALA	**0,65**	**0,29**	**0,37**	**16,60**	**25,28**	**0.69**
TYR	0,62	0,47	0,74	1,75	1,73	0,74
MET	1,61	2,09	1,33	2,00	2,58	1,14
VAL	7,13	6,30	5,64	5,60	5,34	5,14
PHE	0,55	1,07	1,12	1,63	2,05	0,88
ILE	2,41	2,22	2,42	2,21	3,82	2,26
LEU	2,32	3,45	2,96	3,03	4,99	2,63
LYS	**7,43**	**11,41**	**5,22**	**4,72**	**5,87**	**3,00**
GABA	**0,93**	**0,49**	**0,21**	**29,08**	**8,22**	**0,24**
Outros	0,01	0,02	0,35	0,86	0,41	1,09
URE (µmol/mL)	6,49 a*	6,00 b	0,62 c	0,15 d	0,07 d	0,27 d
ALT (µmol/mL)	1,60 a	1,72 a	1,60 a	1,87 a	2,03 a	5,32 b

Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

*Médias seguidas de mesma letra, na linha , não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0.05$)

Tabela 22. Composição aminoacídica (mol%), teor de ureídeos totais (URE) e teor de aminoácidos livres totais (ALT) de seiva de xilema de feijão [*Phaseolus vulgaris* (L.)] cv. Carioca cultivado em vermiculita, inoculado com *Rhizobium spp* estirpe 4080 (NOD); não inoculado, nutrido com NO^-_3 (N/NOD); nodulado recebendo NO^-_3 15 mM (NOD c/N) durante quatro dias e nodulado inundado durante dois dias (NOD/I), no início do período reprodutivo

	Phaseolus vulgaris - Tratamentos			
	NOD	**N/NOD**	**NOD c/N**	**NOD/I**
ASP	**0,65**	**1,02**	**0,83**	**1,54**
GLU	**1,18**	**1,71**	**1,06**	**2,11**
ASN	**14,60**	**42,25**	**45,81**	**4,37**
SER	1,60	2,44	1,50	4,97
GLN	**37,03**	**4,35**	**10,21**	**2,93**
HIS	3,14	4,31	4,25	1,29
GLY	1,60	1,39	0,76	1,48
THR	2,56	4,39	3,58	4,45
ARG	5,37	6,02	4,82	2,49
ALA	**0.64**	**0,68**	**0,41**	**7,17**
TYR	0,80	1,44	1,09	0,90
MET	0,76	1,35	1,10	0,89
VAL	3,09	5,11	3,88	4,10
PHE	0,46	1,02	0,76	1,05
ILE	0,98	3,25	1,39	2,32
LEU	0,80	2,17	2,04	4,10
LYS	**21,00**	**12,23**	**13,03**	**5,03**
GABA	**2,49**	**4,12**	**1,82**	**45,01**
Outros	1,89	0,75	1,66	3,8

URE (µmol/mL)	7,20** a	0,64 c	1,33 b	0,15 c
ALT (µmol/mL)	1,53 b	2,56 a	1,60 b	2,19 ab

Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

*Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0.05$)

Nas tabelas 23, 24 e 25 são apresentados os dados referentes à composição de aminoácidos livres (Aas mol%), teor de ureídeos totais (URE) e de aminoácidos solúveis livres totais (ALT) transportados na seiva do xilema de leguminosas transportadoras de amidas – crotalária, ervilha e tremoço - fixando plenamente o N_2 e submetidas ao alagamento ou presença de NO_3^-.

4.8.4. Crotalária

Plantas noduladas de crotalária apresentaram níveis baixos de ureídeos transportados no xilema. Dentre os aminoácidos, a ASN seguida da GLN foram os presentes em maior proporção (mol %) no xilema. Curiosamente, plantas não noduladas apresentaram composição do N transportada no xilema equivalente à de plantas noduladas (tabela 23).

O tratamento com inundação causou reduções no teor de ureídeos, GLN, ASN e de ASP e aumentos de ALA e de GABA. De forma semelhante às demais leguminosas o tratamento com NO_3^- causou uma redução em GLN e ASP e aumento em ASN. O teor de ureídeos apesar de baixo, sofreu redução significativa (tabela 23).

Os ALT diminuiram consideravelmente nas plantas noduladas com a inundação e presença do NO_3^-. Os níveis bem mais elevado de ALT em relação ao de URE demonstram que essa espécie transporta preferencialmente as amidas ASN e GLN, em relação a URE (tabela 23).

Tabela 23. Composição aminoacídica (mol%), teor de ureídeos totais (URE) e teor de aminoácidos livres totais (ALT) de seiva de xilema de plantas de crotalária [*Crotalaria juncea* (L.)] cv. IAC-1 cultivadas em vermiculita, inoculadas com *Rhyzobium spp* (NOD); não inoculadas, nutridas com NO^-_3 (N/NOD); noduladas recebendo NO^-_3 15 mM (NOD c/N) durante quatro dias e noduladas inundadas durante dois dias (NOD/I) no início do período reprodutivo

	Crotalaria juncea - Tratamentos			
	NOD	**N/NOD**	**NOD c/N**	**NOD/I**
ASP	**15,02**	**6,17**	**5,30**	**4,62**
GLU	**2,30**	**2,89**	**1,22**	**4,05**
ASN	**58,74**	**54,87**	**74,89**	**23,34**
SER	0,18	0,53	0,21	5,80
GLN	**15,14**	**12,91**	**7,32**	**2,11**
HIS	1,25	3,07	0,74	7,00
GLY	0,11	0,22	0,13	1,09
THR	0.45	2,60	0,89	3,31
ARG	0,26	0,59	0,30	0,98
ALA	**0,15**	**0,28**	**0,17**	**7,45**
TYR	0,13	0,28	0,18	0,79
MET	0,14	0,26	0,17	0,39
VAL	0,61	1,94	1,16	5,34
PHE	0,08	0,32	0,22	0.79
ILE	0,21	0,86	0,37	1,91
LEU	0,13	0,54	0,30	1,06
LYS	0,70	2,01	1,07	3,37
GABA	**0,28**	**0,43**	**0,29**	**5,80**
Outros	4,57	9,23	5,07	21,59

URE (µmol/mL)	0,17 a	0,13 b	0,025 c	0,030 c
ALT (µmol/mL)	10,77 a	10,67 a	2,30 b	1,50 b

Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0.05$)

4.8.5. Ervilha

Plantas noduladas de ervilha transportaram preferencialmente ASN seguida de GLN na seiva do xilema. Apresentaram também proporções significativamente elevadas de homoserina. Plantas não noduladas assimilando NO_3^-, apresentaram teores relativamente altos de ASN e de GLN e por outro lado níveis de homoserina bem superiores aos encontrados no xilema de plantas noduladas (tabela 24).

A inundação das plantas noduladas causaram um decréscimo acentuado nos teores de GLN e de ASN e um aumento em ASP, GABA, ALA e em homoserina e um decréscimo de ALT (figura 24).

Ao contrário do tratamento com inundação, a aplicação de NO_3^- não ocasionou um decréscimo considerável do nível de GLN. O nível de ASN manteve-se inalterado. A proporção de homoserina aumentou com o tratamento, sugerindo que o transporte desse aminoácido pode estar relacionado com a assimilação de NO_3^- (tabela 24).

As plantas noduladas apresentaram alta concentração de ALT transportados no xilema. O tratamento com inundação provocou um decréscimo abrupto no transporte de ALT, e em bem menor escala, uma diminuição no tratamento com NO_3^-. Isso denota um prejuízo no processo de fixação de N_2 já que em ervilha são os aminoácidos, especialmente ASN e GLN, os produtos da assimilação do N fixado (tabela 24).

