

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

ELENIRA HENRIQUE MIRANDA MENDONÇA

**FIXAÇÃO E REAÇÕES DE ASSIMILAÇÃO DE N EM**  
*Crotalaria juncea L.*

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Elenira Henrique Miranda  
Mendonça  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*M. Schiavinato*

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marlene A. Schiavinato

2002

UNICAMP

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

NIDADE	BC
CHAMADA	UNICAMP
	M523f
	EX
DMBO BC/	51812
DOC.	16-897-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	R\$ 11,00
ATA	
CPD	

CM00176262-1

IBID. - 275757

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**Mendonça, Elenira Henrique Miranda**

**M523f**

Fixação e reações de assimilação de N em *Crotalaria juncea* L.  
Elenira Henrique Miranda Mendonça. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadora: Marlene Aparecida Schiavinato  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .  
Instituto de Biologia.

1. Amônio. 2. Crotalaria. 3. Simbiose. I. Schiavinato, Marlene  
Aparecida. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 08/10/2002

**Banca Examinadora**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marlene A. Schiavinato (Orientadora)**

mschiavinato

**Prof. Dr. Ladaslav Sodek**

L. Sodek

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lázara Cordeiro**

Lázara Cordeiro

**Prof. Dr. Mário Puiatti**

Mário Puiatti

**Prof. Dr. Paulo Mazzafera**

Paulo Mazzafera

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia R. B. Haddad**

\_\_\_\_\_

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria M. A. Lagôa**

\_\_\_\_\_

918192008

**Ao Paulo Sérgio, Paulo Henrique e aos que virão, sempre.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas que participaram direta e indiretamente de todas as etapas da realização deste trabalho, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene A. Schiavinato pela confiança e orientação amigável, tanto acadêmica quanto pessoal;

Aos Professores Dr. Ladaslav Sodek e Dr. Paulo Mazzafera pela experiência e sugestões durante a pré-banca;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lázara Cordeiro pela gentileza e sugestões durante a pré-banca;

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal pela convivência e amizade;

Às Pesquisadoras Científicas do Instituto Agrônomo de Campinas, Adriana Parada Dias da Silveira pelas análises de N e Elaine B. Wutke, pela cessão de sementes;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1. Condições de cultivo.....	13
4.2. Delineamento estatístico e tratamentos realizados.....	13
4.3. Medidas de crescimento.....	14
4.4. Análise estatística dos resultados.....	14
4.5. Extração das proteínas solúveis.....	15
4.5.1. Quantificação das proteínas solúveis.....	15
4.5.2. Determinação da atividade específica da GS.....	15
4.5.3. Determinação da atividade específica da GDH-NADH.....	16
4.5.4. Determinação da atividade específica da GOGAT-NADH.....	17
4.5.5. Determinação da atividade específica da GOGAT-Fd.....	17
4.6. Determinação da atividade específica da nitrogenase (ARA).....	18
4.7. Teor de pigmentos fotossintéticos.....	19
4.8. Teor de N total.....	20
4.9. Extração de solutos de tecidos vegetais por MCW.....	21

4.9.1. Teor de carboidratos.....	21
4.9.2. Teor de ureídeos.....	22
4.9.3. Teor de aminoácidos livres totais.....	23
4.9.4. Teor de N-NH <sub>4</sub> livre.....	23
4.10. Coleta da seiva do xilema.....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
5.1. Crescimento de plantas de <i>C. juncea</i> L.....	25
5.2. Atividade específica da GS.....	27
5.3. Atividade específica da GDH-NADH.....	30
5.4. Atividade específica da GOGAT-NADH e GOGAT-Fd.....	33
5.5. Atividade específica da nitrogenase (ARA).....	36
5.6. Teor de pigmentos fotossintéticos.....	38
5.7. Teor de N total.....	41
5.8. Teor de carboidratos.....	43
5.9. Teor de ureídeos.....	48
5.10. Teor de aminoácidos livres totais.....	50
5.11. Teor de N-NH <sub>4</sub> livre.....	52
5.12. Compostos nitrogenados em tecidos e seiva do xilema.....	54
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção de massa fresca (MF) e seca (MS) em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....26
- Figura 2.** Atividade específica da enzima GS em tecidos de plantas de *C. juncea* L. inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....28
- Figura 3.** Atividade específica da enzima GDH-NADH em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....31
- Figura 4.** Atividade específica da enzima GOGAT-NADH em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....34
- Figura 5.** Atividade específica da enzima GOGAT-Fd em folhas de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....35
- Figura 6.** Atividade da N<sub>2</sub>ase em nódulos radiculares de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) e cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.  
.....37
- Figura 7.** Teor de clorofila em folhas de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....39
- Figura 8.** Teor de N totais em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio.....42

<b>Figura 9.</b>	Teor de sacarose em tecidos de plantas de <i>C. juncea</i> L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio.....	45
<b>Figura 10.</b>	Teor de açúcares solúveis totais em tecidos de plantas de <i>C. juncea</i> L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio.....	47
<b>Figura 11.</b>	Teor de ureídeos em tecidos de plantas de <i>C. juncea</i> L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio.....	49
<b>Figura 12.</b>	Teor de aminoácidos livres totais em tecidos de plantas de <i>C. juncea</i> L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio.....	51
<b>Figura 13.</b>	Teor de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> em tecidos de plantas de <i>C. juncea</i> L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio.....	53
<b>Figura 14.</b>	Composição nitrogenada da seiva do xilema de plantas de <i>C. juncea</i> L. inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio. ....	56
<b>Figura 15.</b>	Quantidade de N em compostos nitrogenados nos tecidos e em seiva do xilema de plantas de <i>C. juncea</i> L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ou ausência (-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) de amônio. ....	57

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ALT	Aminoácidos livres totais
ATP	Trifosfato de adenosina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
FC	Fator de correção
Fd	Ferredoxina
FBN	Fixação biológica do N
GDH	Glutamato desidrogenase
GGH	Gama glutamil-hidroxamato
GLU	Glutamato
GLN	Glutamina
GOGAT	Glutamina sintase
GOGAT – Fd	Glutamina sintase dependente de ferredoxina
GOGAT – NADH	Glutamina sintase dependente de $\beta$ - nicotiamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
GS	GLN sintetase
Imidazol	1,3-diaza-2,4-ciclopentadieno
MCW	Metano:clorofórmio:água
MF	Massa fresca
MS	Massa seca
N <sub>2</sub> ase	Nitrogenase
NAD <sup>+</sup>	$\beta$ - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH	$\beta$ - nicotiamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
prot.	Proteína
$\alpha$ -KG	Ácido 2-oxoglutarato
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
URE	Ureídeos totais

## RESUMO

*Crotalaria juncea* L. é uma leguminosa amplamente utilizada como adubo verde. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do  $N-NH_4^+$  sobre o crescimento da planta, produção de compostos nitrogenados e atividade das enzimas envolvidas na assimilação do N nessa espécie. Foram avaliadas as respostas de plantas, inoculadas (I) ou não (NI) com *Rhizobium*, à presença (+N) ou ausência (-N) de  $NH_4^+$ . Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, em vasos contendo vermiculita, os quais foram irrigados com solução nutritiva contendo  $(NH_4^+)_2SO_4$  de modo a fornecer 20 mgN/planta/semana ou com solução nutritiva sem N. Todas as avaliações foram realizadas em plantas com 60 dias de idade. A FBN não foi afetada pelo  $NH_4^+$ , visto que na presença deste íon a atividade  $N_2ase$  não foi inibida e houve aumento de MF e MS de parte aérea, raízes e nódulos. A atividade específica da GS foi maior em folhas que em raízes, em todos os tratamentos. As folhas de plantas NI/+N apresentaram maior atividade de GS e GDH que as de plantas I/+N. Em folhas, raízes e nódulos de plantas inoculadas (+N ou -N), a atividade específica de GS foi semelhante; no entanto, no caso de GDH, a atividade foi maior em folhas e raízes de plantas I/-N e em nódulos de plantas I/+N. Independente do tratamento, em folhas, a atividade específica da GOGAT-NADH foi quase nula e a forma predominante da enzima foi aquela dependente de ferredoxina (GOGAT-Fd). Em geral, folhas de plantas +N apresentaram maiores concentrações de pigmentos (clorofila total e carotenóides), N total e ALT. Plantas -N, totalmente dependentes da fixação de  $N_2$ , exibiram seiva do xilema com maiores teores de ALT que plantas dos outros tratamentos, enquanto que plantas +N apresentaram nódulos com maior concentração de ALT. Em geral, não foram observadas diferenças entre os tratamentos, quanto ao conteúdo de  $NH_4^+$  nas diferentes partes da planta. Os teores de URE encontrados foram mínimos, confirmando que o transporte de compostos nitrogenados em seiva de *C. juncea* se dá na forma de ALT e do íon  $NH_4^+$ .

## SUMMARY

*Crotalaria juncea* L. is a legume widely used as green manure. The objective of this work was to obtain basic information on the influence of the  $\text{N-NH}_4^+$  in the growth and production of nitrogen compounds and enzymes involved in nitrogen assimilation in this species. The responses of plants, inoculated (I) or not (NI) with *Rhizobium* to the presence (+N) or absence (- N) of  $\text{NH}_4^+$  were evaluated. The experiments were carried out in a greenhouse, in pots with vermiculite irrigated with nutrient solution containing  $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$  in order to supply 20 mg of N/plant.week or with nutrient solution deprived of N. All the evaluations were carried out with 60 day old plants. Biological nitrogen fixation was not affected by  $\text{NH}_4^+$ , since in the presence of this ion nitrogenase activity was not inhibited and shoots, roots and nodules fresh and dry mass increased. GS activity was higher in leaves than in roots, in all the treatments. Leaves of NI/+N plants presented higher GS and GDH activities than of I/+N plants. GS activity of leaves, roots and nodules of inoculated plants (+N or - N) was similar. However, GDH specific activity was higher in I/-N plants leaves and roots and in I/+N plant nodules. Independent of the treatment, GOGAT-NADH activity in leaves was almost null and the predominant form of the enzyme was that dependent of ferredoxin (GOGAT-Fd). In general, +N plant leaves presented higher pigment (total chlorophyl and carotenoids), total N and amino acids concentration. -N plants, that are fully dependent on  $\text{N}_2$  fixation, showed xylem sap with bigger amino acid contents than plants of other treatments, while +N plants presented nodules with bigger amino acid concentration. In general, differences between the treatments were not observed, as regards the ammonia content in the different parts of the plant. The levels of ureides found were minimum, confirming that the transport of nitrogen compounds in xylem sap of *C. juncea* is based on amino acids and ammonia.

## 1. INTRODUÇÃO

Crotalaria é um dos grandes gêneros da família Leguminosae, cujos representantes são nativos da Índia e Ásia Tropical (Polhill, 1982). *Crotalaria juncea* é uma espécie cultivada no estado de São Paulo e, segundo Bulisani *et al.* (1992), tem sido empregada principalmente nas áreas canavieiras com problemas de nematóides, por acarretar a diminuição da população deste organismo no solo visto que é considerada “má” hospedeira de nematóides formadores de galhas (Calegari *et al.*, 1992).

Embora se considere como adubação verde a incorporação ao solo de fitomassa de espécies vegetais distintas, as leguminosas são as mais difundidas para essa finalidade, por apresentarem sistema radicular geralmente profundo e ramificado, com capacidade de fixar o N<sub>2</sub> atmosférico, mediante associação com bactérias de diferentes gêneros da família *Rhizobiaceae*. Essas características possibilitam, às leguminosas, a extração de elementos menos solúveis e a mobilização de nutrientes das camadas mais profundas do solo, tornando-os disponíveis às culturas econômicas após sua decomposição (Dourado *et al.*, 2001). Embora apresente muitas vantagens, a prática da adubação verde ainda é pouco utilizada pelos agricultores, principalmente durante o verão, pois para eles o cultivo de uma espécie de adubo verde não propicia retorno econômico imediato, ou seja, ocupa o espaço de outra cultura rentável. Isto ocorre em função do desconhecimento das vantagens que justificam essa prática.

Dentre as diversas leguminosas utilizadas como adubo verde, a crotalaria é muito eficiente como produtora de massa vegetal e como fixadora de N (Dourado *et al.*, 2001). Wutke *et al.* (1993) afirmaram que plantas de *C. juncea* podem incorporar ao solo, pela fixação, de 150 a 165 kg N/ha.ano, podendo chegar a 450 kg N/ha.ano em certas ocasiões, produzindo 10 a 15 toneladas de matéria seca, correspondendo a 41 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha e 217 kg

K<sub>2</sub>O/ha. Aos 130 dias de idade estas plantas podem apresentar raízes na profundidade de até 4,5 m, sendo que 79% de sua massa se encontram nos primeiros 30 cm. Há ainda evidências de benefícios das excreções radiculares na sucessão crotalaria - cana-de-açúcar, e ainda, de efeitos alelopáticos de crotalaria sobre a tiririca (Wutke *et al.*, 1993).

## ASSOCIAÇÃO RIZÓBIO-LEGUMINOSA

A associação rizóbio-leguminosa envolve várias etapas, que têm como início o processo de reconhecimento e troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e os microssimbiontes. Após a infecção, o movimento das bactérias pode se dar via espaços intercelulares (Vander-Broe & Vanderleyden, 1995), ou pelo interior das células, formando ou não filamento de infecção (Turgeon & Bawer, 1985). Quando presente, este filamento é composto por uma parede tubular que envolve uma matriz na qual estão embebidos os rizóbios (Bradley *et al.*, 1988). As bactérias se multiplicam no interior do filamento, que se estende penetrando através e/ou entre as células do córtex da raiz (Sprent & Faria, 1989). Simultaneamente ao processo de infecção, células corticais são mitoticamente ativadas, dando origem aos primórdios nodulares. Os filamentos de infecção se desenvolvem em direção aos primórdios e as bactérias são liberadas no citoplasma das células da planta (Newcomb, 1976). Esta região do citoplasma é então contornada por uma membrana produzida pela planta, denominada membrana peribacteroidal (MPB) (Moreau *et al.*, 1996). Durante a proliferação no interior das raízes, as bactérias sofrem várias modificações morfológicas e fisiológicas, passando a ser chamadas de bacteróides. Neste estágio, os bacteróides sintetizam a enzima nitrogenase (N<sub>2</sub>ase, EC 1.18.6.1), e o primeiro produto estável do processo de fixação do N<sub>2</sub>, o íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, é exportado através da MPB para o citossol da célula da planta hospedeira, onde é

assimilado e usado na síntese do N orgânico que será transportado para a parte aérea (Bergersen & Turner, 1967; Kennedy *et al.* 1975; Tajima *et al.* 2000). Ao mesmo tempo há a síntese de uma proteína chamada leghemoglobina (legHb), que dá aos nódulos a cor rosa e é considerada um pré-requisito para que a fixação de N<sub>2</sub> ocorra. A legHb localiza-se no citossol da planta hospedeira e sua principal função parece ser a manutenção da difusão de O<sub>2</sub> em taxas cuidadosamente controladas, de modo a permitir a respiração do bacteróide e impedir a inativação da N<sub>2</sub>ase. As reações de assimilação do N são mediadas pelas enzimas GLN sintetase (GS) e GLU sintase (GOGAT), que produzem GLN e GLU a partir de  $\alpha$ -KG e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Mifflin & Lea, 1982; Pawlowski, 1997; Becker *et al.*, 2000).

Como a associação depende de uma troca de C e N entre a planta hospedeira e os bacteróides, a planta fornece para os nódulos esqueletos de carbono provenientes da fotossíntese. Os fotossintatos transportados, via floema, são utilizados para manutenção do crescimento dos nódulos, como fonte de poder redutor e ATP necessários à redução de N<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e como esqueletos de carbono necessários à formação dos compostos orgânicos nitrogenados (Dixon & Wheeler, 1986).

A realização de pesquisas relacionadas à FBN tem grande importância econômica para o Brasil que pode ser exemplificada pelos resultados obtidos com a cultura de soja. Devido ao melhoramento vegetal da mesma e à seleção de rizóbios adaptados às condições brasileiras, hoje se dispensa qualquer tipo de adubo nitrogenado e anualmente, retornam ao sistema solo-planta, um montante de N equivalente a bilhões de dólares (IPT, 1989). Frente a este aspecto, a associação rizóbio-leguminosa é a que apresenta maior expressão nos estudos atuais de processos microbiológicos (Cherney & Duxbury, 1994; Massonneau, *et al.*, 2001). Por outro lado, de um modo geral os teores de N nos solos brasileiros não são elevados. Com a intensificação da agricultura, as exigências em N e a remoção deste mineral do solo são

maiores e, conseqüentemente, caso o N retirado pelas plantas não seja repostado, o seu teor decrescerá ao longo dos anos.

A utilização de leguminosas fixadoras de N, para adubação verde, propicia a recuperação da fertilidade do solo via aumento da incorporação da matéria orgânica. A quantidade de N que as plantas utilizadas como adubo verde poderão fornecer à cultura subsequente, será dependente de sua capacidade de fixação de  $N_2$  e da eficiência da assimilação do  $NH_4^+$  proveniente deste processo.

## **METABOLISMO DO NITROGÊNIO**

As respostas metabólicas e de crescimento de determinada espécie de planta, frente às formas de N, podem estar associadas às diferentes etapas da aquisição e assimilação, envolvendo processos metabólicos distintos e níveis de organização. O desempenho ecológico das espécies resulta da interação entre o genoma, os recursos disponíveis, tais como nutrientes, e as condições ambientais.

A disponibilidade de N é considerada um dos principais fatores limitantes ao crescimento das plantas (Bloom, 1988). De acordo com Marschner (1995), a maioria das plantas obtém N a partir da solução do solo, através das raízes, na forma dos íons inorgânicos  $NH_4^+$  e nitrato ( $NO_3^-$ ), ou a partir do  $N_2$  atmosférico via associação simbiótica. Por outro lado, as plantas também são capazes de utilizar eficientemente formas orgânicas como uréia e aa (Pabby *et al.*, 2001).

Em comunidades naturais a principal fonte de  $NH_4^+$  é representada pelo processo de amonificação do N orgânico por microorganismos heterotróficos (Frechilla *et al.* 2000). O

$\text{NH}_4^+$  formado é rapidamente oxidado a  $\text{NO}_3^-$  por bactérias específicas do solo, de ampla distribuição, pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (Oaks, 1992).

Outro processo significativo é o de conversão da molécula inerte de  $\text{N}_2$  a N reduzido ( $\text{NH}_4^+$ ), por meio da fixação biológica de  $\text{N}_2$  realizada por organismos procariontes de vida livre ou em associações diversas com fungos e plantas de diferentes grupos taxonômicos (Marschner, 1995; Bladergroen & Spaink, 1998; Hodge *et al.*, 2000).

Existem estimativas de que, em escala global, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  produza uma quantidade de N-orgânico aproximadamente 100 vezes maior do que a fixação biológica Solomonson & Barber (1990). Segundo Crawford & Arst (1993), o  $\text{NO}_3^-$  é a principal forma absorvida de N da biosfera. Entretanto, estimando a assimilação primária global de N pelos organismos fotossintetizantes, Raven *et al.* (1993) concluíram que o  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  representam a fonte dominante de N no mar, na terra e em águas continentais.

Um aspecto que influencia de modo significativo a disponibilidade dos íons inorgânicos para as plantas é a sua mobilidade no solo. Enquanto o  $\text{NO}_3^-$  é facilmente transportado por difusão e fluxo de massa, o  $\text{NH}_4^+$  é um íon com pouca mobilidade, principalmente em solos com grande capacidade de troca catiônica (Blomm, 1988). A absorção de  $\text{NH}_4^+$  é geralmente favorecida pela elevação do pH, enquanto que a absorção de  $\text{NO}_3^-$  é favorecida pelo aumento da acidez do meio (Reisenauer, 1978).

As diferenças de potencial elétrico que se estabelecem através da plasmalema e do tonoplasto das células vegetais são continuamente geradas por ATPases das membranas, que operam como bombas de prótons ( $\text{H}^+$ -ATPases). O transporte de muitos solutos (íons, metabólitos e outros) para dentro e para fora da célula envolve transportadores secundários, cuja capacidade de funcionamento encontra-se diretamente dependente da força próton-motiva das  $\text{H}^+$ -ATPases. A absorção de  $\text{NO}_3^-$ , por exemplo, depende de carreadores que funcionam em simporte com H (Burity *et al.*, 1999).

As taxas de crescimento das raízes e, conseqüentemente, a capacidade de exploração de novas regiões do solo são importantes para a absorção do  $\text{NH}_4^+$ , devido à relativa imobilidade deste íon no solo. A absorção de  $\text{NH}_4^+$  favorece a absorção de ânions como  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  e diminui a absorção de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ). Outro efeito importante do  $\text{NH}_4^+$  é a sua atuação inibitória sobre a absorção de  $\text{K}^+$  (Reisenauer, 1978). Saravitz *et al.* (1994) propuseram que o declínio acentuado na absorção de  $\text{K}^+$  acarretado pelo  $\text{NH}_4^+$ , quando fonte exclusiva de N, desfavorece a própria absorção de  $\text{NH}_4^+$  devido à restrição da transferência de aa do simplasto das raízes para o xilema. Assim, plantas de soja deficientes em N e supridas com  $\text{NH}_4^+$  isoladamente, apresentam baixas taxas de absorção de  $\text{NH}_4^+$  por unidade de massa radicular (taxa de absorção específica), além de uma expressiva redução no crescimento radicular (Saravitz *et al.*, 1994).