Tabela 24. Composição aminoacídica (mol%) e teor de aminoácidos totais de seiva de xilema (ALT) de plantas de ervilha [*Pisum sativum* (L.)] cv. Samba cultivadas em vermiculita, inoculadas com *Rhizobium* estirpe USDA 2380 (NOD); não inoculadas, nutridas com NO^-_3 (N/NOD); noduladas recebendo NO^-_3 15 mM durante quatro dias (NOD c/N) e noduladas inundadas durante 48 h (NOD/I), no início do período reprodutivo

	Pisum sativum - Tratamentos			
	NOD	**NOD c/N**	**N/NOD**	**NOD/I**
ASP	**15,74**	**12,91**	**5,90**	**27,30**
GLU	**0,26**	**0,10**	**0,10**	**1,20**
ASN	**52,03**	**51,52**	**39,83**	**5,85**
SER	0,29	0,29	0,26	2,92
GLN	**15,36**	**13,11**	**11,56**	**1,71**
HIS	0,36	0,39	0,44	1,00
GLY	0,04	0,02	0,03	0,53
THR	0,73	0,92	1,50	4,05
ARG	0,63	0,75	0,50	1,68
ALA	**0,11**	**0,04**	**0,05**	**2,97**
TYR	0,21	0,04	0,12	0,40
MET	0,38	0,11	0,11	0,16
VAL	0,62	1,08	1,13	3,83
PHE	0,13	0,12	0,08	0,41
ILE	0,53	0,62	0,53	2,79
LEU	0,34	0,40	0,41	1,93
LYS	0,64	0,61	0,27	4,49
GABA	**0,16**	**0,68**	**0,27**	**17,09**
Homoserina	**10,23**	**16,31**	**34,37**	**18,21**
Outros	1,21	0,02	2,54	1,48
ALT (µmol/mL)	30,42 a*	27,41 b	26,17 b	3,76 c

Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

*Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0.05$)

4.8.6. Tremoço

Plantas de tremoço em associação simbiótica com rizóbio mostraram uma proporção alta de ASN transportada no xilema, seguida de ASP, GLN e GLU (tabela 25).

A inundação do sistema radicular das plantas noduladas provocou uma diminuição em GLN e em ASN e de ASP em menor escala. O GABA apresentou um aumento brusco, seguido de ALA (tabela 25).

A aplicação de NO_3^- não causou alterações significativas nas proporções dos aminoácidos transportados no xilema das plantas noduladas. Ocorreu uma pequena diminuição de GLN e de ASN, e um aumento de ASP. Essas alterações, apesar de não terem sido grandes, indicam uma interferência sobre o processo de assimilação de N_2. É possível que no período em que se processou a coleta de seiva, estivesse ocorrendo uma fase de adaptação: uma transição entre a queda do processo de fixação e o aumento da assimilação do nitrato absorvido. A queda acentuada no transporte de ALT nos tratamentos com NO_3^- à semelhança do tratamento com inundação das plantas, reforçam essa hipótese. Plantas dos controles assimilando N_2 ou NO_3^-apresentaram altos níveis de ALT transportados no xilema (tabela 25).

A composição aminoacídica do xilema na cultivar de tremoço utilizada neste trabalho mostrou similaridade à observada por Parsons & Baker (1996). Nesse trabalho, plantas submetidas ao fluxo de 100 % de oxigênio no sistema radicular durante uma semana, apresentaram inativação da nitrogenase e uma diminuição superior a 50 % no teor de ASN. Já em plantas submetidas ao NO_3^- houve um aumento substancial de ASN. Em ambos os casos ocorreu uma pequena redução do teor de GLN. A grande resposta do NO_3^- nesse caso pode estar relacionada ao maior tempo de exposição, duas semanas antes da coleta. Por outro lado, o GABA presente em concentração relativamente alta no controle, mostrou acréscimo no tratamento de inativação da nitrogenase e um certo decréscimo no tratamento com NO_3^-.

Parsons & Baker (1996) em experimentos com isótopos de ^{15}N verificaram que o N_2 recém fixado foi assimilado nas amidas GLN e ASN, entre outros aminoácidos em plantas de tremoço. A GLN recém sintetizada foi transportada no xilema em proporção bem superior à ASN. Observaram também que a ASN presente no xilema correspondeu a uma pequena parte do "pool" presente nos nódulos. Isso poderia justificar pelo menos em parte a maior redução do nível de GLN comparado à ASN no tratamento com inundação em nosso experimento.

Tabela 25. Composição aminoacídica (mol %) e teor de aminoácidos livres totais (ALT) de seiva de xilema de plantas de tremoço [*Lupinus albus (L.)*] cultivada em vermiculita, inoculada com *Bradyrhizobium* estirpe 938 (NOD); não inoculada, nutrida com NO^-_3 (N/NOD); nodulada recebendo NO^-_3 15 mM (NOD c/N) durante quatro dias e nodulada inundada durante dois dias (NOD/I), no início do período reprodutivo

	Lupinus albus – Tratamentos			
	NOD	**N/NOD**	**NOD c/N**	**NOD/I**
ASP	**19,07**	**5,26**	**25,82**	**12,66**
GLU	**7,10**	**4,59**	**5,00**	**6,96**
ASN	**53,65**	**58,90**	**45,71**	**24,07**
SER	0,53	1,71	2,48	4,79
GLN	**13,00**	**8,47**	**9,47**	**2,79**
HIS	0,20	1,28	0,51	1,12
GLY	0,52	0,47	0,22	1,32
THR	0,52	2,78	1,48	1,32
ARG	0,21	0,45	0,17	2,78
ALA	**0,45**	**0,80**	**1,27**	**4,28**
TYR	0,15	0,62	0,29	0,58
MET	0,11	0,84	0,19	0,10
VAL	1,32	5,20	1,88	6,04
PHE	0,29	0,81	0,52	0,73
ILE	0,57	2,29	0,85	2,78
LEU	0,25	0,93	0,41	0,97
LYS	0,59	1,62	0,84	1,98
GABA	**1,18**	**2,07**	**1,66**	**22,36**
Outros	0,29	0,91	1,23	2,37
ALT (µmol/mL)	15,72 a	15,73 a	4,57 b	1,11 b

Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.
*Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0.05$)

4.8.7. Discussão geral

Plantas fixando N_2, quanto à composição na seiva do xilema, podem ser classificadas como exportadoras de amida – ASN, GLN e 4-metilenoglutamina – ou exportadoras de ureídeos – alantoína, ácido alantóico e citrulina (Schubert, 1986).

Espécies tropicais como a soja, quando fixando N_2, têm como principal constituinte exportado no xilema os ureídeos ácido alantóico e alantoína (Streeter, 1972, 1979; McClure & Israel, 1979; Pate, 1980; Rainbird *et al.*, 1983), seguido da ASN (Streeter, 1979) e proporções relativamente altas de GLN (Puiatti & Sodek, 1999). Comparados às amidas, os URE são menos solúveis em água e mostram um decréscimo de solubilidade com a diminuição da temperatura (Sprent, 1981). Como moléculas de transporte, os URE são mais adequados às leguminosas de trópicos quentes, onde as temperaturas relativamente mais altas promovem um aumento da absorção de água e maior solubilidade desses compostos para o transporte interno (Dakora, 2000).

A composição nitrogenada transportada na seiva do xilema determinada nesse experimento, confirmam a soja, o feijão-de-corda e o feijão como espécies transportadoras de ureídeos, transporte característico de membros da tribo Phaseoleae (Pate *et al.*, 1980, Sprent, 1981). A composição nitrogenada determinada na seiva de xilema de tremoço e da ervilha as enquadram como transportadores de amidas conforme já observado por Atkins (1987) e Pate *et al.* (1981). A crotalária no entanto, apesar de originária de clima tropical, apresentou as amidas ASN e GLN como principais produtos de transporte no xilema (tabelas 20, 21, 22, 23, 24 e 25).

As diferenças encontradas na composição de solutos nitrogenados provenientes do N fixado em leguminosas que produzem ureídeos ou amidas, refletem mudanças na expressão dos genes que codificam as enzimas das vias de biossíntese desses compostos (Dakora, 2000). Leguminosas que produzem amidas mostram atividades mais baixas das enzimas envolvidas

com a biossíntese de ureídeos do que as leguminosas que produzem ureídeos (Reynolds *et al.*, 1982a). As diferenças de atividades entre as enzimas indicam que os genes que controlam a síntese dessas proteínas estão presentes e funcionalmente expressos em ambos sistemas simbióticos, não existindo nenhuma diferença enzimática básica para os dois tipos característicos de composição de N translocado no xilema das espécies de leguminosas (Dakora, 2000).

A queda de GLN juntamente com o teor de URE transportados na seiva do xilema, nas espécies transportadoras de ureídeos, ou de GLN nas espécies transportadoras de amidas, independentemente do aumento da ASN nos tratamentos com NO_3^- ou de sua queda nos tratamentos com inundação, sugere ser GLN do xilema um sinalizador da fixação do N_2, a qual tem sua síntese diminuída em qualquer situação de estresse no processo de fixação simbiótica de N_2 (tabelas 20, 21, 22, 23, 24, 25).

Os decréscimos em GLN no xilema sempre foram mais acentuados nos tratamentos com inundação, em todas as espécies estudadas, o que possivelmente esteve associado ao maior efeito desse tratamento sobre a difusão do O_2 para o interior dos nódulos, causando uma queda mais imediata da fixação de N_2 e da atividade metabólica do nódulo como um todo.

A fixação simbiótica do N_2 depende da nitrogenase, enzima sensível ao O_2, localizada no interior do bacteróide. Entretanto, a nitrogenase requer um grande suprimento de ATP gerado através da fosforilação oxidativa. Por esta razão, o O_2 que a planta provê à bactéria, é fornecido por meio de um fluxo rápido, mas em baixa concentração. A planta mantém então um controle fisiológico sobre a permeabilidade do nódulo à difusão do O_2 (Hunt & Layzell, 1993). Em conseqüência, existe um gradiente abrupto de concentração de O_2 entre o córtex e os tecidos centrais de nódulos de leguminosas (Witty *et al.*, 1986). A concentração de O_2 nas células infectadas - 10 - 50 nM - (Kuzma *et al.*, 1993) é cerca de 10^{-4}

daquela da superfície do nódulo, 250 μM. Apesar dos gradientes da leg-hemoglobina oxigenada exercerem um controle fino sobre a concentração de O_2 na célula infectada (Thumfort *et al.*, 1999), uma barreira física à difusão de gases no córtex interno parece ser o sítio primário de regulação da permeabilidade do nódulo à difusão de gases (Hunt & Layzell, 1993).

A permeabilidade do nódulo ao O_2 é controlada por dois mecanismos distintos: adaptações de longos períodos, ligadas ao desenvolvimento, como mudanças do número de células do córtex interno, e mecanismos fisiológicos de curto período, permitindo ajustes rápidos a mudanças em O_2 e outros parâmetros ambientais (Hunt & Layzell, 1993). Os mecanismos responsáveis pelo controle de difusão do O_2 por curtos períodos, são pouco entendidos. A maioria provavelmente envolve mudanças na composição gás-líquido na rota que o O_2, e outros gases percorrem ao se difundirem para o interior ou para fora dos nódulos (Wycoff *et al.*, 1998).

Apesar das reduções significativas de GLN no xilema da maioria das espécies submetidas ao NO_3^-, o menor impacto desse tratamento em relação à inundação, pode ser devido ao maior tempo exigido para uma resposta mais intensa ao estresse, relacionado talvez à absorção e metabolização do NO_3^-. O metabolismo diferenciado entre as diferentes espécies, especialmente as espécies de clima temperado, pode ser outro fator influenciando na reposta., visto que tremoço e ervilha não nodulados também transportaram níveis relativamente altos de GLN em relação à ASN. Ou seja, a resposta menos intensa de GLN em função do NO_3^- é resultado da produção de GLN pela assimilação do nitrato em substituição à fixação de N_2.

Por outro lado, Atkins *et al.* (1979) consideraram que pela razão de leguminosas produtoras de amidas transportarem o N fixado principalmente como ASN e GLN no fluxo do xilema, a composição do xilema não muda apreciavelmente com a fonte de N, seja o N_2, NO_3^-, NH_4^+ ou uréia. No entanto, as leguminosas que transportaram ureídeos em maior proporção na

seiva do xilema, apresentaram uma substituição do alto teor de URE por um aumento em ASN, mesmo quando a espécie nodulada apresentava teores de GLN maiores em relação à ASN, como o feijão e o feijão-de-corda. Os resultados podem ser apoiados nas observações de outros trabalhos que consideraram que o suprimento de NO_3^- à leguminosa reduz a atividade da nitrogenase e as proporções de NO_3^-/ureídeo e ASN/GLN aumentam com o aumento da concentração de NO_3^- (Atkins *et al*, 1980a, Pate *et al*, 1980, Dakora *et al.*, 1992; Drevon *et al.*, 1988a, Eaglesham, 1989; Streeter, 1988).

As formas de N transportadas na seiva do xilema de leguminosas produtoras de ureídeos e amidas são no entanto muito similares se dependentes exclusivamente de N combinado como o NO_3^-, porém diferentes se dependentes da fixação simbiótica de N_2 (Dakora, 2000).

A ALA e o GABA aumentaram grandemente em todas as espécies com o tratamento de inundação. No entanto, nas espécies em que o aumento de GABA foi muito expressivo, o aumento de ALA foi proporcionalmente menor, como feijão, ervilha e tremoço, o que sugere uma adaptação metabólica diferenciada nessas espécies sob condições de hipoxia. Por outro lado, as quedas de ASN e ASP com o tratamento de inundação, podem ser justificadas pelo menos em parte pelo aumento de ALA e GABA, pois nesse caso, ASN e ASP poderiam ser fontes de C e N para biossíntese desses aminoácidos.

ALA é considerada o terceiro maior produto da fermentação em plantas (Smith & ap Rees, 1979; Reggiani *et al.*, 1988) provavelmente como uma estratégia para evitar a perda de C via etanol durante o processo fermentativo (Good & Crosby, 1989). Os carbonos de ALA são derivados do piruvato (Smith & ap Rees, 1979), como são os dos outros produtos principais da fermentação, etanol e lactato.

Segundo Reggiani *et al.* (1988) o aumento nos teores de ALA se deve à interconversão entre os aminoácidos livres. O sistema GS/GOGAT exerce importante função

no acúmulo de aminoácidos livres, especialmente ALA e GABA, através de seu envolvimento na síntese de GLU (Reggiani *et al.*, 1993; 2000). O grupamento amino de ALA pode ser doado por transaminação, indiretamente com ASP, via ASPAT (Streeter & Thompson, 1972 a,b; Vanlerberghe *et al.*, 1990; 1991) e, diretamente com GLU (Smith & ap Rees, 1979; Reggiani *et al.*, 1988), através da enzima alanina aminotransferase (Good & Crosby, 1989). Outras possíveis fontes de ALA são a β-descarboxilação do ASP, a aminação redutiva do PYR (Vanlerberghe *et al.*, 1991) e a proteólise (Reggiani *et al.*, 1988).

Os nódulos de leguminosas acumulam relativamente altas concentrações de GABA (Vance & Heickel, 1991), podendo atingir níveis superiores a 20 % do N total do órgão em algumas espécies (Larher *et al.*, 1983). Em nódulos foram atribuídas duas funções exercidas pelo GABA: a síntese do GABA pode servir como rota alternativa para a biossíntese de succinato como resultado da limitação de α-cetoglutarato desidrogenase (Day & Copeland, 1991; Vance & Heichel, 1991). Outra possibilidade refere-se ao envolvimento do GABA na regulação do pH citoplasmático, sob condições de microanaerobiose ou de anaerobiose (Streeter & Thompson, 1972b; Roberts *et al.*, 1992), isto porque durante a sua síntese através da descarboxilação de GLU, ocorre o consumo de próton (Bown & Shelp, 1997, Serraj *et al.*, 1998). Outra evidência é o aumento da atividade da enzima responsável pela sua síntese, glutamato descarboxilase (GAD) sob baixos valores de pH (Cholewa *et al.*, 1997). A conversão de GLU em GABA é aumentada sob condições que inibem a síntese de GLN ou condições de síntese protéica reduzida ou aumento da degradação proteica (Shelp *et al.*, 1999).