## ASSIMILAÇÃO DO $\text{NH}_4^+$

O  $\text{NH}_4^+$  é continuamente formado durante vários processos metabólicos, como por exemplo, via fixação do N atmosférico e redução do  $\text{NO}_3^-$ , além de ser também formado no processo de fotorrespiração. A quebra de ASN, ARG e URE também pode liberar  $\text{NH}_4^+$ , bem como o catabolismo de proteínas (Lea, 1993).

É importante salientar que elevadas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  nos tecidos, podem ser consideradas tóxicas para o vegetal (Ishiyama *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1999; Turano & Muchitch, 1999). Essa toxicidade pode ser, em parte, devida à inibição da formação de ATP nos cloroplastos e nas mitocôndrias (Salisbury & Ross, 1992).

O  $\text{NH}_4^+$  resultante dos processos metabólicos é convertido a GLN que é uma das amidas mais importantes encontradas em plantas. Esta é formada pela adição de um grupo  $\text{NH}_2$

ao grupo carboxílico do GLU. Essa reação necessita da enzima glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) e de GLU, que é fornecido via ação de uma outra enzima, a GLU sintase (GOGAT). Esta última transfere o grupo amida da GLN para o ácido  $\alpha$ -KG, formando duas moléculas de GLU. Uma molécula de GLU é utilizada na reação da GS, indicando que essas duas enzimas trabalham em conjunto. A outra molécula de GLU pode participar de outros processos na planta, como biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos, etc. A assimilação do  $\text{NH}_4^+$  necessita de um agente redutor capaz de doar dois elétrons, sendo a ferredoxina nos cloroplastos (GOGAT-Fd, E.C.1.4.7.1) e NADH (NADH-GOGAT, E.C.1.4.1.14) ou NADPH (NADPH-GOGAT, E.C.1.4.1.13) nos proplastídeos das células não fotossintetizantes (Oaks, 1994b; Trepp *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001). De maneira resumida, as reações catalisadas pela GS/GOGAT podem ser descritas como segue:



A GS possui alta afinidade pelo  $\text{NH}_4^+$  ( $K_m$  3-5  $\mu\text{M}$ ), estando presente em todos os tecidos vegetais. Nas plantas superiores, GS é uma proteína com massa molecular de 350-400 KDa (Lea, 1993). Em folhas, foram isoladas duas isoenzimas: GS1 (citoplasma) e GS2 (cloroplasto) (Lea, 1993). A proporção de GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub> pode variar com a espécie, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (Scheley *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1996). Há indicações, via emprego de plantas mutantes, de que a isoenzima GS<sub>2</sub> desempenha duas

funções nas folhas: 1) na assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , oriundo da redução do nitrito nos plastídios e, 2) assimilação do  $\text{NH}_4^+$  fotorrespirado (Lam *et al.*, 1995). O aparecimento da GS cloroplastídica nas folhas é, aparentemente, regulado pela luz, além de estabelecer uma correlação com a capacidade fotorrespiratória (Migge *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2001).

Estudos feitos por Seith *et al.* (1994) com *Pinus sylvestris*, um vegetal que possui a capacidade de assimilar o  $\text{NH}_4^+$  atmosférico, evidenciaram que níveis altos de GS poderiam ser encontrados no tratamento controle, isto é, aquele sem adição de sais nitrogenados, sugerindo que a GS estaria relacionada com a reassimilação da amônia endógena. Esses mesmos autores demonstraram que o aparecimento da GS era vinculado à luz.

Lea & Mifflin (1974) identificaram GOGAT-Fd no cloroplasto de folhas de ervilhas e Wallsgrave *et al.* (1982) purificaram e caracterizaram esta enzima em folhas de feijão, com massa molecular estimada entre 125 a 180 KDa. A GOGAT-Fd representa a principal isoforma em folhas crescidas à luz; é ativa na reassimilação do  $\text{NH}_4^+$  na fotorrespiração e pode ainda estar envolvida na incorporação do  $\text{NH}_4^+$  derivado da redução de  $\text{NO}_3^-$  ou da degradação de compostos nitrogenados (Suzuki *et al.*, 1987; Cordovilla *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001). GOGAT-Fd também tem sido encontrada em raízes e nódulos de soja (Cordovilla *et al.*, 2000), onde o papel fisiológico ainda não está claro. A presença de GOGAT-Fd é restrita a plantas superiores, algas e cianobactérias, enquanto que formas NAD(P)H-GOGAT foram identificadas em plantas, bactérias e fungos. Existe forte evidência fisicoquímica, imunológica e genética de que as atividades de NAD(P)H/Fd-GOGAT são catalisadas por diferentes proteínas (Cordovilla *et al.*, 2000).

Antes da descoberta das enzimas GS/GOGAT, acreditava-se que o  $\text{NH}_4^+$  era incorporado na forma orgânica via aaminação redutiva do 2-oxoglutarato, catalisada pela enzima GLU desidrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) (Schoenbeck *et al.*, 2000). Trabalhos realizados com *Arabidopsis thaliana* sugeriram um duplo papel para essa enzima. Na presença

de altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , a GDH atuaria no sentido da assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , enquanto que a GDH-desaminante, forneceria esqueletos carbônicos quando existissem concentrações menores desse íon. Assim, a GDH faria uma ligação entre o metabolismo de carboidratos e o de aa (Cammaerts & Jacobs, 1985).

As possíveis reações dessa enzima estão sumarizadas da seguinte forma:



Entretanto, atualmente tem sido considerada a hipótese de que a principal função dessa enzima esteja relacionada ao catabolismo do GLU, formando 2-oxoglutarato, o qual poderá ser utilizado no ciclo de Krebs (Lea, 1993). Existem duas formas de GDH, uma mitocondrial, que necessita de NADH e outra cloroplastídica que requer NADPH (Sechley *et al.*, 1992).

Embora a tendência recente esteja voltada para a idéia de que GDH funcionaria principalmente no sentido da quebra do GLU, muitos pesquisadores acreditam que o papel da GDH ainda não esteja totalmente esclarecido (Oaks, 1995).

Trabalhos que utilizaram culturas de células de cenoura (*Dacus carota* L. cv. Chantenay) em suspensão, mostraram que a GDH parece ter a função de oxidação do GLU, fornecendo esqueletos de carbono suficientes para um efetivo funcionamento do ciclo de Krebs (Robinson *et al.*, 1992). Esse papel catabólico da GDH implicaria numa importante função reguladora dos metabolismos de carbono e N. Uma outra evidência para essa hipótese, do papel da GDH desaminante, seria que não houve assimilação de  $\text{NH}_4^+$  sob condições onde a GS foi inibida, mesmo quando as células foram supridas com excesso de 2-oxoglutarato. Se GS estivesse ativa, o  $\text{NH}_4^+$  seria detectado no grupo N-amida da GLN e se GS fosse inibida, o  $\text{NH}_4^+$  seria liberado para o meio. Portanto, a GDH, nesse modelo, pareceu catalisar a oxidação

do GLU em resposta a uma deficiência de carbono nas células de cenoura (Robinson *et al.* 1991). A atividade enzimática de GDH, em ambas as direções da reação, bem como o padrão isoenzimático, variam em função da espécie vegetal, da nutrição nitrogenada e da disponibilidade de carbono e energia (Srivastava & Singh, 1987).

## 2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento detalhado do processo de fixação biológica, da assimilação e do transporte de nitrogênio em *C. juncea*, na presença ou ausência de N mineral, poderá possibilitar a elaboração de estratégias para o cultivo mais eficiente desta espécie, visando a produção de fibras ou como adubo verde. No trabalho de mestrado, cujo título foi "Fixação de  $N_2$  em *Crotalaria juncea* L.: efeito de  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ ", foram realizados experimentos com plantas de crotalaria, inoculadas com estirpe de *Rhizobium*, que foram tratadas com solução nutritiva sem N (controle) ou contendo N mineral na forma de  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ . As plantas que receberam  $NH_4^+$  apresentaram crescimento superior ao de plantas controle (-N) em todas as idades (incremento em altura e MS). Houve formação de nódulos em todos os tratamentos, sendo que plantas que receberam  $N/NH_4^+$  apresentaram maior nodulação até 90 dias após o plantio (DAP). Houve maior incremento no teor de N até os 60 DAP, sendo que a atividade da  $N_2$ ase não variou dos 60 aos 90 DAP. A partir destes resultados decidiu-se, no doutorado, dar continuidade à pesquisa da fixação avaliando as reações de assimilação de N em plantas de *C. juncea*, inoculadas ou não, cultivadas na ausência de N ou tratadas com  $N-NH_4^+$ .

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da inoculação, na ausência ou presença de  $\text{N-NH}_4^+$ , sobre o crescimento de plantas de *C. juncea*, as enzimas envolvidas na assimilação do N e o teor endógeno de moléculas nitrogenadas importantes em folhas, raízes, nódulos e seiva do xilema.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Condições de cultivo**

Foram utilizadas sementes de *Crotalaria juncea* L. (IAC-1), fornecidas pelo Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio dos Grãos e Fibras, do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, entre fevereiro e junho de 1998, sob regime de luz natural e temperatura média diária no período variando de 27°C (mínima) a 39°C (máxima). As sementes de *C. juncea* L., após selecionadas e uniformizadas quanto ao tamanho, foram semeadas diretamente em vasos plásticos com 1,5 L de capacidade, contendo vermiculita previamente lavada. Após a semeadura (4 sementes por vaso), foi feita a inoculação com 2 mL de suspensão de uma estirpe de rizóbio isolada de nódulos de *Crotalaria retusa* (Mendonça *et al.*, 1999) em 2/3 do total das plantas. Uma semana após, fez-se o desbaste, mantendo-se apenas uma planta/vaso, seguido de nova inoculação na mesma dose e suspensão anterior. Nesta ocasião, todas as plantas receberam uma dose inicial de 100 mL/vaso de solução completa de Hoagland & Arnon (1938).

### **4.2. Delineamento estatístico e tratamentos realizados**

Foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 3 repetições (9 plantas), em todos os experimentos. Os tratamentos foram constituídos de:

- Tratamento 1 (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>): as plantas foram inoculadas com suspensão de rizóbio e receberam, semanalmente, 100 mL de solução nutritiva sem N (Faria *et al.*, 1988).
- Tratamento 2 (I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>): as plantas foram inoculadas com suspensão de rizóbio e receberam, semanalmente, 100 mL de solução nutritiva com adição de (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de modo a fornecer 20 mg de N/planta.
- Tratamento 3 (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>): as plantas não foram inoculadas e receberam, semanalmente, 100 mL de solução nutritiva com adição de (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de modo a fornecer 20 mg de N/planta.

#### **4.3 Medidas de crescimento**

Aos 60 dias da semeadura, foram coletadas 9 plantas por tratamento (1 por repetição) e estas separadas em parte aérea (folhas + caule), raízes e nódulos radiculares. Após determinação da massa fresca (MF), as partes da planta foram acondicionados em sacos de papel e mantidas em estufa, com circulação forçada de ar, a 65°C durante 72h para a determinação da massa seca (MS). Foi realizada a moagem de folhas, raízes e nódulos e estes reservados para determinação de N total.

#### **4.4. Análise estatística dos resultados**

As análises e atividades das enzimas, sempre que possível, foram feitas em triplicata. As médias dos resultados obtidos, em cada tipo de determinação, foram submetidas à análise de variância e as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Snedecor, 1967).

#### **4.5. Extração das proteínas solúveis**

Cada parte da planta foi pesada individualmente uma amostra de 1 g de MF, sendo macerada em almofariz com N líquido. Após transformada em pó fino, cada amostra foi vertida em tubo de centrífuga, e misturada com 5 mL de tampão de extração, constituído por imidazol 0,05 M, pH 7,9, contendo 5 mM de ditioneitol (DTT). A seguir foram realizadas duas centrifugações de 13.800 x g (rotor JA21 - Beckman) a 4°C. Após a primeira centrifugação de 30 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo então centrifugado por mais 10 minutos (Farnden & Robertson, 1980). O segundo sobrenadante coletado, sempre mantido em gelo, foi dessalinizado em coluna PD10 e utilizado para as determinações de proteínas solúveis e atividades enzimáticas.

##### **4.5.1. Quantificação das proteínas solúveis**

A determinação do teor de proteínas solúveis foi realizada nos extratos utilizados para avaliação das atividades específicas de GS, GDH-NADH, GOGAT-NADH e GOGAT-Fd. O método empregado foi o de Bradford (1976) e as leituras da absorbância, a 595 nm, foram efetuadas 5 minutos após a adição de 5 mL do reagente de Bradford sobre 100 µL do extrato. Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

##### **4.5.2. Determinação da atividade específica da GS**

A atividade da GS foi determinada pelo método transferase utilizando-se hidroxilamina como substrato, ao invés do íon  $\text{NH}_4^+$ . O produto da reação,  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato, foi quantificado por meio da reação com cloreto férrico acidificado (Farnden & Robertson, 1980).

O volume total da reação foi de 0,5 mL, contendo 0,1 mM de tampão imidazol, pH 7,5, 48 mM de hidroxilamina, 40 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de GLU e 50 mM de ATP. A reação foi iniciada com a adição de 150 µL do extrato, incubada a 30°C e interrompida após 60 minutos com a adição de 1 mL do reagente contendo cloreto férrico (0,67 M de cloreto férrico, 0,37 mM de HCl e 20% de ácido tricloroacético – m/v). As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 10.000 x g e a absorbância do sobrenadante foi medida em 540 nm. A curva de calibração foi construída utilizando-se  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato como padrão (Farnden & Robertson, 1980; Perez-Soba *et al.*, 1994).

A atividade da GS foi expressa em µmol de  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato produzido por hora, por mg de proteína solúvel (µmol GGH/h.mg prot.).

#### **4.5.3. Determinação da atividade específica da GDH -NADH**

A atividade da enzima GDH foi quantificada por meio da oxidação do NADH no meio de reação, de acordo com Cammaerts & Jacobs (1985). O volume total da reação foi de 3 mL, contendo tampão Tris 100 mM, pH 8,2, 150 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM de 2-oxoglutarato, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,14 mM de NADH.

A reação foi iniciada com a adição de 500 µL do extrato e a absorbância foi lida a 340 nm, logo em seguida e 10 minutos após o início da reação, que foi mantida à temperatura de 30°C. O branco não continha 2-oxoglutarato (Schlee *et al.*, 1994).

A atividade da GDH foi expressa em µmol de NADH oxidado por hora, por mg de proteínas (µmol NADH/h.mg prot.).

#### **4.5.4. Determinação da atividade específica da GOGAT-NADH**

A atividade da enzima GOGAT foi determinada espectrofotometricamente a 30°C, monitorando-se a oxidação do NADH a 340 nm, como descrito por Hungria *et al.* (1991).

O volume total da reação foi de 3 mL, contendo tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, 50 mM de GLN, 100 mM de 2-oxoglutarato e 1 mM de NADH.

A reação foi iniciada com a adição de 600 µL do extrato e a mistura mantida a 30°C. Alíquotas da amostra foram coletadas aos 0, 15 e 30 minutos após a adição do extrato e a absorbância foi lida a 340 nm.

A atividade da GOGAT foi expressa em µmol de NADH consumido por hora, por mg de proteínas (µmol NADH/h.mg prot.).

#### **4.5.5. Determinação da atividade específica da GOGAT-Fd**

Para a determinação da enzima GLU Sintase dependente de ferredoxina, metil viologênio reduzido foi usado como doador de elétrons no lugar de ferredoxina (Matoh *et al.*, 1979). O ensaio continha, em um volume total de 375 µL, 7 mM de GLN, 6 mM de 2-oxoglutarato, 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,5), 12 mM de metil viologênio e 100 µL de extrato. Após a pré-incubação a 25°C por 5 minutos a reação foi iniciada com 25 µL de agente redutor (50 mg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e 50 mg de NaHCO<sub>3</sub> em 1 mL de água). A reação foi interrompida após 20 minutos pela adição de 250 µL de metanol e agitação vigorosa. O GLU formado pela reação foi separado da GLN em uma coluna cromatográfica de troca aniônica Dowex acetato (100-200 µm), previamente equilibrada com 0,1% (v/v) de ácido acético (Matoh *et al.*, 1980). A GLN foi eluída da coluna com 4 mL de água e o GLU eluído em 1,5 mL com ácido acético 3 M. Este método resultou em uma recuperação de 95-97% do GLU.

O GLU foi quantificado usando-se ninhidrina conforme o método de Matoh *et al.* (1979). Uma alíquota de 0,33 mL do eluato foi misturado com 0,66 mL da solução de ninhidrina (0,4 g de ninhidrina, 1 g de CdCl<sub>2</sub>, 80 mL de etanol a 95%, 10 mL de ácido acético, 20 mL água) e incubado junto com o padrão de GLU por 10 minutos a 80°C. A absorvância foi medida a 506 nm.

A atividade da GOGAT-Fd foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de GLU por hora, por mg de proteínas ( $\mu\text{mol}$  GLU/h.mg prot.).

#### **4.6. Atividade específica da nitrogenase (ARA)**

Para avaliar a eficiência dos nódulos radiculares quanto à fixação de N<sub>2</sub>, foi feita a determinação da atividade específica da N<sub>2</sub>ase, utilizando-se a técnica de redução de acetileno (ARA), como descrita por Hardy *et al.* (1968), com algumas modificações, utilizando-se plantas intactas (Gomes & Sodek, 1987).

Plantas com nódulos radiculares foram mantidas em vasos e estes envolvidos com sacos plásticos e fechados hermeticamente ao redor do caule. Os sacos possuíam uma rolha de borracha que permitia a retirada, com seringa, de 10% da atmosfera interior e o preenchimento do mesmo volume com acetileno puro. Foram feitas medidas preliminares do etileno liberado de 10 em 10 minutos para verificação da atividade da N<sub>2</sub>ase. Foi constatado que a liberação do etileno era linear e crescente durante 3 ½ horas. Com base nestes dados, foram estabelecidos intervalos de 0, 30 e 60 minutos de incubação. Para a dosagem da quantidade de etileno liberada, amostras de 0,5 mL foram retiradas dos frascos e injetadas em um aparelho de cromatografia gasosa (Shimadzu GC-14B) com detector de ionização de chama, utilizando-se uma coluna "HayeSepT". O gás de arraste utilizado foi N<sub>2</sub>, a um fluxo de 20 mL/minuto. As

temperaturas mantidas no aparelho foram 80°C para a coluna, 100°C no injetor e 150°C no detector. Para preparação dos padrões foram utilizados etileno e acetileno puros, ambos da White Martins.

As avaliações quantitativas do etileno liberado no interior dos vasos foram feitas a partir da comparação com o padrão de etileno, e os dados transformados em  $\mu\text{mol}$  de etileno/h. g MF de nódulos.

#### 4.7. Teor de pigmentos fotossintéticos

A determinação de pigmentos foi realizada de acordo com Hiscox & Israelstam (1979). Amostras de 0,5 g de tecido fresco de folhas foram coletadas em frascos escuros contendo 7 mL de DMSO e mantidas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. A coleta dos tecidos vegetais foi realizada em triplicata em cada experimento. Todo o processo de extração e manipulação dos extratos contendo os pigmentos fotossintéticos foi realizado na penumbra.

A absorvância da clorofila *a* foi lida em 661,6 nm; da clorofila *b* em 644,8 nm e a dos carotenóides em 470 nm. Os cálculos da concentração das clorofilas *a* ( $C_a$ ), *b* ( $C_b$ ), *a+b* ( $C_{a+b}$ ) e dos carotenóides ( $C_c$ ) foram realizados de acordo com as equações definidas em Lichtenthaler (1987). As concentrações obtidas pela inserção dos valores da absorvância nas equações apresentadas a seguir foram expressas em  $\mu\text{g}$  por mL do extrato:

$$C_a = 11,24 \cdot A_{661,6} - 2,04 \cdot A_{644,8}$$

$$C_b = 20,13 \cdot A_{644,8} - 4,19 \cdot A_{661,6}$$

$$C_{a+b} = 7,05 \cdot A_{661,6} + 18,09 \cdot A_{644,8}$$

$$C_c = (1000 \cdot A_{470} - 1,90 C_a - 63,14 C_b) / 214$$

O teor de clorofilas ou carotenóides dos tecidos foi expresso em  $\mu\text{g}$  do pigmento por mg de MF.

#### 4.8. Teor de N total

Amostras de 0,1 g de material vegetal seco (folhas, raízes ou nódulos), foram envolvidas em pequenos lenços de papel e transferidas para tubos de digestão (tipo Folin-Wu), contendo 1g de mistura digestora (1000 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  + 100 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 10 g de Se) e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Um pequeno funil foi colocado sobre cada tubo, visando garantir um refluxo eficiente do líquido durante a digestão e minimizar as perdas do ácido. Os tubos foram colocados em um bloco digestor e aquecidos lentamente a  $360^\circ\text{C}$ , e as amostras foram digeridas ao ponto de ebulição da mistura por aproximadamente 60 minutos, até a obtenção de um extrato incolor. Os tubos foram esfriados à temperatura ambiente e o extrato usado para a dosagem de N.