Ao se determinar a possível influência da estirpe ou da cultivar de leguminosa, sobre os efeitos dos tratamentos com inundação e com NO_3^-, não foi verificada nenhuma alteração expressiva para as combinações entre as cultivares de soja, IAC-17 e Mapple Arrow, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe 463) e *Rhizobium* spp (estirpe 6) (tabela 20)

ou plantas de feijão-de-corda cv. Vita 7 inoculadas com *Bradyrhizobium* spp estirpes USDA 3458 e 6002 (tabela 21). Em todos os sistemas simbióticos houve um decréscimo abrupto do teor de GLN e de URE após inundação do sistema radicular ou aplicação do NO_3^-. O aumento em ASN foi comum nas associações que receberam NO_3^- e os aumentos em ALA e GABA no tratamento com inundação.

McClure *et al.* (1980) avaliando o conteúdo de ureídeos na seiva de xilema de soja nodulada, não observaram interferência de cultivares e/ou de estirpes de rizóbio sobre o conteúdo relativo de ureídeos transportados no xilema. As variações encontradas sobre as proporções de N-ureídeo e N-total no xilema não mostraram ser influenciadas significativamente pela cultivar estudada.

Hungria & Neves (1987) estudaram o efeito de duas estirpes de *Rhizobium* e a interação com duas cultivares de feijão. As estirpes de rizóbio influenciaram significativamente a nodulação, taxas de acumulação de N, partição de N na parte aérea e remobilização do N nos órgãos vegetativos para as sementes. A simbiose mais eficiente em comparação com a menos eficiente mostrou taxas mais altas de redução de acetileno, menor evolução de hidrogênio dos nódulos e taxas mais altas de transporte de N. A composição do N transportado no xilema foi influenciada pela estirpe e cultivar de feijão. A associação mais eficiente mostrou uma concentração mais alta de N-ureídeos e menores taxas de transporte de aminoácidos. Nenhuma diferença foi encontrada nas concentrações de N-amida e N-amônio.

Os resultados obtidos sugerem a existência de uma composição nitrogenada característica de transporte de sistema simbiótico eficiente para cada espécie de leguminosa. As alterações características nessa composição em função de fatores que interferem na fixação e assimilação de N_2 (inundação, nitrato) não são influenciadas pela estirpe de bactéria ou cultivar de leguminosa.

5. CONCLUSÕES

A redução e a elevação dos níveis de GLN no xilema, em soja nodulada, durante permanência das plantas em hidroponia com e sem NO_3^- e após transferência para vermiculita sem N, estão relacionadas com a deficiência e recuperação do processo de fixação do nitrogênio, respectivamente.

A contribuição do floema para o transporte de GLN no xilema não é significatica, comparada com o nódulo.

A atividade da NADH-GOGAT em nódulos reflete em grande parte os níveis de GLN transportados na seiva do xilema.

A presença de GLN na seiva do xilema está estritamente associada com o desenvolvimento e atividade metabólica do nódulo.

O nível de GLN transportado no xilema está relacionado com a eficiência da fixação simbiótica de N_2 em todas as espécies que a transportam.

6. LITERATURA CITADA

Alcantar-Gonzales, G., Moyse, A., Bismuth, E. & Champigny, M.L., 1990. Effect of nitrate on acetylene reduction and the activities of some enzymes of nitrogen and carbon metabolism, involved in nitrogen fixaion in the root nodules of soybean. Agronomie. 10:847-855.

Appels, M. & Haaker, H., 1991. Glutamate oxaloacetate transaminase in pea root nodules – participation in a malate/aspartate shuttle between plant and bacteroid. Plant Physiol. 95: 740-747.

Appleby, C.A., 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 35:443-478.

Arrese-Igor, C., Minchin, F.R., Gordon, A.J. & Nath, A.K., 1997. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. J.Exp.Bot. 48:905-913.

Atkins, C.A., 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. Plant Soil. 100:157-168.

Atkins, C.A., 1991 Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: Biology and Biochemistry of Nitrogen fixation (M. Dilworth & A. Glenn, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp.293-319.

Atkins, C. & Beevers, L., 1990. Synthesis, transport and utilization of translocated solutes of nitrogen. In: Nitrogen in Higher Plants (Y.P. Abrol, ed.), Research Studies Press Ltd, Tauton-Sommerset, England, pp. 223-295.

Atkins, C.A., Pate, J.S. & Layzell, D.B., 1979. Assimilation and transport of N in non-nodulated (NO_3^--grown) L*upinus albus* L. Plant Physiol. 64:1078-1082.

Atkins, C.A., Pate, J.S., Griffiths, G.J., White, S.T., 1980a. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO_3^--grown) cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Plant Physiol. 66:978-983.

Atkins, C.A., Rainbird, R.M. & Pate, J.S., 1980b. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N_2-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Z. Pflanzenphysiol. 97:249-260.

Atkins, C.A., Ritchie, A., Rowe, P.B., McCairns, E. & Sauer, D., 1982. *De novo* purine synthesis in nitrogen fixation nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.). Plant Physiol. 70:55-60.

Atkins, C.A., Pate, J.S. & Shelp, B.J., 1984a. Effects of short-term N_2 deficiency on N metabolism in legume nodules. Plant Physiol. 76:705-710.

Atkins, C.A., Shelp, B.J., Kuo, J., Peoples, M.B. & Pate, J.S., 1984b. Nitrogen nutrition and the development and senescence of nodules on cowpea seedlings. Planta. 162:316-326.

Atkins, C.A., Shelp, B.J., Storer, P.J. & Pate, J.S., 1984c. Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. Planta. 162:327-333.

Atkins, C.A., Sanford, P.J., Storer, P.J. & Pate, J.S., 1988a. Inhibition of nodule functioning in cowpea by a xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol. Plant Physiol. 88:1229-1234.

Atkins, C.A., Storer, P.J. & Pate, J.S., 1988b. Pathway of nitrogen assimilation in cowpea nodules studied $^{15}N_2$ and allopurinol. Plant Physiol. 86:204-207.

Atkins, C.A., Pate, J.S., Standford, P.J., Dakora, F.D. & Matthews, I., 1989. Nitrogen nutrition of nodules in relation to "N-hunger" in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiology. 90: 1644-1649.

Atkins, C.A., Smith, P.M.C. & Storer, P.J., 1997. Re-examination of the intracellular localization of *de novo* purine synthesis in cowpea nodules. Plant Physiol. 113:127-135.

Awonaike, K.O., Lea, P.J. & Miflin, B.J., 1981. The location of the enzymes of ammonia assimilation in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Sci. Lett., 23:189-195.

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.

Balestrasse, K.B.; Gardey, L.; Gallego, S.M. & Tomaro, M.L., 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. Aust. J. Plant Physiol. 28:497-504, 2001.

Becana, M. & Klucas, R.V., 1992. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8958-8962.

Becana, M. & Sprent, J.I., 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. Physiol. Plant. 70:757-765.

Becana, M. & Sprent, J.I., 1989. Effect of nitrate on components of nodule leghaemoglobins. J. Exp. Bot. 216:725-731.

Becana, M., Aparicio-Tejo, P.M. & Sanchez-Diaz, M., 1984. Root nodule enzymes of ammonia metabolism from *Medicago sativa* L. as influenced by nitrate levels. J. Plant Physiol. 116:285-292.

Becana, M., Minchin, F.R. & Sprent, J.I., 1989. Short-term inhibition of legume N_2 fixation by nitrate. Nitrate effects on nitrate-reductase activities of bacteroids ans nodule cytosol. Planta. 180, 40-45.

Benson, JR. & Hare, P.E., 1975. - *O*-phthaladehyde fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 619-629.

Bergersen, F.J., 1965. Ammonia - an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci. 18:1-9.

Bergersen, F.J., 1971. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 22:121-140.

Bergersen, F.J., 1997a. Physiological and biochemical aspects of nitrogen fixation by bacteroids of soybean nodule cells. Soil Biol. Biochem. 29:875-880.

Bergersen, F.J., 1997b. Regulation of nitrogen fixation in infected cells of leguminous root nodules in relation to O_2 supply. Plant Soil. 191:189-203.

Bergersen, F.J. & Turner, G.L., 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodule. Biochim. Byophys. Acta. 141:507-515.

Bieleski, R.L. & Turner, N., 1966. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer eletrophoresis and chromatography. Anal. Biochem. 17:278-293.