A determinação do N total foi feita pelo método de Kjeldahl, conforme descrito por Nelson & Sommers (1973). Dessa forma, no destilador, foram adicionados 15 mL de NaOH 10 N ao tubo de digestão, 20 mL de solução de ácido bórico-indicador a 2% (80 g de ácido bórico em água destilada aquecida a  $60\text{-}70^\circ\text{C}$ ) e 0,8 mL de mistura indicadora (0,30 g de verde de bromocresol + 0,165 g de vermelho de metila em 0,5 mL de etanol). Por este método, o N orgânico é convertido a sulfato de  $\text{NH}_4^+$  através da oxidação da matéria orgânica com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a quente. Para a titulação do  $\text{NH}_4^+$  o procedimento foi feito em aparelho de titulação (Mod. 775 Dosimat – METROHM) com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,07143 N e o teor de N assim determinado.

A quantidade de N total de cada amostra, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{mg N/g MS} = \text{mL H}_2\text{SO}_4 (\text{amostra}) - \text{mL H}_2\text{SO}_4 (\text{branco}) \times \text{FC} (0,07)$$

#### **4.9. Extração de solutos de tecidos vegetais por MCW**

Amostras de material vegetal seco em estufa a 65°C, foram homogeneizadas em 5,0 mL de solução MCW (metanol:clorofórmio:água, 12:5:3 v/v/v), conforme Bielecki & Turner (1966) e deixadas em repouso por 12 horas. O homogeneizado foi centrifugado a 2.000 x g por 30 minutos e coletado o sobrenadante. A 4,0 mL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada para a separação da fase aquosa, utilizada para realização das dosagens, de carboidratos, URE, ALT, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> livre,

##### **4.9.1. Teor de carboidratos**

Os teores de sacarose foram determinados de acordo com o método proposto por Handel (1968), onde à amostra e padrões (20-100 µg de sacarose) foi adicionado KOH a 30%, em solução aquosa. Estes tubos foram incubados em banho-maria a 100°C, por 10 minutos e resfriados à temperatura ambiente. Foram adicionados 3 mL do reagente de antrona (antrona a 0,15% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 70%) a cada tubo e estes agitados e mantidos em banho a 40°C por 15 minutos. A absorbância foi lida a 620 nm e o resultado expresso em µg sacarose/mg MS.

O teor de açúcares solúveis totais foi medido segundo o método de Graham & Smydzuk (1965). A 1,0 mL da fração a ser dosada, foram adicionados 2,0 mL de solução de antrona a

0,2% em ácido sulfúrico. A mistura foi agitada e aquecida a 90°C por 20 minutos. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 620 nm.

Os valores de absorvância obtidos foram relacionados com a concentração de açúcares totais por meio de uma curva padrão preparada com glicose, na faixa de 10-50 µg/mL. Os valores das concentrações de açúcares foram expressos como µg de glicose/mg MS.

#### **4.9.2. Teor de ureídeos totais**

A determinação dos URE em seiva ou extrato em MCW foi feita em triplicata para cada tratamento, pelo método colorimétrico de Vogels & Van Der Drift (1970), através da hidrólise básica e ácida dos URE, seguida de reação com fenil-hidrazina e  $K_3[FCN_6]$ .

De acordo com este método, 25 µL da amostra foram misturados a 0,25 mL de NaOH 0,5 N e 0,5 mL de água destilada. A hidrólise alcalina foi obtida quando os reagentes foram aquecidos em banho-maria a 100°C, por 8 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e submetidos à hidrólise ácida, quando a eles foi adicionado 0,25 mL de HCl 0,65 N e aquecidos a 100°C por 4 minutos. Os tubos foram novamente resfriados à temperatura ambiente e a eles adicionados 0,25 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 0,25 mL fenil-hidrazina a 0,33%. Os tubos foram deixados por 5 minutos em temperatura ambiente e resfriados em gelo. Para a obtenção do composto colorido, foram adicionados 1,25 mL de HCl concentrado a 0°C e 0,25 mL de  $K_3FCN_6$  a 1,65%. Após agitação as reações foram deixadas por 15 minutos em repouso e em seguida a leitura foi feita a 535 nm.

A curva padrão foi obtida por diluições de alantoína na faixa de 0 a 100 nmol/mL. Os valores das concentrações de URE foram expressos em nmol/mL de seiva ou mg MS de tecido.

#### 4.9.3. Teor de aminoácidos livres totais

A determinação da concentração de ALT foi feita pelo método de Yemm & Cocking (1955), por reação colorimétrica com ninhidrina.

A reação foi efetivada com 1 mL de amostra de seiva ou do extrato obtido em MCW (10x diluída). Adicionou-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 5,0; 0,2 mL de ninhidrina em 5% de metil celusolve; 1,0 mL de KCN a 2% de uma solução de KCN 0,01 M em metil-celusolve (éter monometílico de etilenoglicol). Esta mistura foi mantida em banho-maria a 100°C, por 20 minutos. Após resfriamento foi adicionado etanol a 60% até obter o volume de 4 mL de solução. A absorbância foi lida a 570 nm e os valores obtidos foram relacionados com a concentração de ALT por meio de uma curva padrão preparada com leucina, na faixa de 0-200 nmoles/mL. Os valores das concentrações de ALT foram expressos como nmol de aa/mL de seiva ou mg de MS.

#### 4.9.4. Teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> livre

O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> livre contido nos extratos dos tecidos vegetais e na seiva foi determinado de acordo com a reação fenol-hipoclorito (Mitchell, 1972), modificada por Felker (1977).

Aliquotas de extratos ou seiva com 450 µL de água foram distribuídas em tubos de ensaio aos quais adicionou-se 2,5 mL do reagente A (5 g de fenol + 25 mg de nitroprussida em 0,5 L de solução aquosa). A seguir acrescentou-se 2,5 mL do reagente B (15 g de NaOH + 0,31 g de dicloroisocianurato de sódio em 0,5 L de solução aquosa). Os tubos de reação foram vigorosamente agitados em vórtex e após 30 minutos a absorbância foi lida em 630 nm.

O NH<sub>4</sub>Cl foi utilizado para a elaboração de curva padrão. O teor do íon livre foi expresso em nmol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg de MS ou mL de seiva.

#### 4.10. Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada entre 10:30 e 12:30h, de acordo com o método descrito por McClure & Israel (1979) . Foi feito um corte na altura do nó coltedonar das plantas, separando-se a parte aérea das raízes. A região foi lavada com água destilada e seca com papel absorvente. Em seguida a seiva foi coletada com o auxílio de microcapilares de vidro e colocada em eppendorfs mantidos em gelo. Após a coleta, o material foi conservado em freezer para posteriores dosagens de URE,  $\text{NH}_4^+$  livre e ALT.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

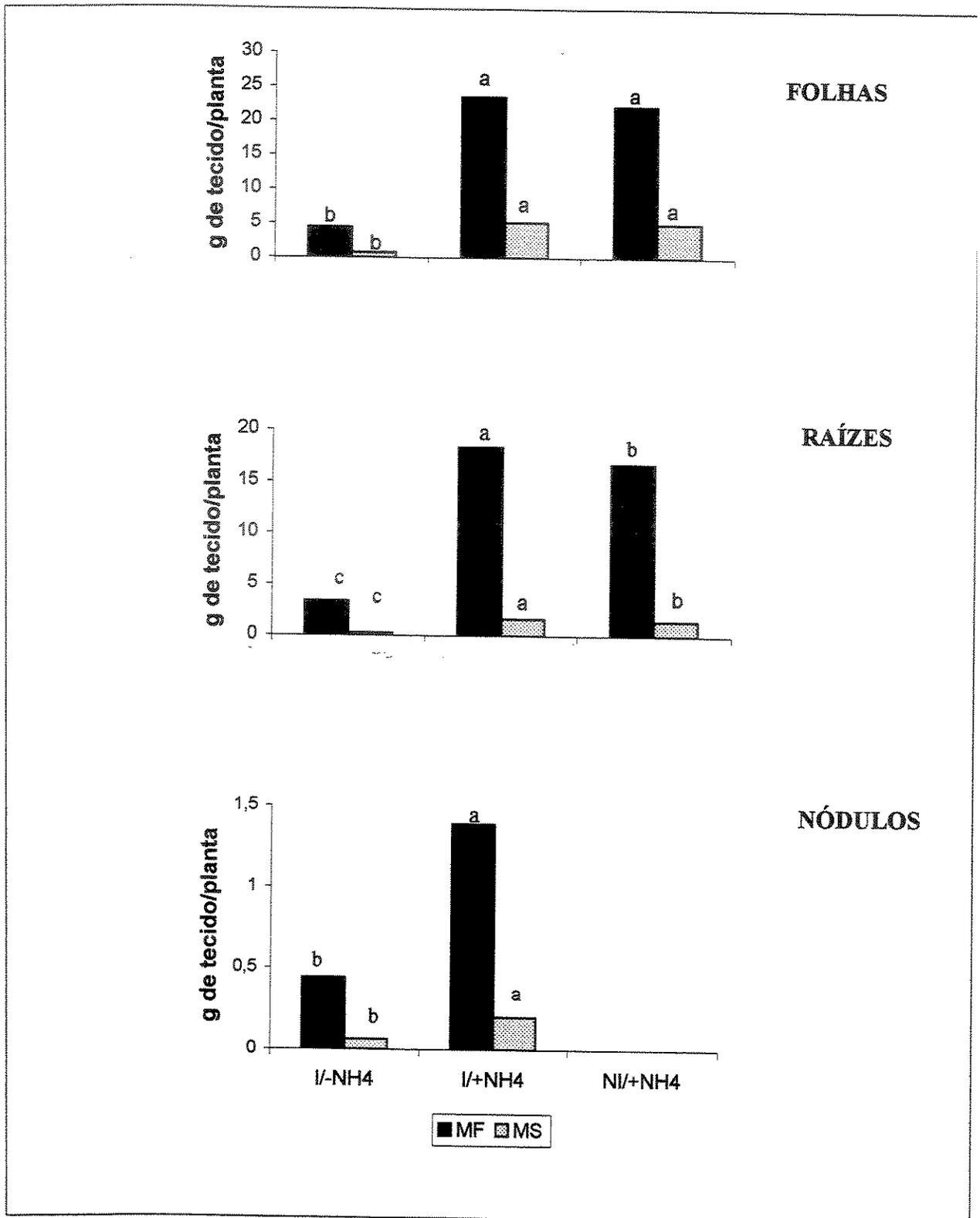
### 5.1 Crescimento de plantas

Aos 60 dias de cultivo foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto às características de crescimento analisadas (MF e MS) nos tecidos das plantas (figura 1).

Houve um incremento significativo em MF e MS da parte aérea tanto em plantas que receberam inóculo e  $\text{NH}_4^+$  (I/ $\text{NH}_4^+$ ), quanto em plantas que receberam apenas  $\text{NH}_4^+$  (NI/ $\text{NH}_4^+$ ), em relação às plantas que foram apenas inoculadas (I/ $\text{NH}_4^+$ ). Provavelmente, o NFB (N fixado biologicamente) não tenha sido suficiente para promover o acúmulo de massa sem a presença de N mineral ( $\text{NH}_4^+$ ), como já havia sido observado em outras espécies (Buttery & Dirks, 1987; Mendonça & Schiavinato, 1996). Comportamento semelhante foi observado ao se analisar o acúmulo de MF e MS em raízes. Porém, nesse caso, as plantas I/ $\text{NH}_4^+$  apresentaram maior massa que as não inoculadas (NI/ $\text{NH}_4^+$ ), indicando que a inoculação, de alguma forma contribuiu para o crescimento das raízes.

Alguns trabalhos têm evidenciado que as fontes de N podem alterar a partição de MS entre parte aérea e raízes. Em plantas de soja, a razão parte aérea/raiz foi aumentada quando o  $\text{NH}_4^+$  era a única fonte de N (Vessey *et al.*, 1990), o que não foi constatado em *C. juncea*, onde esta razão foi de 2,8 em plantas I/ $\text{NH}_4^+$  e de 3,4 em plantas NI/ $\text{NH}_4^+$ .

Os valores médios de MF e MS dos nódulos no tratamento em que as duas fontes de N estavam presentes (I/ $\text{NH}_4^+$ ) foram significativamente superiores aos do tratamento em que o  $\text{NH}_4^+$  não estava presente (I/ $\text{NH}_4^+$ ). O fornecimento de ambas as fontes de N (I/ $\text{NH}_4^+$ ), pode ter proporcionado condições favoráveis à fotossíntese (Hogh-Jensen & Schejoerring, 1997) e conseqüentemente maior produção de massa em geral. Efeitos inibitórios do  $\text{NH}_4^+$  sobre o



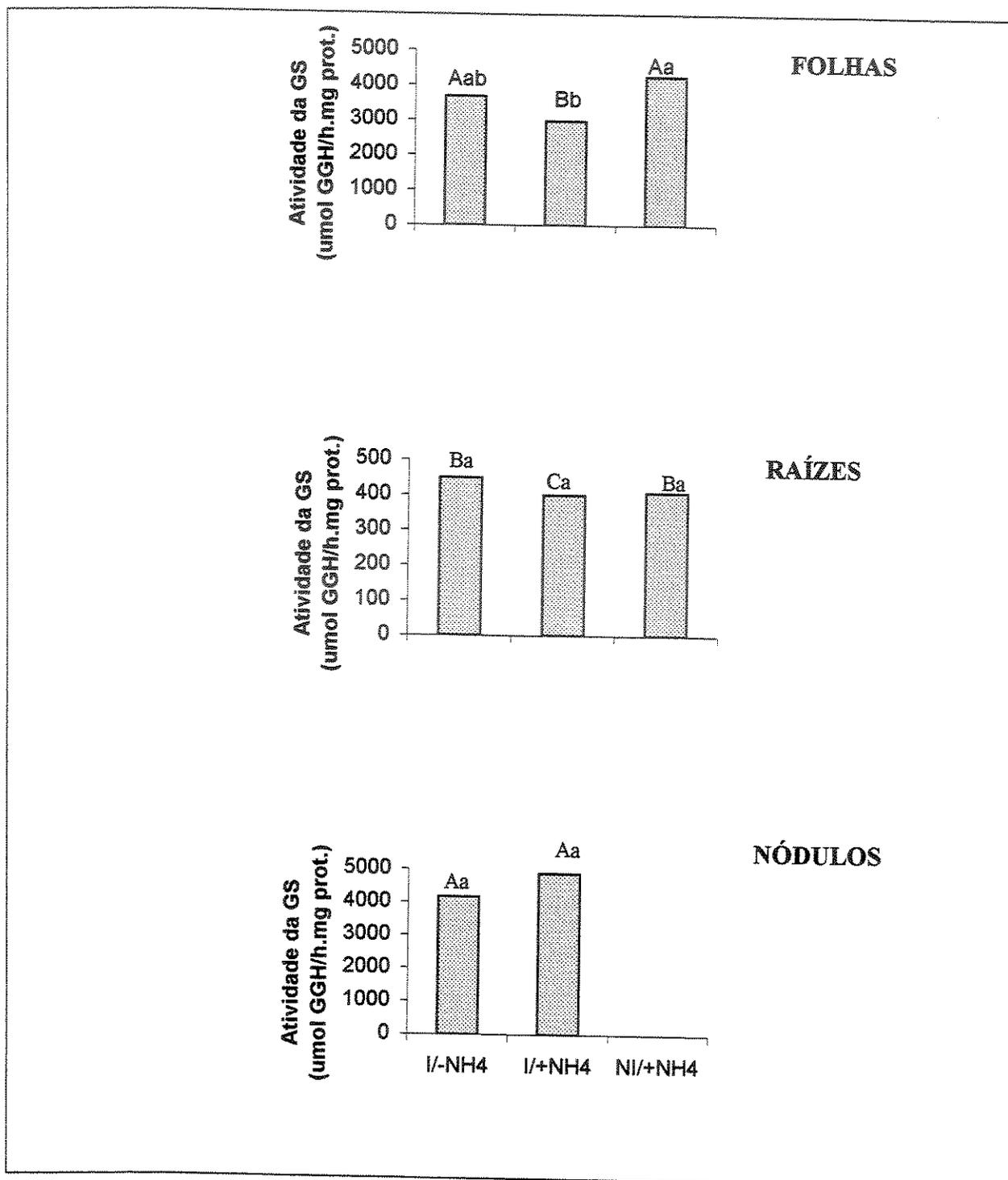
**Figura 1.** Produção de massa fresca (MF) e seca (MS) em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Dentro de cada tecido e de cada tipo de matéria, barras com letras distintas diferem significativamente (Tukey, 5%).

crescimento das plantas e produção de nódulos têm sido atribuídos à acidificação do meio externo, promovida por este cátion, e também à utilização de concentrações excessivamente elevadas de  $\text{NH}_4^+$  nos meios de cultura ou soluções nutritivas (Bloom, 1988; Cheng *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2000). Relatos na literatura citam efeitos significativamente inibitórios de 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  sobre o crescimento de plantas de soja (Chaillou *et al.*, 1991), de 10 mM de  $\text{NH}_4^+$  em milho (Magalhães *et al.*, 1995) e de 3 mM de  $\text{NH}_4^+$  em cevada (Lang & Kaiser, 1994) crescidas em soluções nutritivas.

Neste trabalho, as plantas de *C. juncea* que receberam 7,16 mM de  $\text{NH}_4^+$  (20 mg de N/planta/semana) cresceram melhor na presença desta fonte nitrogenada, com ou sem inoculação. Este fato pode ser constatado quando analisamos o valor de MF de nódulos radiculares de plantas inoculadas que receberam  $\text{NH}_4^+$  (I/+ $\text{NH}_4^+$ ) que foi quase três vezes superior ao de plantas que tiveram restrição ao  $\text{NH}_4^+$ , sendo apenas inoculadas (I/- $\text{NH}_4^+$ ). Segundo Hungria *et al.* (1991) e Berez *et al.* (1997) a forma e/ou a concentração de N pode(m) influenciar a distribuição final da massa entre as partes da planta. O maior crescimento das plantas de *C. juncea* que receberam  $\text{NH}_4^+$ , pode estar associado à disponibilidade de carboidratos (sacarose e os produtos de sua degradação) junto ao sistema radicular. A sacarose forneceria os esqueletos de carbono necessários à incorporação, em compostos orgânicos, de parte do  $\text{NH}_4^+$  absorvido e/ou oriundo da fixação (Cheng *et al.*, 1999).

## 5.2 Atividade da GS

A atividade da GS em folhas e em nódulos superou a atividade específica desta nos tecidos radiculares, em todos os tratamentos realizados, independentemente das fontes de N disponíveis para o crescimento das plantas (figura 2).



**Figura 2.** Atividade específica da enzima GS em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

Um primeiro aspecto que se destacou no estudo da GS em plantas de *C. juncea* que receberam  $\text{NH}_4^+$  foi o de que a atividade da enzima em folhas de plantas não inoculadas ( $\text{NI}/+\text{NH}_4^+$ ) foi estatisticamente maior que naquelas inoculadas ( $\text{I}/+\text{NH}_4^+$ ). A atividade da enzima no tratamento  $\text{NI}/+\text{NH}_4^+$  foi de 4256  $\mu\text{mol GGH}/\text{h.mg prot.}$ , que rendeu uma atividade 16% maior que na ausência de  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{I}/-\text{NH}_4^+$ ) com 3681  $\mu\text{mol GGH}/\text{h.mg prot.}$ , e 43% maior que na presença de  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{I}/+\text{NH}_4^+$ ) em que a atividade foi de 2976  $\mu\text{mol GGH}/\text{h.mg prot.}$

A literatura cita que, em cinco espécies de árvores do cerrado e de florestas do sudeste brasileiro, cultivadas em solução nutritiva, a atividade da GS foi consistentemente maior nas folhas do que nas raízes (Stewart *et al.* 1992). Plantas cultivadas, como o arroz, o milho e o tomateiro, também apresentaram maior atividade da GS nas folhas (Magalhães & Huber, 1991). No caso de *C. juncea* a atividade em folhas foi 9,7 vezes maior que em raízes. Migge *et al.* (2000) relacionaram o aumento da atividade da GS em folhas de tabaco com a diminuição do “pool” de  $\text{NH}_4^+$  e o aumento da concentração de alguns ALT.

Grande parte da atividade da GS foliar corresponde à isoenzima dos cloroplastos,  $\text{GS}_2$ , que desempenha papel fundamental na assimilação do  $\text{NH}_4^+$  gerado na fotorrespiração (Oaks, 1994a; Migge *et al.* 2000; Fuentes *et al.* 2001). A GS citoplasmática tem sido associada aos processos que envolvem mobilização e transporte de N na planta (Oaks, 1994b; Migge *et al.* 2000). Neste trabalho, a atividade da GS foi estatisticamente equivalente em raízes de plantas cultivadas nas diferentes fontes de N, porém numericamente, raízes de plantas que cresceram na ausência de  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{I}/-\text{NH}_4^+$ ), com 448  $\mu\text{mol GGH}/\text{h.mg prot.}$ , tiveram atividade 12% maior que nos demais tratamentos ( $\text{I}/+\text{NH}_4^+$  e  $\text{NI}/+\text{NH}_4^+$ ) nos quais as atividades foram, respectivamente, 400 e 407  $\mu\text{mol GGH}/\text{h.mg prot.}$

Alguns estudos têm mostrado que em determinadas espécies, a atividade da GS aumenta em resposta ao aumento da concentração externa do  $\text{NH}_4^+$ . Em raízes de plantas de

beterraba (Raab & Terry, 1995) e nas partes aéreas e raízes de plantas de arroz, a atividade da GS aumentou em função de concentrações crescentes de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva. Em plantas de arroz, entretanto, a atividade da GS na parte aérea respondeu mais intensamente ao  $\text{NH}_4^+$  do que as raízes (Magalhães & Huber, 1991). Ao contrário da literatura, em *C. juncea* a presença, exclusiva ou não, do  $\text{NH}_4^+$  não exerceu efeito significativo sobre a atividade da GS em raízes e nódulos.