Blumwald, E., Fortin, M.G., Rea, P.A., Verma, D.P.S. & Poole, R.J., 1985. Presence of host-plasma membrane type H^+-ATPase in the membrane evelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. Plant Physiol. 78:655-672.

Boland, M.J. & Schubert, K.R., 1983. Biosynthesis of purines by a proplastid fraction from soybean nodules. Arch. Biochem. Biophys. 220:179-187.

Boland, M.J., Hanks, J.F., Reynolds, P.H.S., Blevins, D.G., Tolbert, N.E. & Schubert. K.R., 1982. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. Planta. 155:45-51.

Bown, A.W. & Shelp, B.J., 1997. The metabolism and functions of γ-aminobutyric acid. Plant Physiol. 115:1-5.

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.

Cataldo, D. A.; Haroon, M.; Schrader, L.E. & Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Science and Plant Analysis. 6:71-80

Chen, F.-L. & Cullimore, J.V., 1988. Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 88: 1411-1417.

Chen, F-L. & Cullimore, J.V., 1989. Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Planta. 179:441-447.

Cholewa, E., Cholewinski, A.J., Shelp, B.J., Snedden, W.A. & Bown, A.W., 1997. Cold shock-stimulated γ-aminobutyric acid synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca^{2+}, not by an increase in cytosolic H^{+}. Can. J. Bot. 75:375-382.

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.

Crafts-Brandner, S.J. & Harper, J.E., 1982. Nitrate reduction by roots of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) seedlings. Plant Physiol. 69:1298-1303.

Crawford, L.A., Bown, A.W., Breitkreuz, K.E. & Guinel, F.C., 1994. The synthesis of γ-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. Plant Physiol. 104:865-871.

Crawford, N.M., Kahn, M.L., Leustek, T. & Long, S.R., 2000. Nitrogen and Sulfur. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. 786-849.

Cullimore, J.V. & Bennet, M.J., 1988. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. J. Plant Physiol. 132: 353-362.

Cullimore, J.V.; Lara, M.; Lea, P.J. & Miflin, B.J., 1982. Multiple forms of glutamine synthetase in the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. Israel J. Bot. 31: 155-162.

Cullimore, J.V.; Lara, M.; Lea, P.J. & Miflin, B.J., 1983. Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. Planta. 157:245-253.

Curioni, P.M.G., Hartwig, U.A., Nösberger, J. & Schuller, K.A., 1999. Glycolytic flux is adjusted to nitrogenase activity in nodules of detopped and argon-treated alfafa plants. Plant Physiol. 119:445-453.

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.

Dakora, F.D. & Atkins, C.A., 1990. Effect of pO_2 during growth on the gaseous diffusional properties of nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiol. 93:956-961.

Dakora, F.D., Atkins, C.A. & Pate, J.S., 1992. Effect of NO_3^- on N_2 fixation and nitrogenous solutes of xylem in two nodulated West African geocarpic legumes, Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) and Bambara groundnut (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Plant and Soil. 140:255-262.

Day, D.A. & Copeland, L., 1991. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. Plant Phyiol. Biochem. 29:185-201.

Day, D.A.; Poole, P.S.; Tyerman, S.D. & Rosendahl, L., 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. Cell. Mol. Life Sci. 58:61-71.

De Lorenzo, C., Iannetta, P.P.M., Fernández-Pascual, M., James, E.K., Lucas, M.M., Sprent, J.I., Witty, J.F., Minchin, F.R. & De Felipe, M.R., 1993. Oxygen diffusion in lupine nodules. II Mechanisms of diffusion barrier operation. J. Exp. Bot. 44:1469-1474.

Delrot, S., Rochat, C., Tegeder, M. & Frommer, W., 2001. Amino acid transport. In: Plant Nitrogen. (P.J. Lea & Jean-F.Morot-G, eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp. 213-235.

Denison, R.F. & Harter, B., 1995. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. Plant Physiol. 107:1355-1364.

Denison, R.F. & Kinraide, T.B., 1995. Oxygen-induced membrane depolarization in legume root nodules: possible evidence for an osmoelectrical mechanism controlling gas permeability. Plant Physiol. 108:235-240.

Diaz del Castillo, L.; Hunt, S. & Layzell, D.B., 1992. O_2 regulation and O_2-limitation of nitrogenase activity in root nodules of pea and lupin. Physiol. Plant. 86:269-278.

Diaz del Castillo, L. & Layzell, D.B., 1995. Drought stress, permeability to O_2 diffusion and the respiratory kinetics of soybean root nodules. Plant Physiol. 107:1187-1194.

Diaz del Castillo, L.; Hunt, S. & Layzell, D.B., 1994. The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. Plant Physiol. 106:1187-1194.

Dobereiner, J., 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biol.Biochem. 29:771-774.

Drevon, J.J., Heckmann, M.O., Soussana, J.F. & Salsac, L. 1988a. Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-*Rhizobium* symbiosis. Plant Physiol. Biochem. 26:197-203.

Drevon, J.J., Kalia, V.C., Heckmann, M.O. & Pedelahore, P., 1988b. *In situ* open-flow assay of acetylene recuction activity by soybean root nodules: influence of acetylene and oxygen. Plant Physiol. Biochem. 26:73-78.

Eaglesham, A.R.J., 1989. Nitrate inhibition of root-nodule symbiosis in doubly rooted soybean plants. Crop. Sci. 29:115-119.

Edwards, S., Nguyen, Bich.-T., Do, B. & Roberts, J.K.M., 1998. Contribution of malic enzyme, pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxilase, and the Krebs cycle to respiration and biosynthesis and to intracellular pH regulation during hypoxia in maize root tips observed by nuclear magnetic resonance imaging and gas chromatography-mass spectrometry. Plant Physiol. 116:1073-1081.

Egli, M.A., Griffith, S.M., Miller, S.S., Anderson, M.A. & Vance, C.P., 1989. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfafa nodules. Plant Physiol. 91:898-904.

Escuredo, P.R., Minchin, F.R., Gogorcena, Y., Yturbe-Ormaetxe, I., Klucas, R.V. & Becana, M., 1996. Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. Plant Physiol. 110:1187-1195.

Fan, T.W.-M., Higashi, R.M. & Lane, A.N., 1988. An in vivo ^{1}H and ^{31}P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. Arch. Biochem. Biophys. 266:592-606.

Fan, T.W.-M., Higashi, R.M., Frenkiel, T.A. & Lane, A.N., 1997. Anaerobic nitrate ans ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. J.Exp.Bot. 48:1655-1666.

Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T. & Pennington, J.S., 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. Crop. Sci. 11:929-931.

Ferguson, A. R. & Sims, A. P., 1971. Inactivation *in vivo* of glutamine synthetase and NAD-specific glutamate dehydrogenase: Its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. J. Gen. Microbiol. 69:423-427.

Franco, A.A. & Muns. D.N. , 1982. Nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. Plant Soil. 66:149-160.

Fujihara, S. & Yamaguchi, M., 1980. Asparagine formation in soybena nodules. Plant Physiol. 66:139-141.

Gessler, A., Schultze, M., Schrempp, S. & Rennenberg, H, 1998. Interaction of phloem-translocated amino compounds with nitrate net uptake by the roots of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings. J. Exp. Bot. 49:1529-1537.

Godber, I.M. & Parsons, R., 1998. Translocation of amino acids from stem nodules of *Sesbania rostrata* demonstrated by GC-MS in planta ^{15}N isotope diluition. Plant Cell Environ. 21:1089-1099.

Gomes, F.P., 1990. Curso de Estatística Experimental. 13ª edição, Livraria Nobel, Piracicaba, 467p.

Good, A.G. & Crosby, W.L., 1989. Anaerobic induction of alanine aminotranferase in barley root tissue. Plant Physiol. 90:1305-1309.

Gordon, A.J., Lea, P.J., Rosenbeg, C. & Trinchant, Jean-C., 2001. Nodule formation and function. In: Plant Nitrogen. (P.J. Lea & Jean-F.Morot-G, eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.101-146.

Granato, T.C. & Harper, C.D., 1989. Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. J. Exp. Bot. 40:263-275.

Gregerson, R.G., Miller, S.S., Twary, S.N., Gantt, J.S. & Vance, C.P., 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfafa nodules. Plant Cell. 5:215-226.