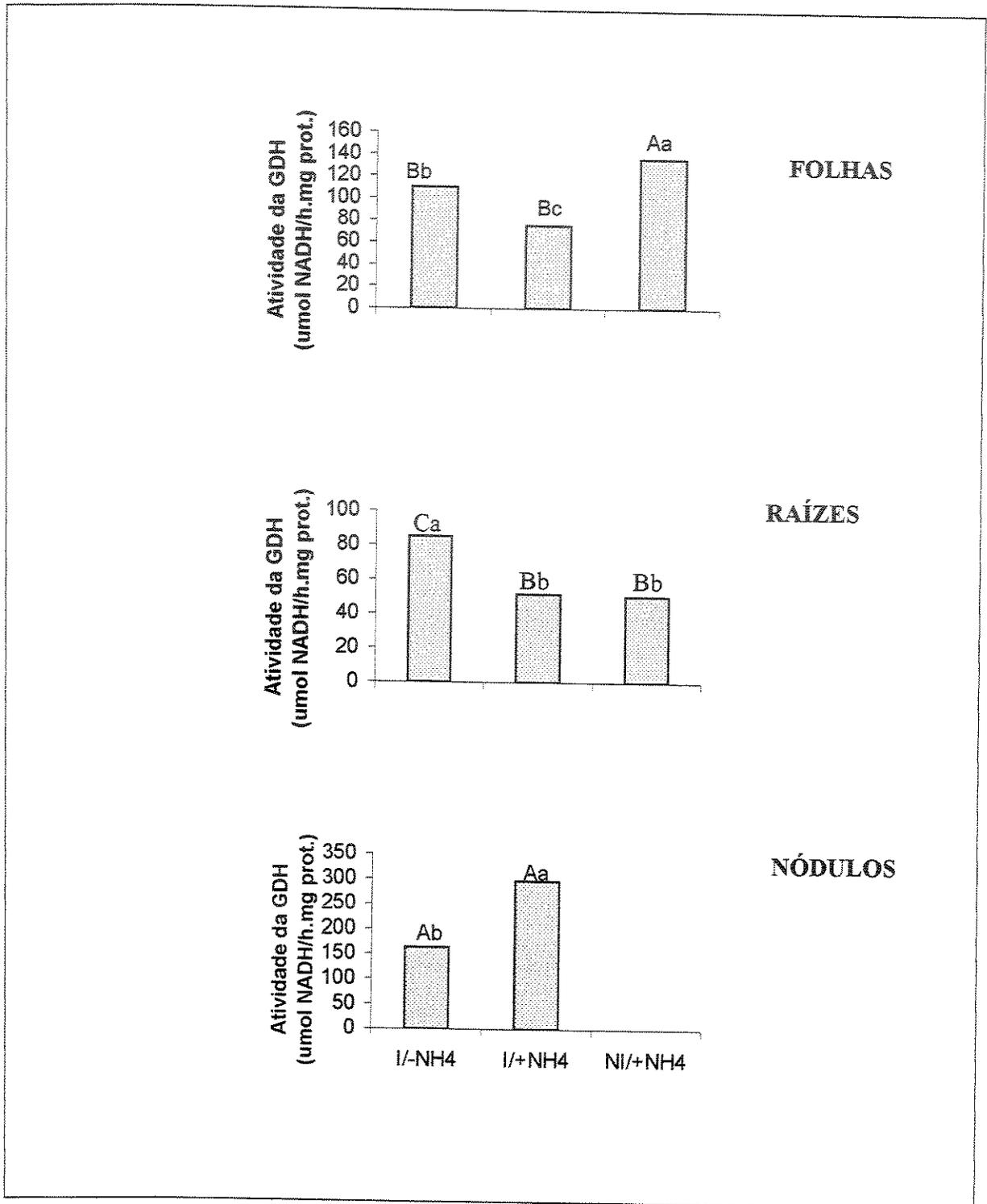
Em nódulos, as atividades nos tratamentos  $I\text{-NH}_4^+$  e  $I\text{+NH}_4^+$  foram semelhantes, sendo que, quando o  $\text{NH}_4^+$  estava presente ( $I\text{+NH}_4^+$ ) a atividade específica foi de 4870  $\mu\text{mol GGH/h.mg prot.}$ , o que proporcionou uma atividade 15% maior que em sua ausência ( $I\text{-NH}_4^+$ ) com 4237  $\mu\text{mol GGH/h.mg.prot.}$

O tratamento com inóculo e  $\text{NH}_4^+$  juntos ( $I\text{+NH}_4^+$ ) proporcionou atividade da GS em nódulos 1,6 vez maior que em folhas e 12,6 vezes maior que em raízes. Já, em plantas inoculadas que não receberam  $\text{NH}_4^+$  ( $I\text{-NH}_4^+$ ), a atividade da GS em nódulos foi apenas 1,1 vez maior que em folhas e quase 10 vezes maior que em raízes. Limani *et al.* (1990) relataram que, em leguminosas, a atividade da GS é maior em nódulos que nos demais tecidos, em virtude do fluxo de  $\text{NH}_4^+$  liberado do bacteróide durante a redução do  $\text{N}_2$ .

Em síntese, os resultados indicam que as plantas de *C. juncea* apresentaram, em geral, maior atividade da GS em folhas que em raízes e que em plantas inoculadas a tendência foi apresentar maior atividade em nódulos radiculares do que nos demais tecidos.

### 5.3 Atividade da GDH-NADH

A atividade desta enzima em folhas foi significativamente diferente nos três tratamentos (figura 3). As plantas não inoculadas que receberam  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{NI+NH}_4^+$ ) apresentaram maior



**Figura 3.** Atividade específica da enzima GDH-NADH em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

atividade (136  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$ ), seguidos do tratamento I/ $\text{NH}_4^+$  com 110  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$  As formas de N, inorgânicas ou fixadas biologicamente, proporcionaram isoladamente maiores atividades pois, quando as duas fontes de N estavam disponíveis (I/ $+\text{NH}_4^+$ ), a atividade enzimática foi menor (75  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$ ).

Em raízes, o tratamento exclusivamente com inoculante (I/ $\text{NH}_4^+$ ) apresentou uma atividade de GDH 70% superior à dos demais tratamentos (85  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$ ). Os menores valores da atividade específica nos dois tratamentos com  $\text{NH}_4^+$  (I/ $+\text{NH}_4^+$  e NI/ $+\text{NH}_4^+$ ) podem ter sido consequência do efeito estimulador deste íon sobre a biossíntese de proteínas solúveis nas raízes das plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ . Em raízes de tomateiro e de milho a atividade da GDH aumentou linearmente em resposta ao aumento das concentrações de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva, sugerindo que a GDH estivesse atuando no sentido aminativo, ou seja, incorporando  $\text{NH}_4^+$  em aa (Magalhães & Huber, 1991).

Na presença de inibidor MSO (metionina sulfoximina) da GS, raízes de tomateiro continuaram a incorporar  $^{15}\text{N}$  em aa, indicando que a GDH poderia estar atuando na assimilação primária de N naqueles tecidos (Magalhães, 1991).

Magalhães e Huber (1991) verificaram também que o aumento da concentração de  $\text{NH}_4^+$  na solução nutritiva não alterou a atividade de GDH em raízes de plantas de arroz. Os autores observaram ainda, que a elevação da atividade da GDH em raízes de milho e de tomateiro foi negativamente correlacionada com o crescimento das plantas, mas que em eixos caulinares de plantas de arroz a atividade enzimática triplicou na presença de  $\text{NH}_4^+$ .

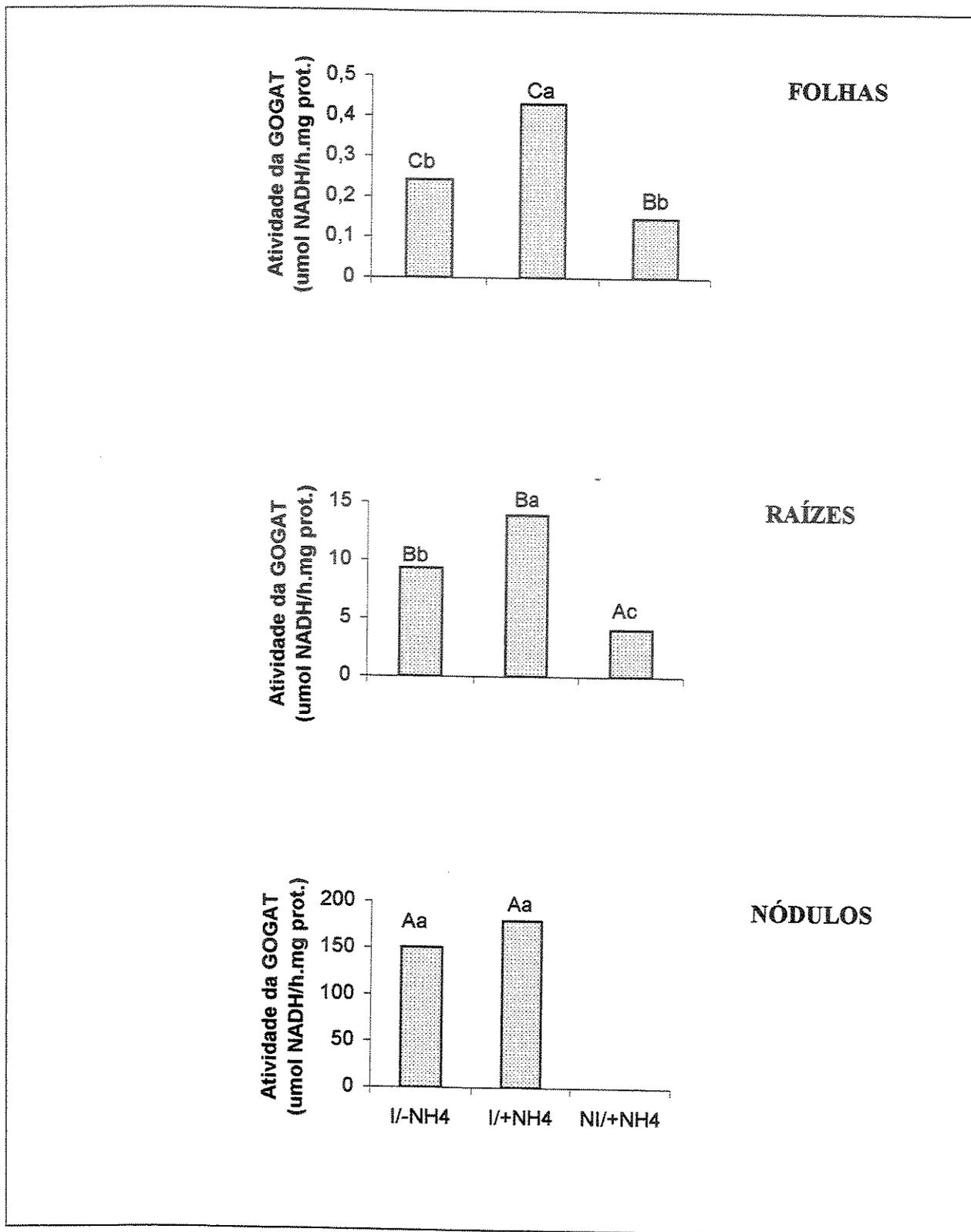
Segundo Lea *et al.* (1990), raízes e órgãos em senescência geralmente apresentam atividade mais elevada da GDH. Todavia em *C. juncea*, a atividade desta enzima foi maior em folhas que em raízes, em todos os tratamentos.

Em nódulos de plantas de *C. juncea* que receberam  $\text{NH}_4^+$  (I/+ $\text{NH}_4^+$ ) houve maior atividade da enzima (296  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$ ) que em plantas I/- $\text{NH}_4^+$  (163  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$ ). Desta forma, a enzima GDH nos nódulos das plantas que receberam  $\text{NH}_4^+$ , poderia estar atuando também no sentido aminativo na presença de  $\text{NH}_4^+$  de origem endógena e exógena e no sentido desaminante para suprir energia e esqueletos de carbono. Sabe-se que a limitação de carbono estimula a atividade da GDH, o que fortalece a hipótese de que a atividade desaminante da GDH exerce papel importante no controle do metabolismo intermediário dos tecidos vegetais (Lea *et al.*, 1990).

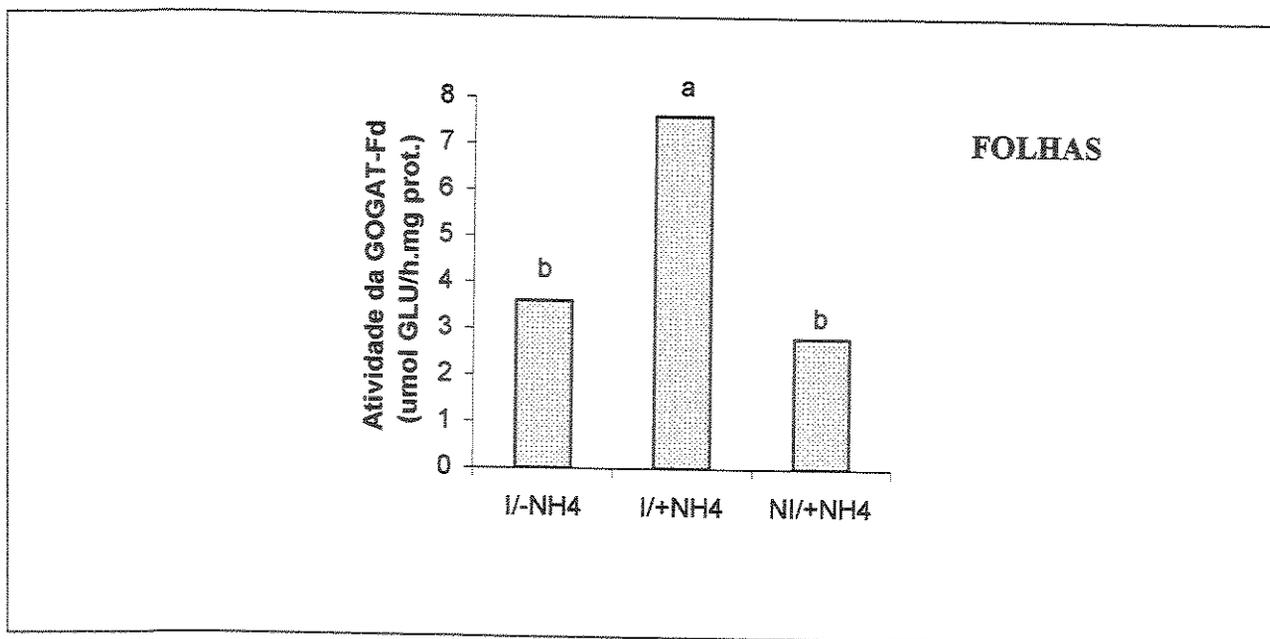
#### 5.4 Atividade da GOGAT-NADH e GOGAT-Fd

De modo geral a atividade da GOGAT-NADH em folhas foi baixa (figura 4). Verificou-se atividade mais alta no tratamento I/+ $\text{NH}_4^+$ , que se diferenciou estatisticamente dos demais, com 0,430  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$ , enquanto no tratamento sem  $\text{NH}_4^+$  (I/- $\text{NH}_4^+$ ) a atividade específica foi de 0,241  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$  e em plantas não inoculadas (NI/+ $\text{NH}_4^+$ ) foi de 0,147  $\mu\text{mol NADH/h.mg prot.}$

O fato da atividade da GOGAT dependente de NADH ser muito baixa em folhas leva a sugerir que esta enzima tenha baixa expressividade nas folhas de *C. juncea*, e por isso foi feita a estimativa de outra enzima, a GOGAT dependente de ferredoxina (GOGAT-Fd). O perfil da atividade da GOGAT-Fd (figura 5) foi exatamente o mesmo da GOGAT-NADH, com maior atividade no mesmo tratamento I/+ $\text{NH}_4^+$  (7,5  $\mu\text{mol de Glu/h.mg prot.}$ ). No entanto, esta foi quase 18 vezes maior que quando o substrato usado foi NADH. Assim, conclui-se que a forma predominante em folhas de *C. juncea*, independente do tratamento, é GOGAT-Fd. Migge *et al.* (2000) também observaram em folhas de tabaco maior atividade de GOGAT-Fd.



**Figura 4.** Atividade específica da enzima GOGAT-NADH em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).



**Figura 5.** Atividade específica da enzima GOGAT-Fd em folhas de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Colunas acompanhadas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Em raízes, todos os tratamentos foram diferentes estatisticamente mas, assim como em folhas, o tratamento I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi o que apresentou a maior atividade (figura 4). Ishiyama *et al.* (1998) demonstraram que ao fornecerem N mineral na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aumentou a atividade de GOGAT-NADH em raízes de *Oryza sativa*. No caso de plantas de *C. juncea* que receberam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> isto só ocorreu no tratamento inoculado, pois as raízes de plantas NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram as que apresentaram menor atividade desta enzima.

Em nódulos, os tratamentos com ou sem NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) não apresentaram diferenças significativas quanto à atividade da GOGAT-NADH. Apenas de forma ilustrativa, podemos comparar a atividade de nódulos, que foi 624 vezes maior que em folhas e 16 vezes maior que em raízes no tratamento I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 416 vezes maior que em folhas e 13 vezes maior que em raízes no tratamento I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Matoh & Takahashi (1982) concluíram que a atividade

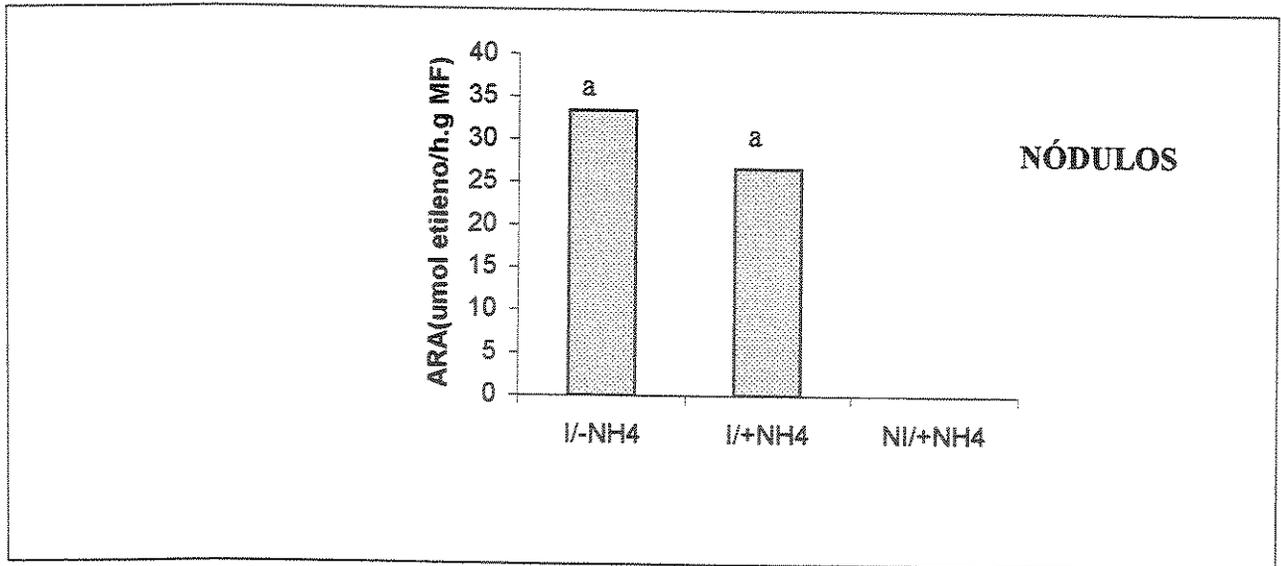
de GOGAT-NADH em folhas jovens de ervilha é predominante e que, durante a maturação, essa atividade diminui e a atividade de GOGAT-Fd aumenta. Isto está de acordo com experimentos com *Pisum sativum* realizados por estes autores, em que o fornecimento de GLN marcada mostrou que cloroplastos imaturos intermediam a conversão de GLN a GLU-NADH, quando carboidratos intermediários estão disponíveis.

Enquanto a GS e a GOGAT-NADH, são responsáveis pela assimilação primária do N em nódulos radiculares e a GS e a GOGAT-Fd contidas nas folhas também desempenham tal papel, a GS/GOGAT-Fd estão mais relacionadas à re-assimilação dos íons  $\text{NH}_4^+$  produzidos em outros processos fisiológicos. A GOGAT-Fd dos cloroplastos das folhas é induzida pela luz, estando relacionada com processos como a fotossíntese e a fotorrespiração. Em plantas C3 a fotorrespiração, que é iniciada pela atividade oxigenase da Rubisco, leva à perda de  $\text{CO}_2$  e de  $\text{NH}_4^+$ . Essa perda de  $\text{NH}_4^+$  pode chegar a ser 10 vezes maior do que a quantidade de N assimilado primariamente. Assim, a planta deve ser capaz de re-assimilar o  $\text{NH}_4^+$  da fotorrespiração, o que é feito pela GOGAT-Fd e pela GDH (Lea *et al.*, 1990).

### 5.5 Atividade da nitrogenase (ARA)

Os dados obtidos com a atividade específica da  $\text{N}_2$ ase (redução de acetileno) são apresentados na figura 6. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, embora em termos absolutos, a atividade da redução de acetileno tenha sido em média 25% maior no tratamento em que não houve adição de  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{I-NH}_4^+$ ) ( $33 \mu\text{mol etileno/h.g MF}$ ).

A diminuição de ARA em experimentos com fontes de N em soja foi atribuída à pequena disponibilidade de carbono para os nódulos, em virtude da competição destes com as vagens em formação (Patterson & Larue, 1983; Sheokand & Swaraj, 1996). Os fotossintatos precisam ser fornecidos continuamente para os nódulos.



**Figura 6.** Atividade da  $N_2$ ase em nódulos radiculares de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) cultivadas por 60 dias na presença (+ $NH_4^+$ ) ou ausência (- $NH_4^+$ ) de amônio. Colunas acompanhadas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Wong & Evans (1971) constataram que, quando o suprimento de açúcares para as raízes é interrompido o principal polímero de carbono acumulado pelos bacteróides de leguminosas, poli- $\beta$ -hidroxibutirato, não é capaz de manter níveis elevados da atividade da  $N_2$ ase. Embora Muller *et al.* (2001) tenham sugerido que a atividade da  $N_2$ ase é sustentada principalmente por um fluxo rápido de fotossintatos, os dados encontrados neste experimento levam à suposição de que no sistema radicular da *C. juncea* deve haver uma quantidade considerável de reserva de carbono, uma vez que a atividade da  $N_2$ ase foi mantida em nível elevado em ambos os tratamentos, embora a massa de folhas e raízes (figura 1) tenha sido bem maior em plantas inoculadas que receberam  $NH_4^+$ .

Como o efeito do N mineral foi praticamente nulo, não afetando de maneira significativa a atividade da enzima, podemos supor, também, que a concentração da  $N_2$ ase por grama de tecido seja praticamente a mesma, como descreveram Bisseling *et al.* (1978) para

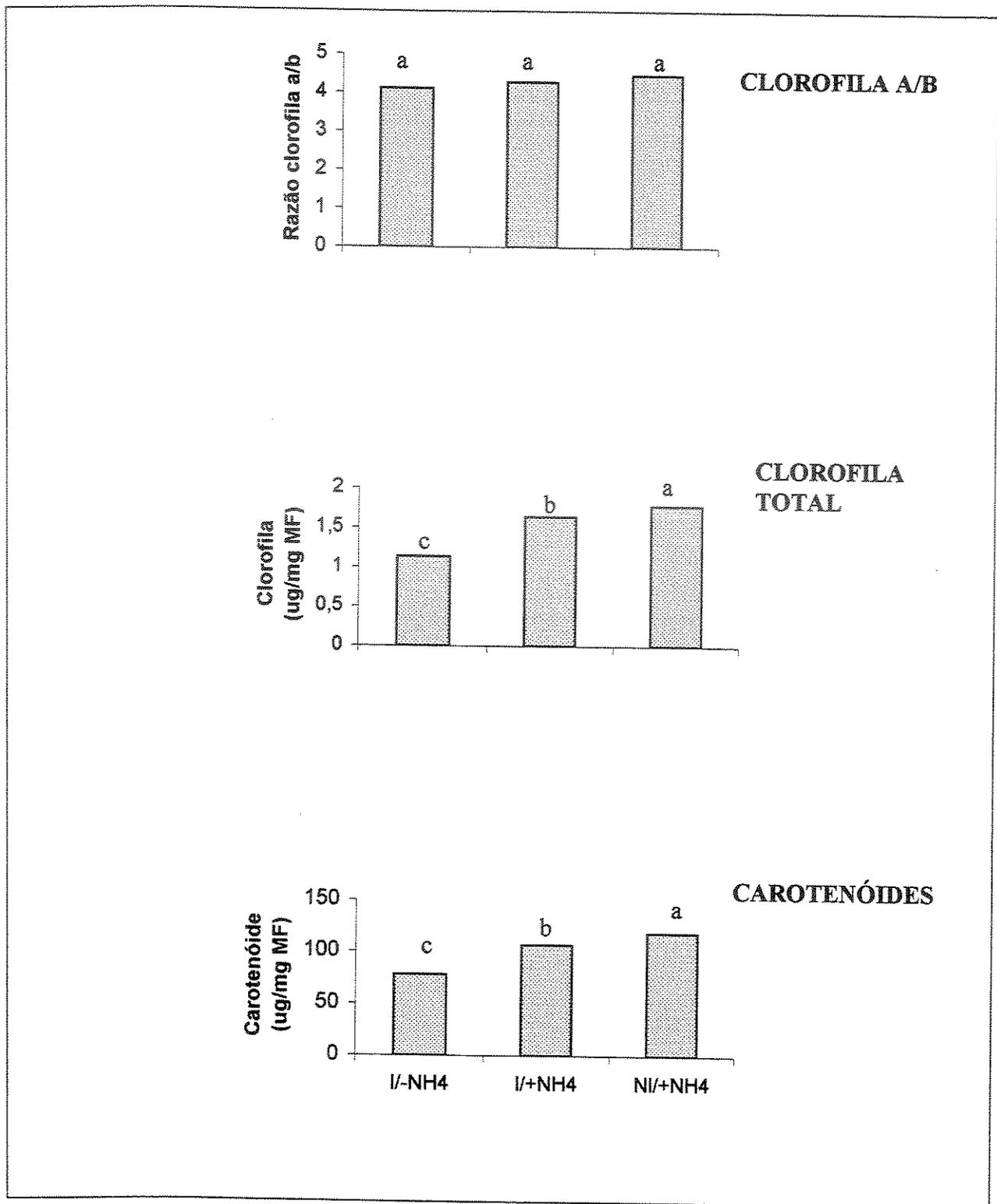
*Pisum sativum*. Gomes & Sodek (1987) observaram que aos 60 dias de idade, plantas de soja *Glycine Max* cv. Santa Rosa apresentaram atividade da N<sub>2</sub>ase em torno de 20-30 μmol de etileno/h/g MF, o que é bem próximo do resultado obtido com *C. juncea* (33 μmol etileno/h/g MF).

Pudemos concluir com estes dados que o íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na dose utilizada não teve influência sobre a fixação do N<sub>2</sub>, já que não inibiu a formação e o crescimento dos nódulos (figura 1) nem a atividade da N<sub>2</sub>ase (redução de acetileno).

### 5.6 Teor de pigmentos fotossintéticos

Não houve diferença entre os tratamentos para a razão clorofila *a/b* (figura 7), todavia o conteúdo total de clorofila (clorofila *a* + clorofila *b*) nos tecidos foi significativamente diferente nos três tratamentos. Ao dosar os pigmentos fotossintéticos nas plantas de *C. juncea*, o intuito foi tentar procurar um parâmetro indicativo da eficiência de conversão das diferentes fontes de N disponíveis em moléculas estruturais e funcionais essenciais, como a clorofila. A presença exclusiva de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) no meio estimulou de modo significativo o aumento de clorofila total nas folhas, proporcionando uma média de 1,78 μg de clorofila total/mg MF. O mesmo ocorreu com carotenóides, para os quais a análise estatística também apontou diferenças entre os tratamentos. A presença exclusiva de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) proporcionou a formação de 118 μg de carotenóides/mg MF, ou seja, 11% a mais que no tratamento em que havia as duas fontes de N (I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), correspondendo a 106 μg/mg MF e 51% a mais que na ausência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), onde o teor de carotenóides foi de 78 μg/mg MF.

A maior quantidade de pigmentos fotossintéticos deve estar vinculada a um maior potencial fotossintético. Sendo assim, plantas de *C. juncea* cultivadas exclusivamente com



**Figura 7.** Teor de clorofila em folhas de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub>) de amônio. Colunas acompanhadas da mesma letra, dentro de cada característica, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

$\text{NH}_4^+$  teriam, em potencial, uma capacidade fotossintética superior às demais. A eficiência desta fonte de N, talvez possa explicar o fato de plantas supridas com  $\text{NH}_4^+$  terem apresentado maior crescimento, como pode ser observado na figura 1.

Os carotenóides funcionam como pigmentos acessórios na absorção da radiação fotossinteticamente ativa. Porém, sua principal função seria proteger a clorofila *a* contra a foto-oxidação (Lichtenthaler, 1987). Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis, constituídos por longas cadeias de hidrocarbonetos contendo duplas ligações alternadas, formadas a partir de unidades de isopreno (Lawlor, 1987). As biossínteses de clorofilas e carotenóides parecem ser processos altamente coordenados, conforme evidenciam os estudos em plantas mutantes de cevada deficientes na biossíntese de clorofila (Kannangara, 1991). O mesmo acontece com os dois tipos de proteínas que se associam com as clorofilas para produzir as unidades fotoquímicas funcionais – as proteínas dos centros de reação e as associadas à captação da energia luminosa (antenas).

A clorofila é um tetrapirrol cíclico, ligado ao magnésio, produzida pelas plantas e bactérias fotossintetizantes. O aa não protéico denominado ácido  $\delta$ -aminolevulínico é a molécula precursora da clorofila, dos grupos heme e de outros tetrapirróis. A via da biossíntese deste ácido tem como precursor inicial o GLU (Kannangara, 1991). Assim, a disponibilidade de N-orgânico na forma de GLU pode influenciar decisivamente a capacidade fotossintética das plantas. Shadchina & Dmitrieva (1995) concluíram que o teor de clorofila das folhas de trigo é uma característica mais apropriada para a avaliação da aquisição de N pelas plantas, sob diferentes condições ambientais, do que a concentração de N foliar. Estes autores sugeriram, ainda, que a estimativa do teor de clorofila pode fornecer um diagnóstico confiável a respeito das condições nutricionais das plantas no campo.

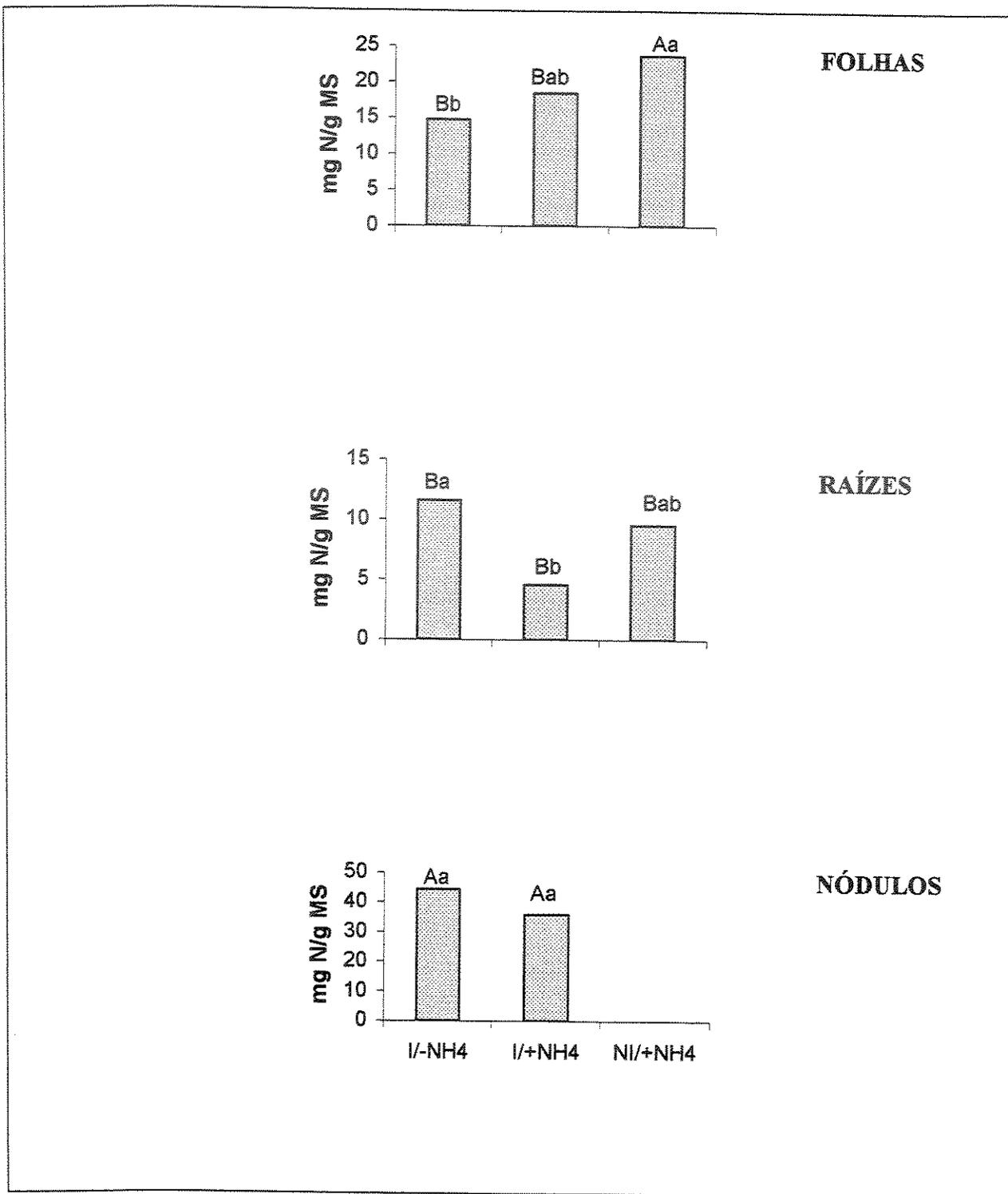
É sabido que as condições de crescimento e fatores ambientais podem modificar a razão clorofila *a/b* das folhas podendo, por exemplo, variar de acordo com a intensidade luminosa a

que as plantas estão expostas. Nas plantas submetidas a elevadas intensidades luminosas a razão clorofila *a/b* situa-se em torno de 3,2-4,0, enquanto que sob baixas intensidades luminosas esta razão é de cerca de 2,0-2,5, de acordo com o grau de organização das membranas dos cloroplastos (Lichtenthaler, 1987). Nas folhas de *C. juncea* cultivadas em casa de vegetação esta razão oscilou entre 4,1 e 4,5, valores característicos de condições nas quais prevalecem altas intensidades luminosas e que apontou padrão de tendência à organização dos tilacóides em grana.

### 5.7 Teor de N total

O resultados da análise do teor de N total nos tecidos de *C. juncea*, são apresentados na figura 8. De modo geral, o tratamento que se destacou em proporcionar maior teor de N total em folhas foi NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, apresentando 23,6 mg N/g MS, ou seja, teor 60% superior ao encontrado em plantas I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com 14,7 mg N/g MS. Plantas de *Sesbania* cultivadas em solo, também acumularam quantidade maior de N na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, em relação a outras fontes de N (Becker & George, 1995).

Heichel & Vance (1983) comentaram a variabilidade genética que existe em leguminosas, quanto à capacidade de fixação de N. Danso *et al.* (1992) confirmaram esta variabilidade em relação à fixação de N em diferentes leguminosas arbóreas. Segundo alguns pesquisadores, o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilado é prontamente translocado para as gemas ou folhas novas sob a forma de aa, amidas e outros compostos que contêm N na sua estrutura, favorecendo o desenvolvimento vegetativo (Buttery & Dirks, 1987; Brown & Walsh, 1994). Nos tratamentos, em que foi realizada inoculação, com ou sem a presença de N mineral (I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), o padrão foi o mesmo, ou seja, o teor de N em folhas não diferiu significativamente, sendo de 18,4 e 14,7 mg N/g MS, respectivamente.



**Figura 8.** Teor de N total em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

A capacidade de fixar N é uma das características importantes das leguminosas e pode ser medida pela quantidade de N assimilado. A relação entre o teor de N e outras características utilizadas para medir o desenvolvimento das plantas pode trazer resultados muito importantes para o estudo da simbiose entre rizóbio e a espécie hospedeira. No caso de raízes, apenas a presença de rizóbio (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) rendeu 11,6 mg N/g MS e este tratamento diferenciou-se estatisticamente daquele contendo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e inoculante juntos (I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) com 4,6 mg N/g MS. Parece que apenas o N<sub>2</sub> fixado biologicamente por plantas I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> justifica o maior acúmulo de N em raízes, quando comparado às plantas I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O teor de N em raízes de plantas apenas inoculadas, não diferiu daquele de plantas que receberam apenas adição de N mineral, embora, em termos absolutos tenha sido maior.

Para os nódulos, apesar da análise estatística não ter revelado diferença significativa entre os tratamentos, numericamente o tratamento que recebeu somente inoculante (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) apresentou teor 24% maior, ou seja, 44,4 mg N/g MS contra 35,8 mg N/g MS nas plantas I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Comparando tecidos em um mesmo tratamento, de um modo geral, podemos concluir que os nódulos apresentaram maior teor de N que folhas e raízes. Comparando-se os dados de crescimento de planta (Figura 1) com os teores de N (figura 8), verifica-se que embora as plantas I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tivessem apresentado menor massa que as plantas dos outros tratamentos, os teores de N foram equivalentes a estes.

### **5.8. Teor de carboidratos**

Quando comparamos os tratamentos quanto ao conteúdo de sacarose quantificado em folhas, verificamos que o tratamento que mais se destacou foi aquele em que as plantas foram inoculadas e cresceram na ausência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), com 6,6 µg sacarose/mg MS. O teor de

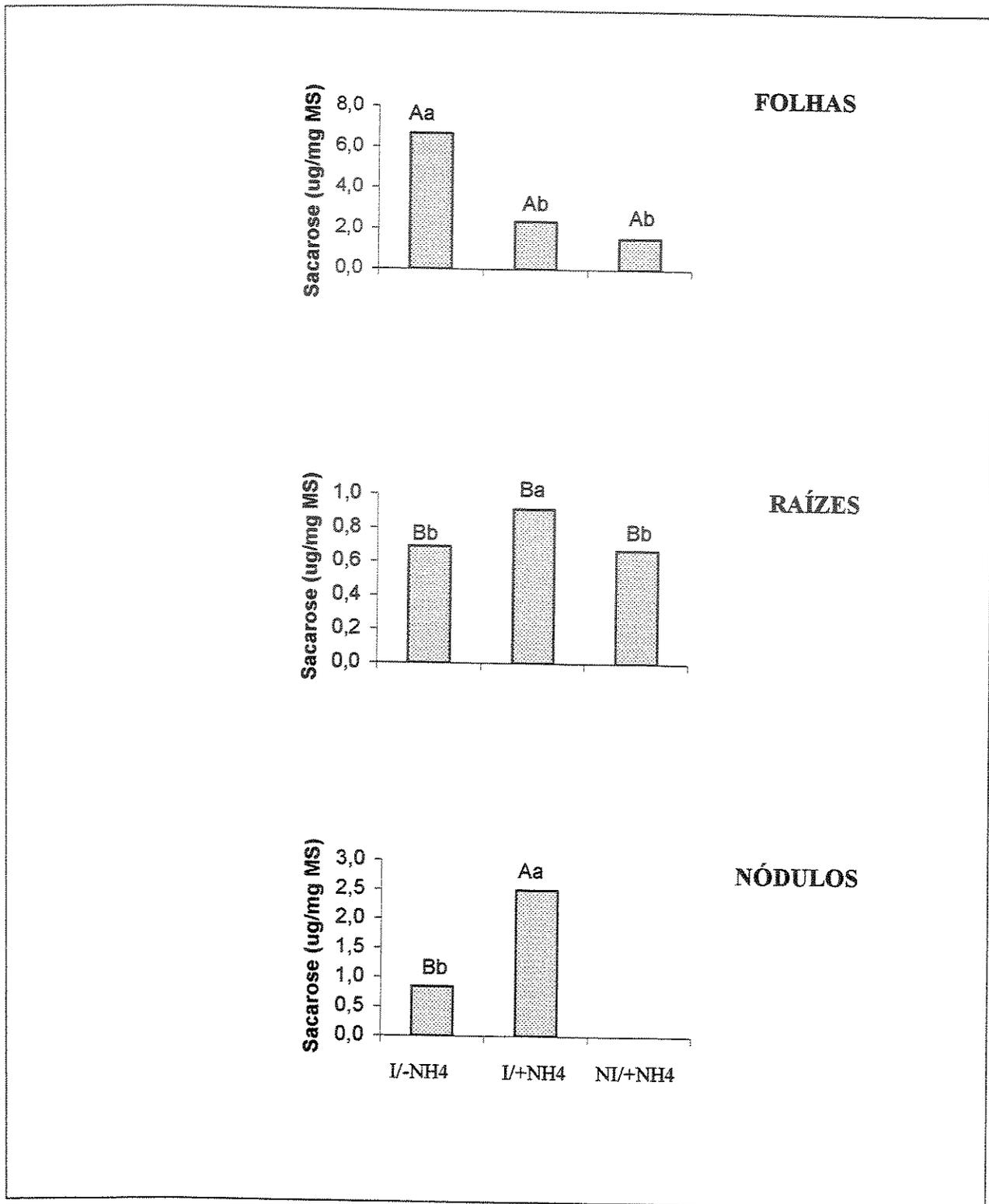
sacarose nas folhas destas plantas foi 3 vezes maior que o de plantas inoculadas que receberam  $\text{NH}_4^+$  (I/ $+\text{NH}_4^+$ ) e quase 4,5 vezes maior que em plantas não inoculadas (figura 9).

Já, em raízes, o tratamento que se destacou foi o de plantas inoculadas crescidas na presença de  $\text{NH}_4^+$  (I/ $+\text{NH}_4^+$ ), que proporcionou 0,91  $\mu\text{g}$  sacarose/mg MS contra uma média de 0,75  $\mu\text{g}$  sacarose/mg MS nos demais tratamentos.

A quantidade de carboidratos disponíveis parece limitar a função do nódulo durante o preenchimento das vagens, visto que o desenvolvimento das vagens é um forte dreno dos carboidratos (Vikman & Vessey, 1993). Neste trabalho pode-se constatar em *C. juncea* significativa diferença no teor de sacarose, quando nódulos de plantas do tratamento I/ $+\text{NH}_4^+$  apresentaram teor 3 vezes superior ao de plantas crescidas na ausência de  $\text{NH}_4^+$  (I/ $-\text{NH}_4^+$ ).

Quando a  $\text{N}_2$ ase é inibida por um estresse qualquer, a concentração de sacarose no nódulo aumenta algumas vezes. Isso é explicado pelo acúmulo de substrato quando a utilização é cessada, como por exemplo, quando a respiração é reduzida devido ao aumento da resistência do nódulo à difusão do  $\text{O}_2$  ou quando há inativação direta da  $\text{N}_2$ ase pelo  $\text{O}_2$  (Muller *et al.*, 2001). No presente estudo o acúmulo de sacarose em nódulos do tratamento I/ $+\text{NH}_4^+$ , parece estar relacionado à queda da  $\text{N}_2$ ase ou ao metabolismo estreitamente relacionado a ela, já que a fixação de N não foi afetada pela presença de  $\text{NH}_4^+$ , conforme pode ser verificado na figura 6. Em todos os tratamentos, nota-se que o padrão de acúmulo de sacarose entre raízes e nódulos foram semelhantes, sendo que os maiores teores foram verificados em plantas I/ $+\text{NH}_4^+$  (figura 9).

Quando comparamos os teores de sacarose nos tecidos, dentro de um mesmo tratamento, verificamos que as folhas tenderam a acumular mais sacarose que os demais tecidos, especialmente quando o  $\text{NH}_4^+$  estava ausente. Neste tratamento os valores encontrados em folhas foram 10 vezes maiores que aqueles encontrados em raízes e 8 vezes maiores que os encontrados em nódulos.

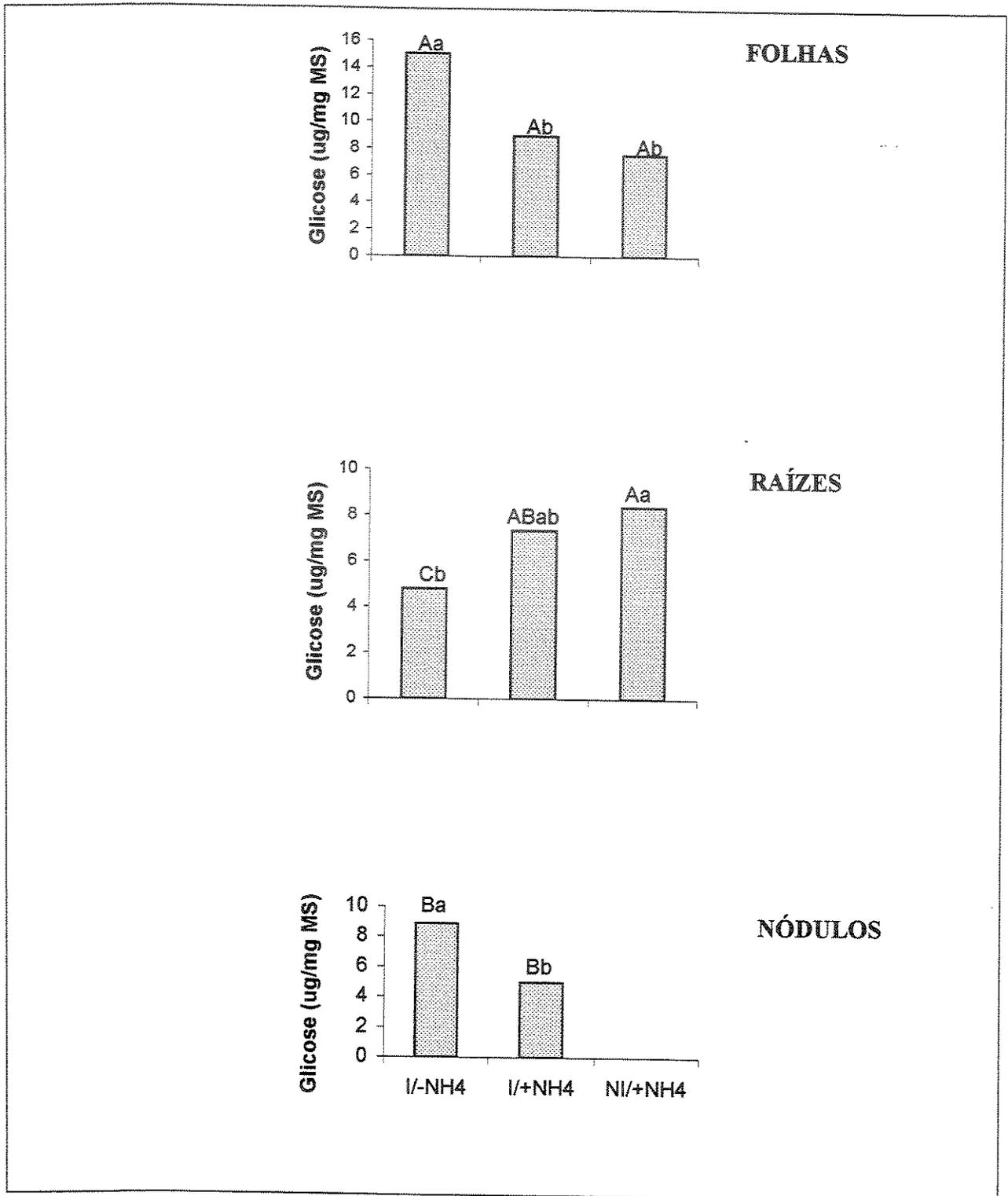


**Figura 9.** Teor de sacarose em tecidos de plantas *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

Na figura 10 são apresentados os valores de teores de açúcares solúveis totais em folhas, raízes e nódulos. As análises em folhas indicaram que as plantas do tratamento inoculado sem  $\text{NH}_4^+$  (I/ $\text{NH}_4^+$ ) continham 15  $\mu\text{g}$  glicose/mg MS, diferenciando-se dos demais, apresentando em média 83% mais açúcares solúveis que os tratamentos que receberam  $\text{NH}_4^+$ . Em raízes, ao contrário de folhas, as plantas NI/ $\text{NH}_4^+$  apresentaram maiores teores de açúcares solúveis totais que plantas I/ $\text{NH}_4^+$ .

Como em folhas, em nódulos, o maior teor de açúcares solúveis ocorreu no tratamento que não continha  $\text{NH}_4^+$  (I/ $\text{NH}_4^+$ ), com 8,8  $\mu\text{g}$  glicose/mg MS, enquanto que na presença de  $\text{NH}_4^+$  (I/ $\text{NH}_4^+$ ) o valor encontrado foi 5  $\mu\text{g}$  de glicose/mg MS.

Em plantas I/ $\text{NH}_4^+$ , verificamos o mesmo comportamento observado quanto à sacarose, ou seja, as folhas foram os tecidos com maior teor de açúcares solúveis. Nesta análise a presença de  $\text{NH}_4^+$  não determinou diferenças nos teores de açúcares solúveis nos diferentes tecidos. A FBN é um processo que se caracteriza por uma alta demanda de energia, obtida do metabolismo de carboidratos supridos pela planta hospedeira. Os fotossintatos fornecidos aos nódulos são usados para gerar ATP e poder redutor necessários à redução de  $\text{N}_2$  a amônia e ainda para a manutenção do metabolismo do citossol da planta hospedeira e suprimento de esqueletos de carbono necessários para síntese dos compostos nitrogenados (Hungria & Neves, 1986). Segundo Guidi & Soldatini (1997) a queda na taxa fotossintética das plantas pode acarretar acúmulo de carboidratos nas folhas. Isto poderia sugerir que em *C. juncea* o fluxo de carboidratos para as raízes e/ou nódulos pode ter sido inibido por falta de demanda e conseqüentemente acúmulo tanto de sacarose como açúcares solúveis nas folhas principalmente no tratamento I/ $\text{NH}_4^+$ .



**Figura 10.** Teor de açúcares solúveis totais em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

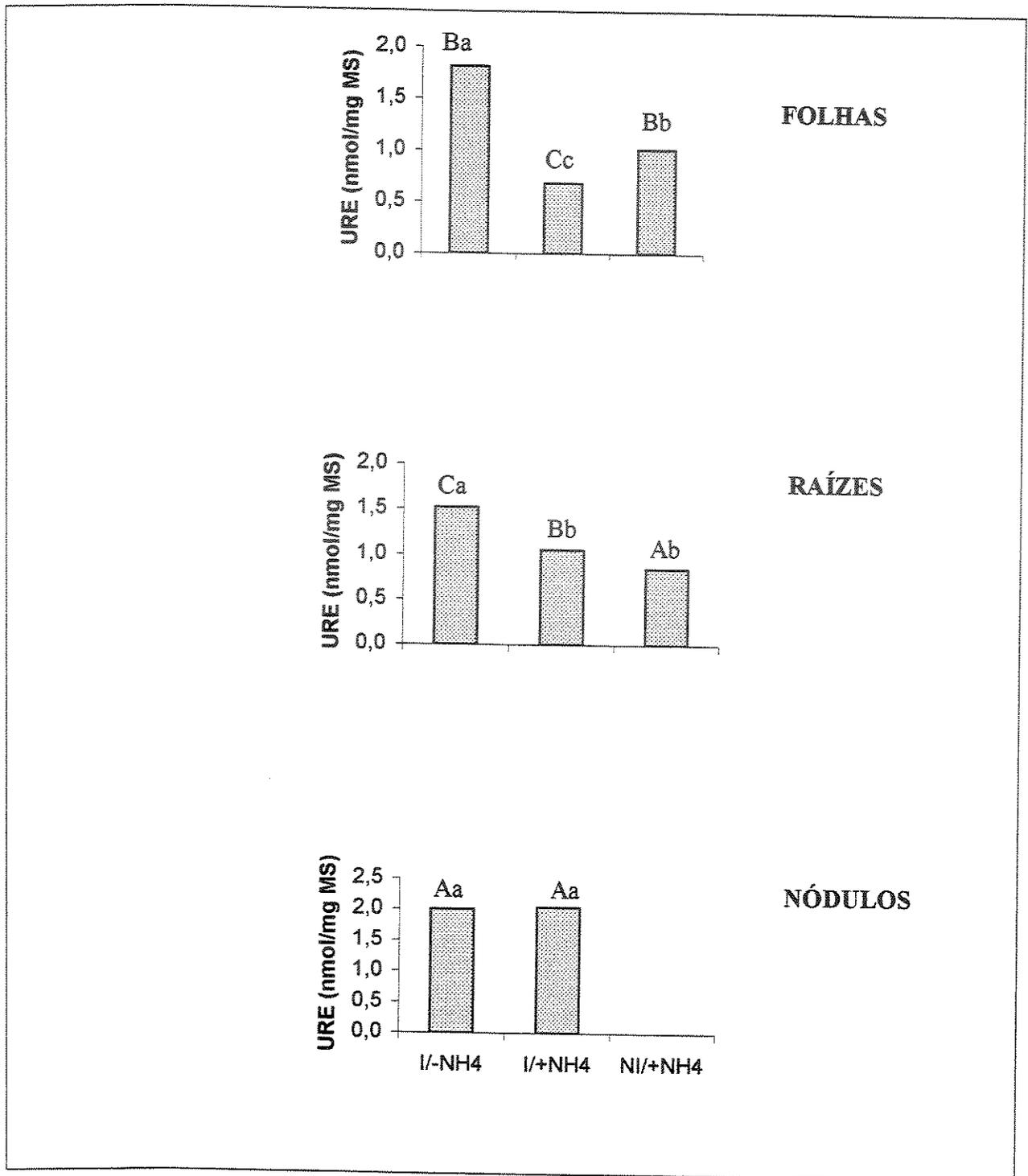
## 5.9. Teor de ureídeos

A análise do teor de URE em folhas (figura 11) apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Na ausência de  $\text{NH}_4^+$  no meio ( $I\text{-NH}_4^+$ ) a produção foi de 1,81 nmol de ureídeo/mg MS, 79% mais URE que no tratamento onde a presença de  $\text{NH}_4^+$  era exclusiva ( $NI\text{+NH}_4^+$ ), e 116% a mais do que quando o  $\text{NH}_4^+$  era fornecido a plantas inoculadas ( $I\text{+NH}_4^+$ ). Esses resultados diferem daqueles obtidos por Cheng *et al.* (1999), os quais ao fornecerem  $\text{NH}_4^+$  a plantas inoculadas de alfafa observaram aumento significativo do teor de URE em vários tecidos da planta. Segundo a literatura, as espécies vegetais variam quanto à sensibilidade ao  $\text{NH}_4^+$ ; entretanto, os resultados encontrados são conflitantes, em grande parte devido às diferentes condições experimentais. Por exemplo, a adição do  $\text{NH}_4^+$  altera o pH da rizosfera e como consequência pode afetar sensivelmente a planta (Muller & Pereira, 1995).

Os URE, são os principais compostos nitrogenados sintetizados nos nódulos de leguminosas tropicais e transportados via xilema para as folhas, onde são degradados. Em folhas de plantas de soja inoculadas, foram encontrados URE na concentração de 5-10  $\mu\text{mol/g}$  MS (Vadez & Sinclair, 2000) e em folhas de plantas inoculadas de *C. juncea* neste trabalho foram encontrados apenas de 0,7 a 1,81 nmol/mg MS.

Em raízes, o maior conteúdo de URE (1,5 nmol/mg MS) também foi detectado em plantas que foram inoculadas e não receberam  $\text{NH}_4^+$  ( $I\text{-NH}_4^+$ ). Os teores de URE em raízes de plantas, que receberam  $\text{NH}_4^+$  ( $I\text{+NH}_4^+$  e  $NI\text{+NH}_4^+$ ) não diferiram. Em nódulos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os teores de URE de plantas inoculadas na presença ou ausência de  $\text{NH}_4^+$  ( $I\text{-NH}_4^+$  e  $I\text{+NH}_4^+$ ).

Quando comparamos os diferentes tecidos em plantas do mesmo tratamento, verificamos que foram encontradas maiores concentrações de URE em nódulos que nos demais tecidos e que nódulos de plantas  $I\text{+NH}_4^+$  apresentaram teor de URE 3 vezes maior que folhas e quase 2 vezes maior que raízes.



**Figura 11.** Teor de URE em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

### 5.10. Teor de aminoácidos livres totais

A análise estatística apontou diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao teor de ALT em folhas, sendo o maior teor em plantas não inoculadas (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) com 26 nmol aa/mg MS (figura 12). Este valor equivale a 1,5 vez os teores de ALT encontrados no tratamento I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e a 2,5 vezes os teores de ALT encontrados em plantas apenas inoculadas (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

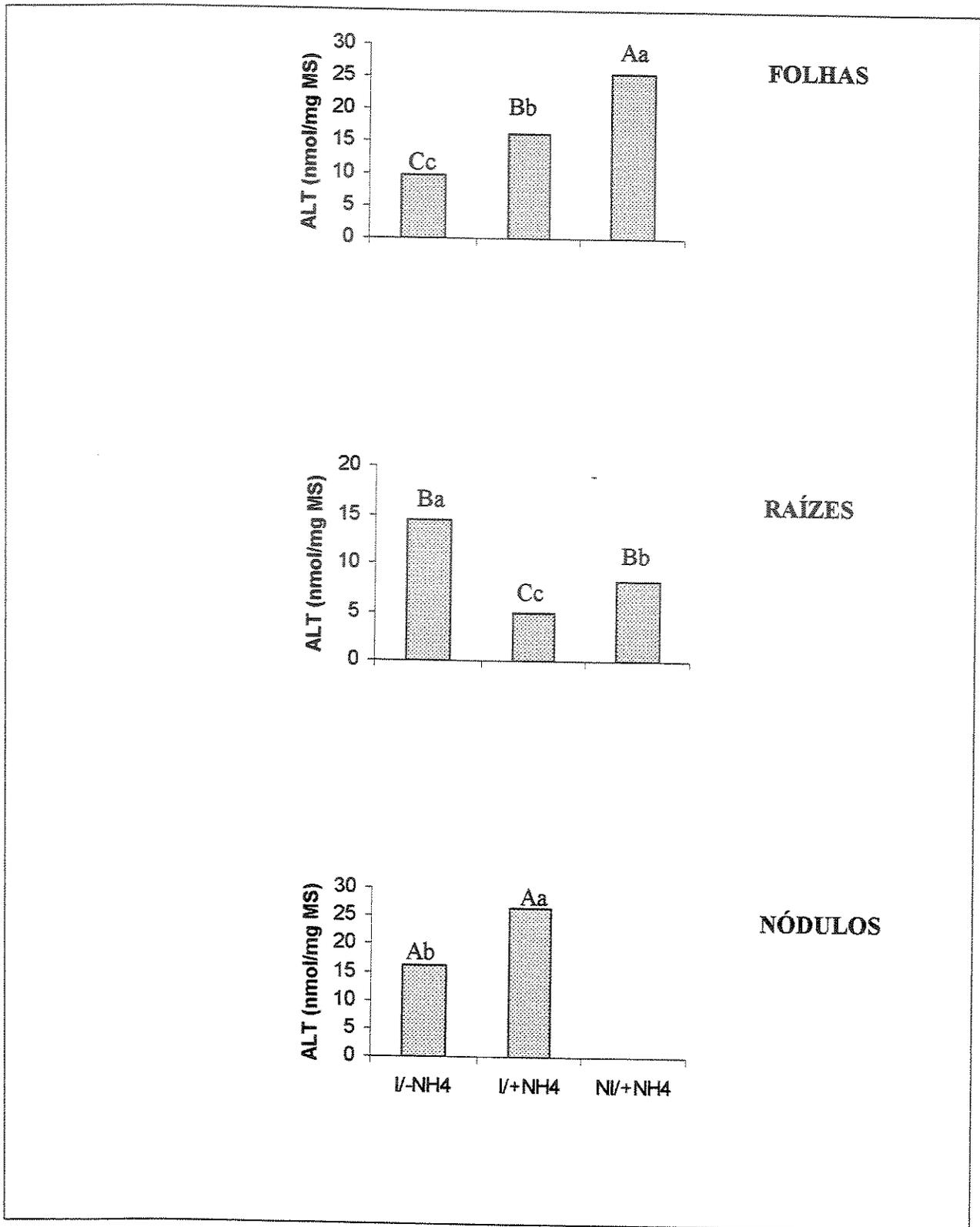
Em raízes, o maior teor de ALT foi encontrado em plantas apenas inoculadas (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), com cerca de 14 nmol de aa/mg MS, seguido do tratamento sem inoculante e com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), com 8,2 nmol de aa/mg MS, e daquele em que as plantas foram inoculadas e receberam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), com 4,9 nmol de aa/mg MS.

Os teores de ALT encontrados em nódulos também foram significativamente diferentes entre os tratamentos. Nódulos de plantas I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentaram 26,4 nmol de aa/mg MS, 62% a mais que na ausência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) com 16,3 nmol.

Comparando os diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento, podemos notar que os nódulos apresentaram os maiores teores de ALT, como havia sido observado no caso de URE.

Um efeito metabólico freqüentemente descrito após o suprimento de N na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é o acúmulo de aa nos tecidos radiculares e foliares (Magalhães & Wilcox, 1984; Magalhães *et al.*, 1995). A maior parte do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> absorvido é assimilado nas raízes por meio da ação conjunta das enzimas GS/GOGAT (Lea *et al.*, 1990). No caso de *C. juncea*, o acúmulo de ALT em folhas em relação a raízes foi observado apenas em plantas que receberam N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

As reações de assimilação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> absorvido pelas raízes, demandam um consumo de esqueletos carbônicos na forma de GLU e 2-oxoglutarato, cuja intensidade depende da quantidade do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> livre presente nos tecidos. A demanda de carbono que se estabelece nas raízes, em função de altas concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pode até mesmo restringir o crescimento



**Figura 12.** Teor de ALT em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

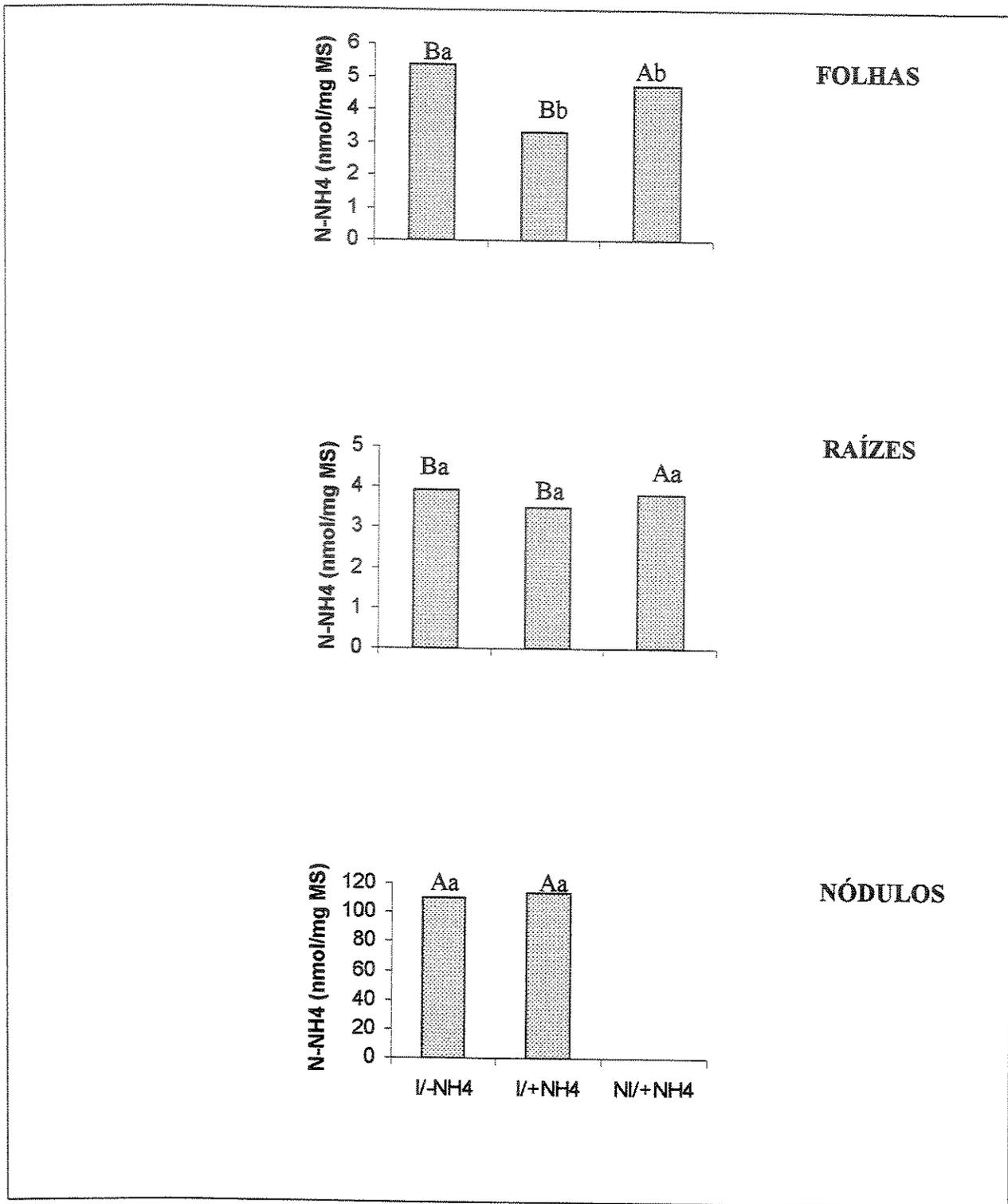
de outras regiões da planta (Magalhães *et al.*, 1995), por representar um mecanismo importante de eliminação e controle dos níveis de  $\text{NH}_4^+$  livre nos tecidos vegetais (Lea *et al.*, 1990). Em *C. juncea* não houve restrição do crescimento das plantas como consequência da concentração utilizada de  $\text{N-NH}_4^+$  (figura 1).

#### 5.11. Teor de $\text{N-NH}_4^+$ livre

Os teores de  $\text{NH}_4^+$  livre nos tecidos estão apresentados na figura 13. Verificou-se que em plantas inoculadas, os maiores teores de  $\text{NH}_4^+$  em folhas foram encontrados naquelas cultivadas na ausência de  $\text{NH}_4^+$  (I/- $\text{NH}_4^+$ ) com valores de 5,4 nmol  $\text{NH}_4^+$ /mg MS. Em plantas cultivadas na presença de  $\text{NH}_4^+$  (NI/+ $\text{NH}_4^+$  e I/+ $\text{NH}_4^+$ ) os teores foram estatisticamente semelhantes. Já, em raízes e nódulos, não houve diferença entre os tratamentos quanto à concentração de  $\text{NH}_4^+$  livre. Isto indica que a presença de N mineral e/ou da inoculação, não influenciou nos teores de  $\text{NH}_4^+$  livre nos tecidos, especialmente em raízes e nódulos.

Deve-se destacar que o teor de  $\text{NH}_4^+$  em nódulos radiculares superou o das folhas em 20 vezes em plantas I/- $\text{NH}_4^+$  e 35 vezes em plantas I/+ $\text{NH}_4^+$  e foi cerca de 30 vezes maior que em raízes, em qualquer dos tratamentos. Isto indica que o  $\text{N-NH}_4^+$  livre nestes nódulos não foi transportado para as folhas e que também estes não dispunham de uma atividade assimilativa suficiente para evitar o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$ . O aumento do teor de  $\text{NH}_4^+$  nos nódulos pode também ter uma origem endógena, por aumento da remobilização de N a partir de compostos nitrogenados e ser um indicativo de fixação de N.

Acredita-se que as plantas sejam capazes de evitar a toxicidade de  $\text{NH}_4^+$  do ambiente, aumentando a sua capacidade assimilativa nas raízes da via GS-GOGAT (Lea *et al.* 1990; Raab & Terry, 1995). Algumas espécies de plantas respondem à presença de  $\text{NH}_4^+$  no



**Figura 13.** Teor de  $N-NH_4^+$  em tecidos de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+ $NH_4^+$ ) ou ausência (- $NH_4^+$ ) de amônio. Letras maiúsculas comparam diferentes tecidos dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tecido. Médias com letras distintas, diferem significativamente (Tukey, 5%).

meio externo aumentando expressivamente a atividade da GS nas partes aéreas e raízes (Magalhães & Huber, 1991; Fuentes *et al.*, 2001). Em outras espécies, a atividade da GS quase não é afetada pela fonte de N no meio de cultivo (Magalhães & Huber, 1991). Em raízes de *C. juncea* a atividade da GS não foi afetada pelas fontes de N (figura 2).

A interpretação dos dados obtidos com  $\text{NH}_4^+$  deve levar em conta o fato de que esse íon é intermediário dos processos assimilatórios. O aumento de concentração de ALT na parte aérea deve ter relação direta com a assimilação na raiz, isso porque não houve diferença na concentração de  $\text{NH}_4^+$  na seiva, em nenhum dos tratamentos. Assim em plantas noduladas, boa parte do  $\text{NH}_4^+$  deve ter sido assimilado via GLN sintetase e normalmente envolvida na assimilação do  $\text{NH}_4^+$ . A assimilação rápida e eficiente de  $\text{NH}_4^+$  é essencial, como mecanismo de desintoxicação (Magalhães *et al.*, 1995), pois o excesso deste íon inibe o metabolismo energético via desacoplamento da síntese de ATP (Magalhães & Wilcox, 1984).

O teor de  $\text{NH}_4^+$  livre nos tecidos de uma planta pode ser influenciado por outros processos como, por exemplo, o controle da absorção pelas raízes (Causin & Barneix, 1994), a atividade de outras enzimas capazes de assimilar o  $\text{NH}_4^+$  diretamente, tais como a asparagina sintetase e a carbamil fosfato sintase (Sechley *et al.* 1992), a compartimentalização nos vacúolos e a geração endógena de  $\text{NH}_4^+$  em várias vias metabólicas como fotorrespiração, a biossíntese de alguns aa e o catabolismo de compostos nitrogenados (Lea *et al.*, 1990).

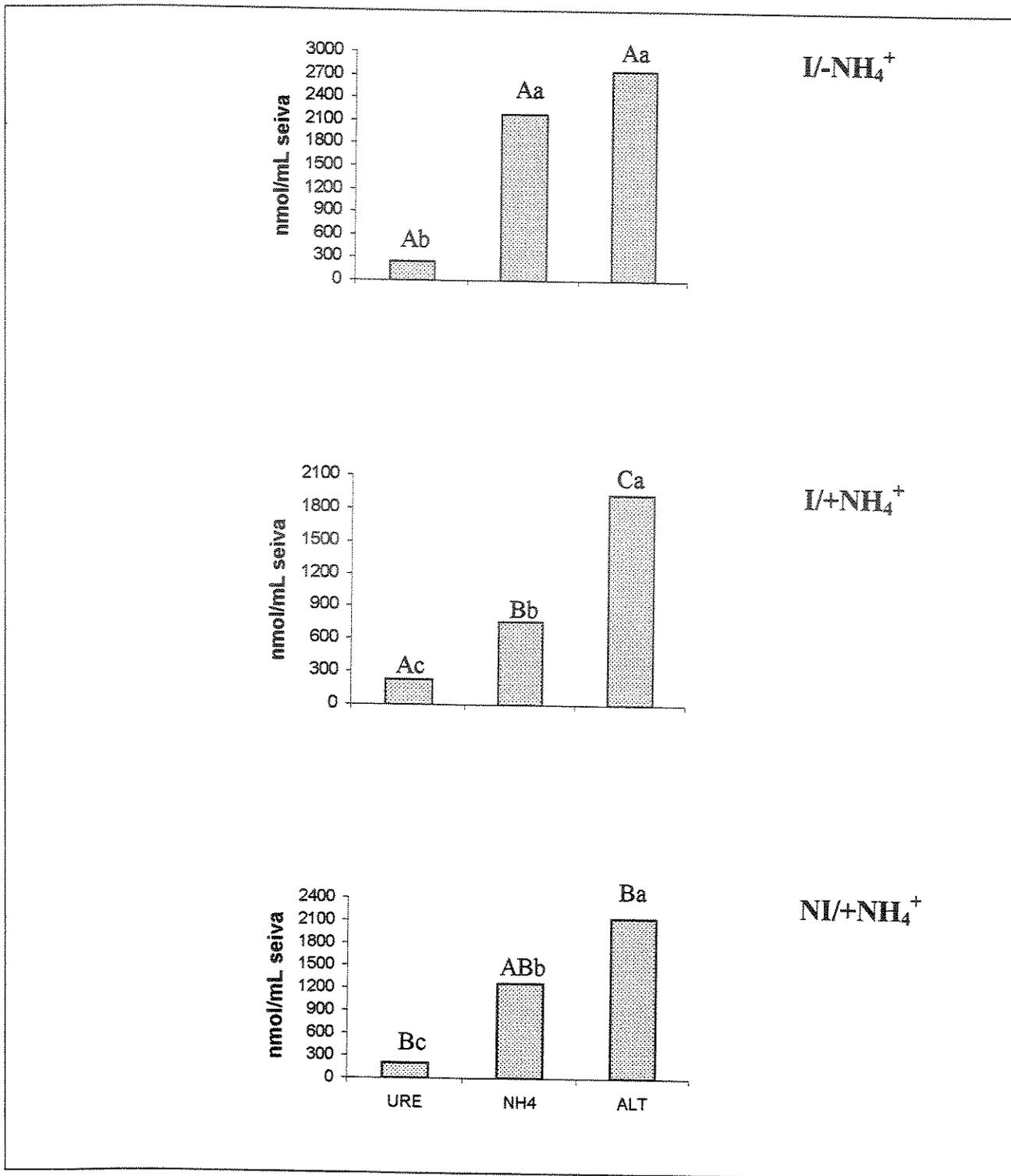
## **5.12. Compostos nitrogenados em tecidos e seiva do xilema**

A produção de URE pelas leguminosas está relacionada à morfologia do nódulo (Sprenst, 1980), sendo que as maiores concentrações de URE sempre são encontradas nas espécies que apresentam nódulos de crescimento determinado (Goi & Neves, 1982). Essas

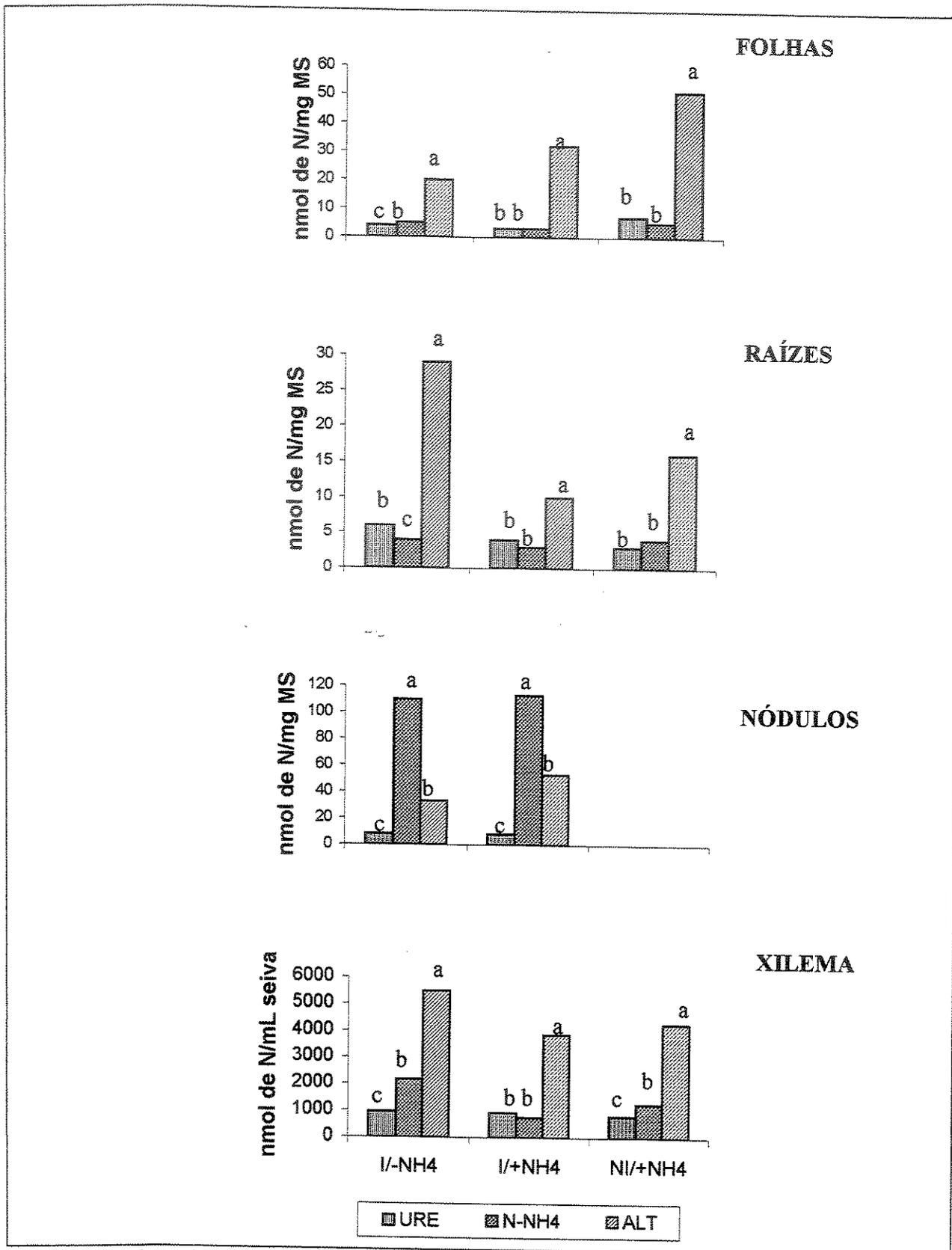
autoras descreveram algumas espécies de leguminosas que possuem nódulos do tipo indeterminado, que apresentaram baixos teores de URE tanto em nódulos como em raízes e que, provavelmente, transportam o N fixado como ALT. *C. juncea* parece pertencer a este grupo de espécies, uma vez que apresenta nódulos do tipo indeterminado e transporta N principalmente na forma de ALT (figuras 14 e 15).

Algumas leguminosas, como as da tribo *Phaseoleae*, são caracterizadas pela presença de altas concentrações de URE na seiva do xilema. Esses URE parecem ser produtos específicos da fixação de N, já que estão presentes em níveis reduzidos quando a planta não apresenta nódulos (Schubert, 1986). Soja, por exemplo, apresenta em torno de 20  $\mu\text{mol}$  ureídeos/mL de seiva em plantas noduladas e apenas traços de URE na seiva de plantas não noduladas (Sodek & Silva, 1996). Em *C. juncea* também foram detectadas baixas concentrações de URE em tecidos e seiva do xilema. No entanto, mesmo as plantas não noduladas de *C. juncea* tratadas com  $\text{NH}_4^+$  (NI/ $+\text{NH}_4^+$ ) transportaram pequena fração de N sob a forma de URE (figura 14). Este fato, que também foi observado por Thomas *et al.* (1979, citado por Hungria *et al.* 1986) em plantas de feijão não noduladas, contradiz a afirmação de que o transporte de N em plantas sem nódulos segue o esquema de transporte de compostos nitrogenados normal para plantas não fixadoras, normalmente na forma de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  ou aa (Sprent, 1980).

Embora os teores de  $\text{NH}_4^+$  livre na seiva de plantas dos tratamentos I/ $-\text{NH}_4^+$  e NI/ $+\text{NH}_4^+$  não tenham diferido entre si, as primeiras (I/ $-\text{NH}_4^+$ ) apresentaram valores 73% superiores aos de plantas não inoculadas (NI/ $+\text{NH}_4^+$ ). Considerando-se plantas inoculadas, verifica-se que a maior concentração de N- $\text{NH}_4^+$  foi encontrada na seiva de plantas que não receberam N mineral (I/ $-\text{NH}_4^+$ ) (figura 14). Esses resultados indicam que o íon  $\text{NH}_4^+$ , suprido ou fixado, só



**Figura 14.** Composição nitrogenada da seiva do xilema de plantas de *C. juncea* L. inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Letras maiúsculas comparam tratamentos em relação a cada um dos compostos nitrogenados. Letras minúsculas comparam os compostos nitrogenados dentro de cada tratamento.



**Figura 15.** Quantidade de N em compostos nitrogenados nos tecidos e em seiva do xilema de plantas de *C. juncea* L., inoculadas (I) ou não (NI), cultivadas por 60 dias na presença (+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou ausência (-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) de amônio. Colunas acompanhadas da mesma letra, dentro do mesmo tratamento, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

é transferido das raízes para a parte aérea após ser incorporado em ALT nas raízes, para não atingir níveis de toxicidade em raízes e folhas (Cheng *et al.*, 1999; Ghisi *et al.*, 1999). Isto pode ser confirmado pelo fato de que, em plantas I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram encontradas maiores concentrações de ALT em raízes que em folhas (figura 12).

A proporção entre os compostos nitrogenados presentes na seiva do xilema (figura 14) evidencia que *C. juncea* L. possui metabolismo de N baseado em ALT. As plantas que não receberam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (I/-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foram as que apresentaram os maiores teores de ALT na seiva, 2751 nmol de aa/mL. Isto significa algo em torno de 29% a mais que na ausência do inoculante (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), com 2132 nmol, e 43% sobre o tratamento com inoculante e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> juntos (I/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), com 1933 nmol. Pode-se notar que o teor de ALT na seiva do xilema de plantas, inoculadas ou não, diminuiu quando houve fornecimento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, enquanto a influência do N mineral sobre os teores de URE transportados na seiva, só ocorreu em plantas não inoculadas. O aumento em ALT no xilema quando o inóculo não está presente (NI/+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) certamente é reflexo de uma rápida e eficiente assimilação na raiz, o fenômeno, portanto, é próprio da raiz e independente do inóculo (Stewart *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos com *C. juncea* estão de acordo com aqueles apresentados por Vitória & Sodek (1999), que verificaram que em seiva do xilema de várias espécies de *Crotalaria* o nível de ALT variou de 1800 a 6900 nmol/mL. Em todos os tratamentos, independentemente da presença de rizóbio ou do fornecimento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, o transporte de N no xilema se deu principalmente na forma de ALT, o que correspondeu a 63-65% do total de N transportado por estes três compostos (figuras 14 e 15).

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Nas condições experimentais do presente trabalho o fornecimento de  $N-NH_4^+$  não afetou a fixação de  $N_2$  e, contribuiu para aumento da massa das plantas, do teor de pigmentos (clorofilas e carotenóides) em folhas e do teor de ALT em folhas e nódulos. Promoveu também aumento do conteúdo de sacarose em raízes e nódulos de plantas inoculadas (I).
- O fornecimento de  $N-NH_4^+$  contribuiu para a queda dos teores de ALT em raízes e seiva do xilema, dos teores de sacarose em folhas, de açúcares solúveis totais em folhas e nódulos e do conteúdo de URE em folhas e raízes. Influuiu também na redução da concentração de URE na seiva do xilema de plantas não noduladas (NI).
- A atividade específica da GS foi maior em folhas que em raízes, em todos os tratamentos, enquanto que a atividade da GS e da GDH em folhas, foi maior em plantas NI/ $+NH_4^+$  que em plantas I/ $+NH_4^+$ .
- Independente do tratamento, em folhas, a atividade específica da GOGAT-NADH foi quase nula e a forma predominante da enzima foi aquela dependente de ferredoxina (GOGAT-Fd).
- Não foram observadas diferenças entre os tratamentos, quanto ao conteúdo de  $NH_4^+$  livre nas diferentes partes da planta, a não ser no caso de folhas de plantas inoculadas, que apresentaram maior concentração de  $NH_4^+$  quando mantidas em ausência de N (I/ $-NH_4^+$ ).
- Todos os compostos nitrogenados (URE,  $N-NH_4^+$  e ALT) foram encontrados em maiores concentrações em nódulos que em folhas e raízes.

- Os teores de URE encontrados foram mínimos e os compostos nitrogenados presentes em maiores concentrações em seiva de *C. juncea* L. foram ALT e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sendo a maior quantidade de N transportada na forma de ALT.

## 7. LITERATURA CITADA

- Becker, M. & George, T., 1995. Nitrogen fixation response of stem and root nodulating *Sesbania* species to flooding and mineral nitrogen. *Plant Soil* 175:189-196.
- Becker, T.W., Carrayol E. & Hirel B., 2000. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation of nitrogen transport. *Planta* 211:800-806.
- Berecz, K., Debreczeni, K. & Présing, M., 1997. Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -labelled fertilizer nitrogen into upper vegetative plant parts in wheat and its mobilization during grain development. *Plant Physiol. Biochem.* 35:49-54.
- Bergersen, F.J. & Turner, G.L., 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta.* 141:507-515.
- Bielecki, R.L. & Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-293.
- Bisseling, T., Van Den Bos, R.C., & Van Kammen, A., 1978. The effect of ammonium nitrate on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by *Rhizobium leguminosarum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 539:1-11.
- Bladergroen, M.R & Spaink, H.P., 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. *Curr. Op. Plant Biol.* 1:353-359.
- Bloom, A.J., 1988. Ammonium and nitrate as nitrogen sources for plant growth. *ISI Atlas of Science: Animal Plant Science*, pp.55-59.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bradley, D.J., Wood, E.A., Larins, A.P., Galfre, G., Butcher, G.W. & Brewin, N.J., 1988. Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membranes and other

- components of pea root nodules containing *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 173:149-160.
- Brown, S.M. & Walsh, K.B., 1994. Anatomy of the legume nodule cortex with respect to nodule permeability. *Aust. J. Plant Physiol.* 21:49-68.
- Bulisani, E.A., Costa, M.B.B. & Miyasaka, S., 1992. Adubação verde em São Paulo. IN: Adubação Verde no Sul do Brasil (M.B.B. Costa, eds.). Rio de Janeiro, AS-PTA, pp.59-81.
- Burity, H.A., Chamber-Perez, M., de Lyra, M.D.C.P. & Figueiredo, M.D.B., 1999. Nitrate levels and stages of growth in hypernodulating mutants of *Lupinus albus*. II. Enzymatic activity and transport of N in the xylem sap. *Rev. Microbiol.* 30:98-103.
- Buttery, B.R. & Dirks, V.A., 1987. The effects of soybean cultivar, *Rhizobium* strain and nitrate on plant growth mass and acetylene reduction rate. *Plant Soil* 98:285-293.
- Calegari, A., Alcântara, P.B., Miyasaka, S. & Amado, T.J.C., 1992. Caracterização das principais espécies de adubo verde. IN: Adubação Verde no Sul do Brasil (M.B.B. Costas eds.), Rio de Janeiro, AS-PTA, 346p.
- Cammaerts, D. & Jacobs, M., 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 163:517-526.
- Causin, H.F. & Barneix, A.J., 1994. The effect of glutamine and asparagine on net  $\text{NH}_4^+$  uptake in young wheat plants. *Plant Soil* 161:257-266.
- Chaillou, S., Vessey, J.K., Morot-Gaudry, J.F., Harper, C.D.Jr., Henry, L.T. & Boutin, J.P., 1991. Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *J. Exp. Bot.* 42:189-196.
- Cheng, X.G., Nomura, M., Sato, I., Fujikake, H., Ohyama, I. & Iajima, S., 1999. Effect of exogenous  $\text{NH}_4\text{-N}$  supply on distribution of ureide content in various tissues of alfalfa plants, *Medicago sativa*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45:921-927.

- Cherney, J.H. & Duxbury, J.M., 1994. Inorganic nitrogen supply and symbiotic dinitrogen fixation in alfalfa. *J. Plant Nutr.* 17:2053-2067.
- Cordovilla, M.P., Perez, J., Ligeró, F., Lluch, C. & Valpuesta, V., 2000. Partial purification and characterization of NADH-glutamate synthase from faba bean (*Vicia faba*) root nodules. *Plant Sci.* 150:121-128.
- Crawford, N.M. & Arst, H.N., 1993. The molecular genetic of nitrate in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* 27:115-146.
- Danso, S.K.A., Bowen, G.D. & Sanginga, N., 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. *Plant Soil* 141:177-196.
- Dixon, R.O.D. & Wheeler, C.T., 1986. Nitrogen fixation in plants (eds.) Backfield, Son Ltd., Glasgow, 157p.
- Dourado, M.C., Silva, T.R.B. & Bolonhezi, A.C., 2001. Matéria seca e produção de grãos de *Crotalaria juncea* l. submetida à poda e adubação fosfatada. *Sci. Agric.* pp. 66-68.
- Faria, S.M., Hay, G.T. & Sprent, J.L., 1988. Entry of rhizobia into roots as *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. *J. Gen. Microbiol.* 134:2291-2296.
- Farnden, K.J.S. & Robertson, J.G., 1980. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. IN: Bergersen, F.J. ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.* John Wiley & Sons Ltd., pp. 279-286.
- Felker, P., 1977. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal. Chem.* 49: 1080.
- Frechilla, S., Gonzáles, E.M., Royuela, M., Minchin, F.R., Aparicio-Tejo, P.M. & Arrese-Igor, C., 2000. Source of nitrogen nutrition (nitrogen fixation or nitrate assimilation) is a major factor involved in pea response to moderate water stress. *J. Plant Physiol.* 157:609-617.

- Fuentes, S.I., Allen, D.J., Ortiz-lopez, A. & Hernández G., 2001. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *J. Exp. Bot.* 52:1071-1081.
- Ghisi, R., Ferretti, M., La Rocca, N., Masi, A. & Passera, C., 1999. Enzymes of ammonia assimilation, photosynthesis, and respiration in alfalfa leaves of different ages. *Biol. Plant.* 42:371-378.
- Goi, S.R. & Neves, M.C.P., 1982. Teor de URE, tipo de nódulos e atividade da nitrogenase de leguminosas forrageiras, florestais e de grão. *Pesq. Agrop. Bras.* 17:43-50.
- Gomes, M.A.F. & Sodek, L., 1987. Reproductive development and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* [L.]Merril). *J. Exp. Bot.* 38:1982-1987.
- Graham, D. & Smydzuk, J., 1965. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. *Anal. Bioch.* 11:246-255.
- Guidi, L. & Soldatini, G.F., 1997. Chlorophyll fluorescence and gas exchanges in flooded soybean and sunflower plants. *Plant Physiol. Biochem.* 35:713-717.
- Handel, E. V., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22:280-283.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D, Jackson, E.K. & Burns, R.C., 1968. The acetylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- Heichel, G.H. & Vance, C.P., 1983. Physiology and morphology of perennial legumes. IN: Nitrogen Fixation, Vol.3, Legumes. Oxford Univ. Press.
- 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 for growing plants without soil. University of California Agricultural Experimental Station, Berkeley: 39p.
- Hodge, A., Robinson, D. & Fitter, A., 2000. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends Plant Sci.* 5:304-308.

- Hogh-Jensen, H. & Schjoerring, J.K., 1997. Effects of drought and inorganic N form on nitrogen fixation and carbon isotope discrimination in *Trifolium repens*. *Plant Physiol.*, 35:55-62.
- Hungria, M. & Neves, M.C.P., 1986. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. *Pesq. Agrop. Bras.* 21:9-24.
- Hungria, M., Neves, M.C.P. & Vitória, R.L., 1986 Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 9:193-200.
- Hungria, M. Barradas, C.A. & Wallsgrave, R.M., 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. *J. Exp.Bot.* 42:839-844.
- IPT, 1989. Estudos econômicos de insumos para a agricultura. Relatório a FINEP, vol.2, 132p.
- Ishiyama, K., Hayakawa, T. & Yamaya, T., 1998. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions. *Planta* 204:288-294.
- Kannangara, C.G., 1991. Biochemistry and molecular biology of chlorophyll synthesis. IN: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press Inc. Vol. 7B 301-329.
- Kennedy, I.R., Rigaud, J. & Trinchant, J.C., 1975. Nitrate reductase from bacteroids of *Rhizobium japonicum*: enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 397:24-35.
- Lam, H.M., Coschigano, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M.H. & Coruzzi, G., 1995. Use of arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7:887-898.

- Lam, H.M., Coschigano, K., Oliveira, I., Melo-Oliveira, R. & Corruzzi, G., 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:569-593.
- Lang, B. & Kaiser, W.M., 1994. Solute content and energy status of roots of barley plants cultivated at different pH on nitrate or ammonium nitrogen. *New Phytol.* 128:451-459.
- Lawlor, D.W., 1987. *Photosynthesis: metabolism, control and physiology*. Longman Scientific & Technical. England: 262 pp.
- Lea, P.J., 1993. Nitrogen metabolism. IN: *Plant Biochemistry and Molecular Biology* (Lea, P.J. & Leegood, R.C., eds) 1<sup>st</sup> ed. John Wiley & Sons Ltd. England: Cap. 7; pp.155-180.
- Lea, P.J. & B.J. Mifflin., 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251:614-616.
- Lea, P.J., Robinson, S.A. & Stewart, G.R., 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagines. IN: *The Biochemistry of Plants* (Mifflin, B. J. & Stewart, P. J. eds). London: Academic Press Inc. Vol. 16, pp. 121-159.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. IN: *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. vol.148, pp.350-382.
- Limani, A., Phillipson B., Ameziane, R., Pernolett, N., Jiang, Q., Roy, R., Deleens, E., Chaumont-Bonnet, M., Gresshof, P.M. & Hirel, B., 1999. Does root glutamine synthetase control plant biomass production in *Lotus japonicus* L.? *Planta* 209:495-502.
- Magalhães, J.R., 1991. Kinetic of  $^{15}\text{NH}_4^+$  assimilation in tomato plants: evidence for  $^{15}\text{NH}_4^+$  assimilation via GDH in tomato roots. *J. Plant Nutr.* 14:1341-1353.
- Magalhães, J.R. & Huber, D.M., 1991. Response of ammonium assimilation enzymes to nitrogen form treatments in different plant species. *J. Plant Nutr.* 14:175-185.
- Magalhães, J.R. & Wilcox, G.E., 1984. Ammonium toxicity development in tomato plants relative to nitrogen form and light intensity. *J. Plant Nutr.* 7:1477-1496.

- Magalhães, J.R., Huber, D.M. & Tsai, C.Y., 1995. Influence of form of nitrogen on ammonium, amino acids and N-assimilating enzyme activity in maize genotypes. *J. Plant Nutr.* 18:747-763.
- Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Acad. Press., London. 2<sup>a</sup> ed.; 889p.
- Massonneau, A., Langlade, N., Leon, S., Smutny, J., Vogt, E., Neumann, G. & Martinoia, E., 2001. Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status. *Planta* 213:4534-42.
- Matoh, T. & Takahashi, E., 1982. Changes in the activities of ferredoxin- and NADH-glutamate synthase during seedling development of peas. *Planta* 154:289-294.
- Matoh, T., Ida, S. & Takahashi, E., 1980. Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.* 21:1461-1474.
- Matoh, T., Suzuki, F. & Ida, S., 1979. Corb leaf glutamate synthase: Purification and properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol.* 20:1329-1340.
- McClure, P.R. & Israel, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- Mendonça, E.H.M. & Schiavinato, M.A., 1996. Efeito de diferentes fontes e concentrações de N mineral no crescimento e nodulação de duas espécies de angico. *Arq. Biol. Tecnol.* 39:607-611.
- Mendonça, E.H.M., Mazzafera, P. & Schiavinato, M.A., 1999. Purification of leghemoglobin from nodules of *Crotalaria* infected with *Rhizobium*. *Phytochemistry.* 50:313-316.
- Miflin, B.J. & Lea, P.J., 1982. Ammonia assimilation and amino acid metabolism. IN: *Encyclopedia of Plant Physiology* (D.Boulter, B. Parthier, eds.) Springer-Verlag, Berlin, Vol.14A pp: 4-64.

- Migge, A., Carrayol E., Hirel, B. & Becker, T.W., 2000. Leaf specific over-expression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta* 210:252-260.
- Mitchell, H.T., 1972. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Ass. Off. Agric. Chem.* 55:1-3.
- Moreau, S., Davies, M.J., Mathieu, C., Hérouart, D. & Puppo, A., 1996. Leghemoglobin-derived radicals: Evidence for multiple protein-derived radicals and the initiation of peribacteroid membrane damage. *J. Biol. Chem.* 271:32557-32562.
- Muller, J., Boller, T. & Wiemken, A., 2001. Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *J. Exp. Bot.* 52:943-947.
- Muller, S.H. & Pereira, P.A.A., 1995. Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. *Plant Soil* 177:55-66.
- Nelson, D.W. & Sommers, L.E., 1973. Determination of the total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112.
- Newcomb, W., 1976. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differential in *Pisum sativum* nodules. *Can. J. Bot.* 54:2163-2186.
- Oaks, A., 1992. A re-avaliation of nitrogen assimilation in roots. *BioScience* 42:103-111.
- Oaks, A., 1994 a. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72:739-750.
- Oaks, A., 1994 b. Efficiency of nitrogen utilization in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> cereal. *Plant Physiol.* 106:407-414.
- Oaks, A. 1995. Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. *Can. J. Bot.* 73: 1116-1117.

- Pabby, A., Dua, S. & Ahluwalia, A.S., 2001. Changes in ammonia-assimilation enzymes in response to different nitrate levels in *Azolla pinnata* and *A-microphylla*. *J. Plant Physiol.* 158:899-903.
- Patterson, T.G. & Larue, T.A., 1983. N<sub>2</sub> fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) and ureide content of soybeans. Environmental effects and source sink manipulations. *Crop. Sci.* 23:819-824.
- Pawlowski, K., 1997. Nodule-specific gene expression. *Physiol. Plant.* 99:617-631.
- Perez-Soba, M. Stulen, L. & Van der Ferden, J.M., 1984. Effect of atmospheric ammonia on the nitrogen metabolism of Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Plant Physiol.* 90:629-636.
- Polhill, R.M. 1982. Tribe 29. Crotalariaeae (Benth.) Hutch. IN: *Advances in Legumes* (Polhill, R.M. & Raven, P.H. eds). Kew, Royal Botanic Gardens. Part 1, pp. 399-402.
- Raab, T.K. & Terry, T., 1995. Carbon, nitrogen, and nutrient interaction in *Beta vulgaris* L. As influenced by nitrogen source, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> versus NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Plant Physiol.* 107:575-584.
- Raven, J.A., Wollenweber, B. & Handley, L.L., 1993. The quantitative role of ammonia/ammonium transport and metabolism by plants in the global nitrogen cycle. *Physiol. Plant.* 89:512-518.
- Reisenauer, H.M., 1978. Absorption and utilization of ammonium nitrogen by plants. IN: *Nitrogen in the Environment* (Nielsen, D.R. & MacDonald, J.G. eds). London: Academic Press. Vol.2 pp.157-189.
- Robinson, S.A, Slade, A.P., Fox, G.G., Phillips, R., Ratcliffe, R.G. & Stewart, G.R., 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* 95:509-516.
- Robinson, S.A., Stewart, G.R. & Phillips, R. 1992. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 98:1190-1195

- Salisbury, F.B. & Ross, C.W., 1992. Assimilation of nitrogen and sulfur. IN: Plant Physiology (Salisbury, F.B. & Ross, C.W. eds) 4a ed., Wadsworth Publishing Co. California pp.289-307.
- Saravitz, C.H., Chaillou, S., Musset, J., Raper, C.D.Jr & Morot-Gaudry, J.F., 1994. Influence of nitrate on uptake of ammonium by nitrogen depleted soybean: is the effect located in roots or shoots? J. Exp. Bot. 45:1575-1584.
- Schlee, D., Thoringer, C. & Tintemann, H., 1994. Purification and properties of glutamate dehydrogenase in Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. Physiol. Plant. 92:467-472.
- Schoenbeck, M.A., Temple, S.J., Trepp, G.B., Blumenthal, J.M., Samac, D.A., Gantt, J.S., Hernandez, G. & Vance, C.P., 2000. Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transformed with an antisense glutamate synthase transgene. J. Exp. Bot. 51:342 29-39.
- Schubert, K.R., 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. Annu.Rev. Plant Physiol. 37:359-574.
- Sechley, K. A., Yamaya, T. & Oaks, A., 1992. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. Plant Physiol. 134:85-163.
- Seith, B., Setzer, B., Flaig, H. & Mohr, H., 1994. Appearance of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase in different organs and Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedling as affected by light, nitrate and ammonium. Physiol. Plant. 91:419-426.
- Shadchina, T.M. & Dmitrieva, V.V., 1995. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from soil. J. Plant Nutr. 18:1427-1437.
- Sheokand, S. & Swaraj, K., 1996. Natural and dark-induced nodule senescence in chickpea: nodule functioning and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes. Biol. Plant. 38:545-554.
- Snedecor, G.M. & Cochran, W.G., 1967. Statistical methods. 6 eds. Iowa State University. 593p.

- Sodek, L. & Silva, D.M., 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *Rev. Brás. Fisiol. Veg.* 8:187-191.
- Solomonson, L.P. & Barber, M.J., 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:225-253.
- Sprent, J.I., 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ.* 3:35-43.
- Sprent, J.I. & Faria, S.M., 1989. Mechanism of infection of plants by nitrogen fixing organisms. IN: *Nitrogen Fixation with Nonlegumes* (F.A. Skinner, eds.) Kluwer Academic Publ., London, pp.3-11.
- Srivastava, H.S. & Singh, R.P., 1987. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochem.* 26:597-610.
- Stewart, G. R., Joly, C.A. & Smirnoff, N., 1992. Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between roots and shoots of cerrado and forest trees of contrasting plant communities of South East of Brasil. *Oecologia* 91:511-517.
- Suzuki, A., Audet, C. & Oaks, A., 1987. Influence of light on the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves. *Plant Physiol.* 84:578-581.
- Suzuki, A., Rioual, S., Lemarchand, S., Godfroy, N., Roux, Y., Boutin, J.P. & Rothstein, S., 2001. Regulation by light and metabolites of ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Physiol. Plant.* 112:524-530.
- Tajima, S., Takane, K., Nomura, M. & Kouchi H., 2000. Symbiotic nitrogen fixation at the late stage of nodule formation in *Lotus japonicus* and other legume plants. *J. Plant Research.* 113:467-473.

- Trepp, G.B. Van de Mortel, M. Yoshioka, H., Miller, S.S., Samac, D.A, Gantt, J.S. & Vance C.P., 1999. NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Genetic regulation and cellular expression. *Plant Physiol.* 119:817-828.
- Turano, F.J. & Muchitch, M.J., 1999. Differential accumulation of ferredoxina and NADH-dependent glutamate synthase activities, peptides, and transcripts in developing soybean seedlings in response to light, nitrogen, and nodulation. *Physiol. Plant.* 107:407-418.
- Turgeon, B.G. & Bawer, W.D., 1985. Ultrastructure of infection-trhead development during the infection of soybean by *Rhizobium japonic*. *Planta* 163:328-349.
- Vadez, V. & Sinclair, T.R., 2000. Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. *J. Exp. Bot.* 51:1459-1465.
- Vande-Broe, F.A. & Vanderleyden, J., 1995. A role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interations. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 8:800-810.
- Vessey, J.K., Henry, L.T., Chaillou, S. & Raper, C.D., 1990. Root zone acidity affects relative uptake of nitrate and ammonium form mixed sources of nitrogen sources. *J.Plant Nutr.* 13:95-116.
- Vikman, P. & Vessey, K., 1993. Ontogenetic changes in root nodule subpopulations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.* 44:571-577.
- Vitória, A.P. & Sodek, L., 1999. Xylem sap nitrogen compounds of some *Crotalaria* species. *Sci. Agric.* 56:733-737.
- Vogels, G.D. & Van Der Drift, C., 1970. Differential analysis of glyoxylate derivates. *Anal. Biochem.* 33:143-157.
- Wallsgrove, R.M., Lea, P.J. & Mifflin, B.J., 1982. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* 154:473-476.

- Wong, P.P. & Evans, H.J., 1971. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate utilization by soybean nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.* 47:750-754.
- Wutke, E.B., Bulisani, E.A. & Mascarenhas, H.A.A., 1993. I curso sobre adubação verde no instituto agronômico. Documentos IAC.
- Yemm, E.M., Cocking, E.C., 1955. Estimation of amino acids by ninhidrin. *Analyst.* 80:209-213.