Groat, G.R. & Vance, C.P., 1981. Root and nodules enzymes of ammonia assimilation in alfafa (*medicago sativa* L.). Plant Physiol. 67:1198-1205.

Guash, L.M., Felipe, M.R. & Fernández-Pascual, M., 2001. Effects of different O_2 concentrations on nitrogenase activity, respiration, and O_2 diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. J. Plant Physiol. 158:1395-1402.

Hanks, J.F., Tolbert, N.E. & Schubert, K.R., 1981. Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. Plant Physiol. 68:65-69.

Hans, J.F., Schubert, K. & Tolbert, N.E., 1983. Isolation and characterization of infected and uninfected cells from soybean nodules. Role of uninfected cells in ureide synthesis. Plant Physiol. 71:869-873.

Harper, J.E., 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* L. Merr.). Plant Physiol. 49:146-154.

Harris, S. & Silvester, W., 1994. Acetylene- and argon-induced declines in nitrogenase activity in *Corlaria arborea*. Soil Biol. Biochem. 26: 641-648.

Heckmann, M.O. & Drevon, J.J., 1987. Nitrate metabolism in soybean root-nodules. Physiol. Plant. 69:21-725.

Herridge, D.F., 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. Plant Physiol. 70:1-6.

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.

Herridge, D.F., Bergersen, F.J. & Peoples, M.B., 1990. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ^{15}N abundance methods. Plant Physiol. 93:708-716.

Hiscox, J.D. & Israelstam, G.F., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57:1332-1334.

Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1938. The water culture method of growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station, Bull. 347, 1-39.

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 nodules. Plant Sci., 42:9-17

Hungria, M. & Neves, M.C.P., 1987. Cultivar and Rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. Plant and Soil. 103:111-121.

Hungria, M.; Barradas, C.A.A.; Wallsgrove, R.M. Nitrogen fixation, 1991. Assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. J. Exp. Bot., 42:839-844.

Hunt, S. & Layzell, D.B., 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44:483-511.

Hunt, S., King, B.J., Canvin, D.T. & Layzell, D.B., 1987. Steady and nonsteady state gas exchange characteristics of soybean nodules in relation to the oxygen diffusion barrier. Plant Physiol. 84:161-172.

Hunt, S., King, B.J. & Layzell, D.B., 1989. Effects of gradual increases in O_2 concentration on nodule activity in soybean. Plant Physiol. 91:315-321.

Ianneta, P.P.M., De Lorenzo, C., James, E.K., Fernández-Pascual, M., Sprent, J.I., Lucas, M.M., Witty, J.F., de Felipe, M.R. & Minchin, F.R., 1993a. Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation J. Exp. Bot. 44:1461-1467.

Ianneta, P.P.M., James, E.K., McHardy, P.D., Sprent, J.I. & Minchin, F.R., 1993b. An ELISA procedure for quantification of relative amounts of intercellular glycoprotein in legume nodules. Ann. Bot.71:85-90.

Ianneta, P.P.M., James, E.K., Sprent, J.I. & Minchin, F.R., 1995. Time-course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. J. Exp. Bot. 46:565-575.

Imsande, J. & Touraine, B., 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol. 105:3-7.

Ireland, R.J. & Joy, K.W., 1985. Plant transaminases. In: Transaminases. (Christen, P. & Metzler , D.E., eds.), John Wiley, 1985. pp. 376-383.

Ireland, R.J. & Joy, K.W., 1990. Aminotransferases. In: Methods in Plant Biochemistry: Enzymes of Primary Metabolism. (Dey, P.M., Harbourne, J.B., eds), Academic Press, London, Vol. 3, pp. 277-286.

James, E.K., Sprent, J.I., Minchin, F.R. & Brewin, N.J., 1991. Intercellular localization of glycoprotein in soybean nodules: effects of rhizosphere oxygen concentration. Plant Cell Environ. 14:467-476.

Jarret, H.W., Cooksey, K.D., Ellis, B. & Andersen, J.M., 1986. The separation of *o*-phthaladehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. Analyt. Biochem. 153:189-198.

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.

Kanayama, Y., Watanabe, I. & Yamamoto, Y., 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants suppllied with nitrate. II. Nitrite accumulation and formation of nitrosylleghemoglobin in nodules. Plant Cell Physiol. 21:341-346.

Kennedy, I.R., 1966. Primary products of symbiotic nitrogen fixation I. Short-term exposures of serradella nodules to $^{15}N_2$. Biochem. Biophys. Acta. 130:285-294.

King, B.J. & Layzell, D.B., 1991. Effect of increases in oxygen concentration during the argon-induced decline in nitrogenase activity in root nodules of soybean. Plant Physiol. 96:376-381.

Kuzma, M.M. & Layzell, D.B., 1994. Acclimation of soybean nodules to changes in temperature. Plant Physiol. 106:263-270.

Kuzma, M.M., Hunt, S. & Layzell, D.B., 1993. Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. Plant Physiol. 101: 161-169.

Kuzma, M.M., Winter, H., Storer, P., Oresnik, I., Atkins, C.A. & Layzell, D.B., 1999. The site of oxygen limitation in soybean nodules. Plant Physiol. 119:399-407.

Lahrer, F., Goas, G., Lerudilier, D., Gerard, J. & Hamelin, J., 1983. Bound 4-aminobutiric acid in root nodules of *Medicago sativa* and other nitrogen fixing plants. Plant Sci. Letters. 26:315-326.

Layzell, D.B., Pate, J.S., Atkins, C.A., Canvin, D.T., 1981. Partitioning of carbon and nitrogen and the nutrition of root and shoot apex in nodulated legume. Plant Physiol. 67:30-36.

Layzell, D.B., Hunt, S. & Palmer, G.R., 1990. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules. Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O_2. Plant Physiol. 92:1101-1107.

Lea, P.J., 1999. Nitrogen metabolism. In: Plant Biochemistry and Molecular Biology. (P.J. Lea, R.C. Leegood, eds). John Wiley & Sons ltd. West Sussex, England, 2nd edn., pp. 163-191.

Lea, P.J. & Fowden, L., 1975. The purification and properties of glutamine-dependent asparagine isolated from *Lupinus albus*. Proc. Royal Society of London Series B, 192:13-26.

Lea, J.P. & Ireland, R.J., 1999. Nitrogen metabolism in higher plants. In: Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology (Singh, B.K., ed.) Marcel Dekker, New York, pp.1-47.

Lea, J.P., Robinson, S.A. & Stewart, G.R., 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism (B.J. Miflin, P.J. Lea, eds), Vol. 16. Academic Press, San Diego, C.A., pp. 121-159.

Le Floc'h, F. & Lafleuriel, J., 1983. The role of mitochondria in the recycling of adenine into purine nucleotides in the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Z. Pflanzenphysiol., 113:61-71.

Lucas, K., Boland, M.J. & Schubert, K.R., 1983. Uricase from soybean nodules: purification, properties, and composition with the enzyme from cowpea. Arch. Biochem. Biophys. 226:190-197.

Lundquist, Per-Olof., 2000. Nitrogenase activity in *Alnus incana* root nodules. Responses to O_2 and short-term N_2 deprivation. Plant Physiol. 122:553-561.

Marur, C.J.; Sodek., L. & Magalhães, A.C.N., 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. Revta. Bras. Fisiol. Veg. 6: 103-108.

Matamoros, M.A., Baird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin,F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C, Moran, J.F., Gordon, A.J. & Becana, M., 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. Plant Physiol. 121:97-111.

Matsumoto, T., Yatazawa, M., Yamamoto, Y., 1977. Effects of exogenous nitrogen-compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. Plant Cell Physiol. 18:613-624.

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 N_2 fixation in soybeans. Plant Physiol. 66:720-725.

McNeil, D.L. & Larue, T.A., 1984. Effect of nitrogen source on ureides in soybean. Plant Physiol. 66:720-725.

Miao, G.H., Hirel, B., Marsolier, M.C., Ridge, R.W. & Verma, D.P.S., 1991. Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. Plant Cell. 3:11-22.

Millar, A.H., Day, D.A. & Bergersen, F.J., 1995. Microaerobic respiration and oxidative phosphorylation by soybean nodule mitochondria: implications for nitrogen fixation. Plant Cell Environ. 18:715-726.

Minchin, F.R., 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. Soil Biol. Biochem. 29:881-888.

Minchin, F.R. & Pate, J.S., 1975. Effects of water, aeration, and salt regime on nitrogen fixation in a nodulated legume – definition of an optimum root environment. J.Exp.Bot. 26:60-69.

Minchin, F.R., Summerfield, R.J., Eaglesham, A.R.J. & Stewart, K.A., 1978. Effects of short-term waterlogging on growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*). J. Agric. Sci. 90:355-366.

Minchin, F.R., Witty, J.F., Sheehy, J.E. & Müller, M., 1983. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. J. Exp. Bot. 34: 641-649.

Minchin, F.R., Becana, M. & Sprent, J.I., 1989. Short-term inhibition of legume N_2 fixation by nitrate. II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. Planta. 180:46-52.

Minchin, F.R., Ianneta, P.P.M., Fernández-Pascual, M., de Lorenzo, C., Witty, J.F. & Sprent, J.I., 1992. A new procedure for calculation of oxygen diffusion resistance in legume nosules from flow-through gas analysis data. Ann. Bot. 70:283-289.

Morot-Gaudry, Jean-F., Job, D. & Lea P.J., 2001. Amino acid metabolism. In: Plant Nitrogen. (P.J. Lea & Jean-F.Morot-G, eds), Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, pp.167-211.

Muller, B. & Touraine, B., 1992. Inhibition of NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids soybean seedlings. J. Exp. Bot. 43:617-623.

Neo, H.H. & Layzell, D.B., 1997. Phloem glutamine and the regulation of O_2 diffusion in legume nodules. Plant Physiol. 113:259-267.

Newcomb, E.H. & Tandon, S.R., 1981. Uninfected cell of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. Science. 212:1394-1396.

Norris, D.O. & Date, R.A., 1976. Legume bacteriology. In: Tropical Pastures Research; Principles and Methods (N.H. Shaw, W.W. Bryan, eds), Comonwealth 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.). Plant Soil Special Vol., 185-202.

Ohyama, T. & Kumazawa, K., 1978. Incorporation of ^{15}N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to ^{15}N gas. Soil Sci. Plant Nutr. 24:525-533.

Ohyama, T. & Kumazawa, K. 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from $^{15}N_2$ fixation and $^{15}NO_3^-$ absorption. Soil Sci. Plant Nutr. 25:9-19.

Ortega, J.L., Roche, D. & Sengupta-Gopalan, C., 1996. Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. Plant Physiol. 111:25-25. Suppl. Jun.

Ortega, J.L., Roche, D. & Sengupta-Gopalan, C., 1999. Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. In vitro and in vivo studies. Plant Physiol. 119:1483-1495.

Ortega, J.L., Temple, S.J. & Sengupta-Gopalan, C., 2001. Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS_1) gene may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. Plant Physiol. 126:109-121.

Parsons, R. & Baker, A., 1996. Cycling of amino compounds in symbiotic lupin. J. Exp. Bot. 47:421-429.

Parsons, R. & Sunley, R.J., 2001. Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. J. Exp. Bot. 52:435-443.

Parsons, R., Stanforth, J.A., Raven, J.A. & Sprent, J.I., 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. Plant Cell Environ. 16:125-136.

Pate, J. S., 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:313-340.

Pate, J.S., Atkins, C.A., Hamel, K., McNeil, D.L. & Layzell, D.B., 1979. Transport of organic solutes in phloem and xylem of a nodulated legume. Plant Physiol. 63:1082-1088.

Pate, J.S., Atkins, C.A., White, S.T., Rainbird, R.M. & Woo, K.C., 1980. Nitrogen, nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. Plant Physiol. 65:961-965.

Pate, J.S., Atkins, C.A., Herridge, D.F. & Layzell, D.B., 1981. Synthesis, storage, and utiization of amino compounds in white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant Physiol. 67:37-42.

Paterson, T.G. & Larue, T.A., 1983. N_2 fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans: Environmental effects and source sink manipulations. Crop Sci. 23:819-824.

Poole, P.S. & Allaway, D., 2000. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. Adv. Microb. Physiol. 43:117-163.

Pugh, R., Witty, J.F., Mytton, L.R. & Minchin, F.R., 1995. The effect of waterlogging on nitrogen fixation and nodule morphology in soil-growth white clover (*Trifolium repens* L.). J. Exp. Bot. 48:285-290.

Puiatti, M. & Sodek, L., 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. Plant Physiol. Biochem. 37:767-773.

Rainbird, R.M. & Atkins, C.A., 1981. Purification and some properties of urate oxidase from nitrogen-fixing nodules of cowpea. Biochim. Biophys. Acta. 659:132-140.

Rainbird, R.M., Atkins, C.A. & Pate, J.S., 1983. Diurnal variation in the functioning of cowpea nodules. Plant Physiol. 72:308-312.

Reggiani, R., 1999. Amino acid metabolism under oxygen deficiency. Curr. Top. Phytochem. 2:171-174.

Reggiani, R., Cantú , C.A., Brambilla, I. & Bertani, A., 1988. Accumulation and interconversion of amino acids in rice under anoxia. Plant Cell Physiol. 29:981-987.

Reggiani, R., Mattana, M., Aurisano, N. & Bertani, A., 1993. Utilization of stored nitrate during the anaerobic germination of rice seeds. Plant Cell Physiol. 34:379-383.

Reggiani, R., Nebuloni, M., Mattana, M. & Brambilla, L., 2000. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. Amino Acids. 18:207-217.

Reynolds, P.H.S., Blevins, D.G., Boland, M.J., Schubert, K.R. & Randall, D.D., 1982a. Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: A comparison between ureide- and amide-transporting plants. Physiol. Plant. 55:255-260.

Reynolds, P.H.S., Boland, M.J., Blevins, D.G., Schubert, K.R. & Randall, D.D., 1982b. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. Plant Physiol. 69:1334-1338.

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.

Roberts, J.K.M., Hooks, M.A., Miaullis, A.P., Edwards, S. & Webster, C., 1992. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Plant Physiol. 98:480-487.

Robertson, J.G.; Farnden, K.J.F.; Warburton, M.P.; Banks, Jo-A.M., 1975. Induction of glutamine synthetase during nodule development in Lupin. Aust. J. Plant Physiol. 2:265-272.

Robson, R.L. & Postgate, J.R., 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. Annu. Rev. Microbiol. 34:183-207.

Rosendhal, L.; Vance, C.P. & Pedersen, W.B., 1990. Products of dark CO_2 fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. Plant Physiol. 93:12-19.

Rosendhal, L.; Dilworth, M. & Glenn, A. R. 1992. Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. J. Plant Physiol. 139: 635-638.

Salminen , S.O. & Streeter, J.G., 1987. Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. J.Bacteriol. 169:495-499.

Salminen, S.O. & Streeter, J.G., 1990. Improved analysis of metabolite uptake by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. Can. J. Microbiol. 37:238-243.

Sanchez, F., Campos, F., Padilla, J., Bonneville, J.M., Enriquez, C. & Caput, D., 1987. Purification, cDNA cloning and developmental expression of nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 84:1143-1147.

Schubert, K.R., 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 37:539-574.

Schubert, K.R. & Boland, M.J., 1990. The ureides. In: The Biochemistry of Plants (B.J. Miflin & P.J. Lea, eds), vol 16, Academic Press, Sandiego, pp.197-282.

Schuller, K.A., Day, D.A., Gibson, A.H. & Gresshoff, P.M., 1986. Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules: effect of nitrate. Plant Physiol. 80:646-650.

Schuller, K.A., Minchin, F.R. & Gresshoff, P.M., 1988. Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of soybean cv. Bragg and a suernodulating mutant: effects of nitrate. J. Exp. Bot. 39:865-877.

Serraj, R., Fleurat-Lessard, P., Jaillard, B. & Drevon, J.J., 1995. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. Plant Cell Environ. 18:455-462.

Serraj, R., Shelp, B. & Sinclair, T.R., 1998. Accumulation of γ-aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. Physiol. Plant.102:79-86.

Sheehy, J.E. & Thornley, J.H.M., 1988. Oxygen, the *nif*A gene, nodule structure and the initiation of nitrogen fixation. Ann. Bot. 61:605-609.

Shelp, B.J. & Atkins, C.A., 1983. Role of inosine monophoshate oxidoreductase in the formation of ureides in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiol. 72:1029-1034.

Shelp, B.J., Atkins, C.A., Storer, P.J. & Canvin, D.T., 1983. Cellular and subcellular organization of pathways of ammonia assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Arch. Biochem. Biophys. 224:429-441.

Shelp, B.J., Atkins, C.A. & Storer, P.J., 1985. Purification and properties of inosine monophosphate oxidoreductase from nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Arch. Biochem. Biophys., 236:807-814.

Shelp, B.J., Bown, A.W. & McLean, M.D., 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends in Plant Sci. 11:446-452.

Shi, L., Twary, S.N., Yoshioka, H., Gregerson, R.G., Miller, S.S., Sarnac, D.A., Gantt, J.S., Unkefer, P.J. & Vance, C.P., 1997. Nitrogen assimilation in alfafa: isolation and characterization asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. Plant Cell. 9:1339-1356.

Silva, D.M. & Sodek, L., 1997. Effect of aluminum on soybean nodulation and nodule activity in a vertical split-root system. J. Plant Nutr. 20:963-974.

Smith, A.M. & ap Rees, T., 1979. Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. Planta 146:327-334.

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 O_2 no sistema radicular. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.

Sprent, J.I., 1981. Functional evolution in some Papilionoid root nodules. In: Advances in legume systematics, Vol. 2. (Eds R.M. Polhill & P. Raven)., Her Majesty's Stationery Office:London, pp.671-676.

Sprent, J.I. & Raven, J.A., 1985. Evolution of nitrogen-fixing symbioses. Proc. Roy. Soc. Edin. 85B:215-237.

Stebbins, N.E. & Polacco, J.C., 1995. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. Plant Physiol. 109:169-175.

Streeter, J.G., 1972. Nitrogen nutrition of field-growth soybean plants. I. Seazonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudates. Agron. J. 64:311-314.

Streeter, J.G., 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-growth soybean plants. Plant Physiol. 63:478-480.

Streeter, J.G., 1987a. Carboydrate, 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 N_2 fixation by nitrate. Crit. Rev. Plant. Sci. 7:1-23.

Streeter, J.G. & Thompson, J.F., 1972a. Anaerobic accumulation of γ-aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus* L.). Plant Physiol. 49:572-578.

Streeter, J.G. & Thompson, J.F., 1972b. In vivo studies on γ-aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.) Plant Physiol. 49:579-584.

Suganuma, N., Watanabe, M., Yamada, T., Izuhara, T., Yamamoto, K., Nishimura, M. & Toriyama, K., 1999. Involvement of ammonia in maintenance of cytosolic glutamine synthetase activity in *Pisum sativum* nodules. Plant Cell Physiol. 40:1053-1060.

Tajima, S. & Larue, T.A., 1982. Enzymes for acetaldehyde and etanol formation in legume nodules. Plant Physiol. 70:388-392.

Temple, S.J., Kunjibettu, S., Roche, D. & Segupta-Gopalan, C., 1996. Total glutamine synthetase activity during soybean nodule development is controlled at the level of transcription and holoprotein turnover. Plant Physiol. 112:1723-1733.

Temple, S.J., Vance, C.P. & Gantt, J.S., 1998. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. Trends Plant Sci. 3:51-56.

Thomson, C.J. & Greenway, H., 1991. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O_2 concentrations. Plant Physiol. 96:1294-1301.

Thumfort, P.P., Atkins, C.A. & Layzell, D.B., 1994. A re-evaluation of the role of the infected cells in the control of O_2 diffusion in legume nodules. Plant Physiol. 105:1321-1333.

Thumfort, P.P., Layzell, D.B. & Atkins, C.A., 1999. Diffusion and reaction of oxygen in the central tissue of ureide-producing legume nodules. Plant Cell Environment. 22:1351-1363.

Tillard, P., Passama, L. & Gojon, A., 1998. Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO_3^- uptake in *Ricinus communis* plants? J. Exp. Bot. 49:1371-1379.

Trepp, G.B., Mortel, M. van de, Yoshioka, H., Miller, S.S., Samac, D.A., Gantt, J.S. & Vance, C.P., 1999. NADH-glutamate synthase in alfafa root nodules. Genetic regulation and cellular expression. Plant Physiol. 119:817-828.

Udvardi, M.K. & Day, D.A., 1989. Eletrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. Plant Physiol. 90:982-987.

Udvardi, M.K. & Day, D.A.,1997. Metabolite transport across membranes of legume nodules. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 493-523.

Vadez, V. & Sinclair, T.R., 2000. Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. J. Exp. Bot. 51:1459-1465.

Vadez, V., Sinclair, T.R. & Serraj, R., 2000. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N_2 fixation in soybean. Physiol. Plant. 110:215-223.

Van Cawenberghe, O.R., Hunt, S., Newcomb, W., Canny, M.J. & Layzell, D.B., 1994. Evidence that short-term regulation of nodule permeability does not occur in the inner cortex. Physiol. Plant. 91:477-487.

Vance, C.P. & Grant, J.S., 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. Physiol. Plant. 85:266-274.

Vance, C.P. & Heichel, G.M., 1991. Carbon in N_2 fixation: limitation or exquisite adaptation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:373-392.

Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S. & Gantt, J.S., 1994. Primary assimilation of nitrogen in alfafa nodules: molecular features of the enzymes involved. Plant Sci. 101:51-64.

Vanlerberghe, G.C., Feil, R. & Turpin, D.H., 1990. Anaerobic metabolism in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*. I. Regulation of carbon metabolism and succinate as a fermentation product. Plant Physiol. 94:1116-1123.

Vanlerberghe, G.C., Joy, K.W. & Turpin, D.H., 1991. Anaerobic metabolism in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*.III. Alanine is the product of anaerobic ammonium assimilation. Plant Physiol. 95:655-658.

Vassileva, V. & Ignatov, G., 1996. Effect of high nitrate concentrations on dicarboxylate transport across the peribacteroid membrane of soybean root nodules. J. Plant Physiol. 149:222-224.

Vézina, L.; Hope, H.J.; Joy, K.W., 1987. Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum* L. cv. Little Marvel) and alfafa (*Medicago media* Pers. cv. Saranac). Plant Physiol. 83:58-62, 1987.

Vogels, G.D. & Van Der Drift, C., 1970. Differential analysis of glyoxylate derivatives Analyt. Biochem. 33:143-157.

Waters, J.K.; Hughes, B.L.; Purcell, L.C.; Gerhardt, K.O. & Mawhinney, T.P. & Emerich, D.W., 1998. Alanine not ammonia is excreted from N_2-fixing soybean nodule bacteroids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95: 12038-12042.

Whatley, F.R., Greenaway, W. & Dunston, R.H., 1986. Glycine metabolism in carrot suspension culture cells investigated by gas-chromatography/mass spectrometry. Physiol. Veg. 24:3-13.

Williams, L.E. & Philips, D.A., 1980. Effect of irradiance on development of apparent nitrogen and photosynthesis in soybean. Plant Physiol., 66:968-972.

Witty, J.F., Minchin, F.R., Skot, L. & Sheehy, J.E., 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol. 3:275-314.

Witty, J.F., Skot, L. & Revsbeck, N.P., 1987. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O_2 diffusion. J. Exp. Bot. 38:1129-1140.

Wycoff, K.L., Hunt, S.H., Gonzales, M.B., Van den Bosch, K. A., Layzell, D.B. & Hirsch, A.M., 1998. Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfafa. Plant Physiol. 117:385-395.

Yemm, E.M. & Cocking, E.C., 1955. Estimation of amino acids by ninhidrin. Analyst. 80: 209-213.

Yoneyama, A.N. & Ishizuki, J. , 1982. ^{15}N study on the partioning of the nitrogen taken by soybean from atmospheric dinitrogen. Medium nitrate or ammonium. Soil Sci. Plant Nutr., 28:451-461.

UNIC AMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE