

HAIKO ENOK SAWAZAKI

Engenheira Agrônoma

Este exemplar corresponde a relação final da tese
defendida pela candidata HAIKO ENOK SAWAZAKI e
aprovada pela comissão julgadora.

EFEITO DE FONTE EXTERNA DE NITROGÊNIO NO TRANSPORTE

DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM PLANTAS DE SOJA

Glycine max (L.) MERRIL CULTIVAR SANTA ROSA

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção de
Título de Mestre em Ciências
Biológicas na Área de Biologia
Vegetal.

ORIENTADOR: LADASLAV SODEK

CAMPINAS

1986

*A**meus pais**Siguero e Mitico**Ofereço**A meu esposo**Eduardo**e filhos**André e Paulo**Dedico*

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. Ladaslav Sodek do Departamento de Fisiologia Vegetal, UNICAMP, pela sua orientação durante o desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Eli Sidney Lopes da Seção de Microbiologia do Solo, Instituto Agronômico, pelo fornecimento do material inoculante.

Ao Dr. João Paulo Feijão Teixeira, chefe da Seção de Fitoquímica do Instituto Agronômico.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	
1. Considerações gerais	1
2. Transporte de nitrogênio na planta	3
2.1. Ureídeos	7
2.2. Metabolismo de ureídeos	11
2.3. Outros compostos transportadores	18
3. Influência de fatores externos sobre a fixação de N ₂	23
3.1. Fotossintatos	23
3.2. Nodulação e atividade da nitrogenase ...	24
3.2.1. Fatores genéticos.....	28
3.2.2. pH	28
3.2.3. Temperatura	29
3.2.4. Nitrogênio mineral	31
3.2.4.1. Absorção e assimilação	31
3.2.4.2. Influência nos compos- tos transportadores de nitrogênio	33
3.2.4.3. Efeito inibitório	34
3.2.4.4. Hipótese acerca do efeito inibitório	35
3.2.5. Outros fatores	38
4. Objetivos	40

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal	43
2. Coleta de material	45
2.1. Coleta de seiva de xilema	45
2.2. Coleta de seiva de floema	48
3. Preparo dos extratos de folha, haste e va- gem	48
4. Análise	
4.1. Aminoácidos	49
a) aminoácidos livres totais	49
b) composição de aminoácidos	51
4.2. Ureídeos	52
4.3. Ácido alantóico	54
4.4. Alantoína	54
4.5. NH_4^+ e NO_3^-	54
4.5.1. Análise de NH_4^+	55
4.5.2. Análise de NO_3^-	55
4.6. Nitrogenase	56
4.7. Nódulos	57
4.8. Estatística	57

RESULTADOS

1. Plantas cultivadas com N mineral	58
2. Plantas noduladas tratadas com N mineral	61
3. Plantas noduladas com estirpe eficiente e ineficiente	70

4. Conteúdo de ureídeos e aminoácidos em tecidos de plantas noduladas tratadas com NH_4^+	79
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES	102
RESUMO	105
SUMMARY	107
ABREVIATURAS	109
BIBLIOGRAFIA	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vias metabólicas para a biossíntese de ureídeos	13
2	Vias metabólicas para a utilização da alantoina em leguminosas produtoras de ureídeos.	17
3	Metabolismo de N em nódulos para transporte das amidas asparagina e glutamina e da alanina	21
4	Aspecto geral das plantas antes da floração	46
5	Aspecto da coleta de seiva de xilema	48
6	Reações envolvidas na determinação de aminoácidos	50
7	Reações envolvidas na determinação de ureídeos	53
8	Teor de ureídeos e aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias	62

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro		Página
1	Média do número e peso seco de nódulos, taxa de redução de acetileno e teor de ureídeos e aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja com 66 dias, inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65 e cultivadas com solução $-N$, NO_3^- e NH_4^+ durante desenvolvimento	60
2	Teor de alantofina e ácido alantóico de seiva de xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução de $-N$ e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias	64
3	Teor de NH_4^+ e NO_3^- de seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução $-N$ e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias	66
4	Porcentagem do N-total transportado na forma de ureídeos, aminoácidos, NH_4^+ e NO_3^- de seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução $-N$ e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias	67

5	Análise quantitativa e qualitativa de aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias	69
6	Taxa de redução de acetileno e teor de ureídeos e aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65 e a ineficiente SMS 166 ..	71
7	Teor de NH_4^+ e NO_3^- de seiva de xilema de soja inoculada com a estirpe eficiente SMS 65, cultivada em solução -N (noduladas) e tratada com solução NH_4^+ e NO_3^- na época de floração (67 dias).....	74
8	Teor de aminoácidos, ureídeos, ácido alantóico e alantoína de seiva de xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias por sete dias.	75
9	Valores (%) do N-total dos teores de ureídeos, aminoácidos, NO_3^- e NH_4^+ de seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- na época de floração (70 dias)	76

Quadro

Página

- 10 Análise quantitativa e qualitativa de aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias por sete dias 78
- 11 Teor (média) de ureídeos e aminoácidos de seiva de floema, extrato aquoso de folha, vagem e caule de soja inoculada com a estirpe eficiente SMS 65, cultivada em solução -N e tratada com a solução NH_4^+ aos 66 dias 81

INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Estima-se que cem milhões de toneladas de nitrogênio atmosférico sejam fixados anualmente (100 kg/ha) pela atividade de microorganismos de grupos assimbióticos (algas da família Cyanophyceae, bactérias de vida livre) e simbióticos (formando associações como as leguminosas e rizóbios, angiospermas e actinomicetos, algas verde-azuis e plantas inferiores, microorganismos na filosfera e rizosfera, ou não-nodulantes na rizosfera). A maior quantidade de fixação ocorre no relacionamento simbiótico leguminosa-*Rhizobium*, através da redução do dinitrogênio (N_2) a amônia (NH_3) pelas bactérias localizadas nos nódulos (BEEVERS, 1976; RUSCHEL, 1979).

O nitrogênio do solo ou de fertilizantes compe-

te com a fixação biológica, sendo usado preferencialmente pela planta. Quando as bactérias de decomposição atuam sobre o material orgânico nitrogenado, liberam aminoácidos por hidrólise das proteínas; em seguida, as bactérias amonificantes liberam os grupos aminos na forma de íon amônia NH_4^+ , que se dissolve na solução do solo. A amônia pode ser absorvida pelas plantas nessa forma ou depois de sua conversão a nitrito e nitrato. O nitrogênio do solo, por sua vez, é perdido, em decorrência da ação das bactérias de desnitrificação, pela conversão de NO_3^- a nitrogênio atmosférico. O processo de fixação, conversão de N_2 a NH_3 , portanto, é uma etapa crítica neste ciclo de retorno ao solo do nitrogênio atmosférico, permitindo economizar o fertilizante necessário ao crescimento e produção de grãos da maioria das leguminosas (HAYNES & GOH, 1978).

A soja pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae e ao gênero *Glycine* L., sendo a espécie classificada como *Glycine max* (L.) Merrill.

Segundo MIYASAKA (1977), a população mundial, estimada em 1976 em quatro bilhões, irá dobrar nos próximos trinta anos. Diante dessa perspectiva, a produção de alimentos preocupa seriamente as autoridades em todo o mundo, particularmente quanto ao suprimento de alimentos protéicos.

Devido ao baixo custo de produção de óleo de alta qualidade (12 a 23%) rico em ácidos graxos poliinsaturados e proteína (37 a 50%), com bom balanceamento de aminoácidos (apenas deficiente nos sulfurados) - em relação à proteína animal (PORTO, 1983), a soja é um dos produtos pri-

mários de grande importância econômica, passando a produção nacional de 1970 a 1980 de cerca de 1,5 a 15 milhões de toneladas (RUEDELL, 1983).

Nos Estados Unidos, principal país produtor, a produção de 1922 a 1976 se elevou de 144 mil a 43,2 milhões de toneladas (SMITH & CIRCLE, 1980). O Brasil ou a China, dependendo das condições meteorológicas, segue em liderança de produção.

Segundo SICHMANN (1977), para um elevado aproveitamento do nitrogênio do ar pela simbiose, é indispensável misturar uma cultura pura de *Rhizobium japonicum* (inoculante) de comprovada eficiência às sementes de soja. O inoculante é preparado pela seleção, multiplicação e acondicionamento em meio apropriado (turfa) da estirpe de bactéria. A validade do produto quanto ao período vital e à especificidade, deve ser observada, uma vez que a associação bactéria-planta é que condiciona a eficiência da fixação do nitrogênio atmosférico.

No caso da soja, o processo de fixação simbiótica pode fornecer até dois terços do total de nitrogênio assimilado pela planta em condições de campo (HARDY *et al*, 1980).

2. TRANSPORTE DE NITROGÊNIO NA PLANTA

Os principais sítios de assimilação de nitrogênio na soja são raízes e folhas. Geralmente as raízes assimilam nitrogênio como íon NO_3^- ou NH_4^+ e N_2 por fixação atra-

vés dos nódulos, sendo os produtos translocados para a parte aérea através do xilema. O processo natural de assimilação de nitrogênio na folha é pela redução de NO_3^- excedente, translocado das raízes pelo xilema, quando não reduzido no sistema radicular (HAYNES & GOH, 1978). As folhas assimilam nitrogênio aplicado na forma de adubo foliar mais eficientemente como uréia (CAMARGO, 1970), a qual, logo após a absorção, é desdobrada pela urease em amônia e dióxido de carbono, sendo o N translocado através do floema para as regiões de consumo e reserva.

Os principais compostos transportadores de N em planta são os ureídeos e as amidas asparagina e glutamina. Os ureídeos são mais comuns em leguminosas chamadas "tropicais" (STREETER, 1979; LEA & MIFLIN, 1980) e a asparagina e glutamina, nas leguminosas temperadas e outras espécies (LEA & MIFLIN, 1980). Substitutos das amidas, tais como α -metileno-glutamina, são somente encontrados como transportadores de N em pequeno número de espécies (LEA & MIFLIN, 1980). Embora somente um limitado número de compostos sejam utilizados para transporte da maior parte do nitrogênio em plantas superiores, ocorre uma ampla variação de compostos nitrogenados dentro da planta, de acordo com o tipo de N assimilado.

YONEYAMA & ISHIZUKA (1982) verificaram que, nos nódulos de soja, o N do N_2 fixado foi consideravelmente incorporado, enquanto a transferência para os nódulos de N-NH_4^+ e N-NO_3^- foi menos pronunciada. Nas raízes, o N_2 fixado foi pouco distribuído, enquanto grande proporção de N-NO_3^- e

N-NH_4^+ foi para suas partes de crescimento, ocorrendo a incorporação de N-NO_3^- na fração protéica. A aplicação de $^{15}\text{NO}_3^-$ aumentou o $^{15}\text{NO}_3^-$ da parte aérea, de onde, depois, 32% foi retransferido às raízes em crescimento, ou seja, na sua fração protéica ocorreu incorporação direta de parte do $^{15}\text{NO}_3^-$, enquanto o restante do acúmulo proveio do nitrogênio retransferido pela parte aérea.

ROSENDAHL (1984) relatou que plantas de ervilha em simbiose com linhagem de *Rhizobium* que resultou em menor produção de biomassa nodular, continham seiva em que asparagina mais ácido aspártico foram responsáveis por 69%, enquanto glutamina mais homosserina o foram por 25% do transporte de compostos nitrogenados. Por sua vez, plantas de ervilha em simbiose com linhagem de *Rhizobium*, resultando em maior quantidade de tecido nodular, continham seiva onde asparagina mais ácido aspártico foram responsáveis por 51%, e glutamina mais homosserina, por 43% do transporte de compostos nitrogenados. A composição de aminoácidos da seiva do xilema pode indicar, portanto, a influência dos bacteróides sobre o sistema enzimático assimilatório do N no citossol da planta, ou estoque dos intermediários do ciclo de Krebs, ou compostos relacionados nos nódulos. Isso foi baseado em que o N_2 fixado pelos bacteróides é exportado como amônia e assimilado no citossol da planta pela enzima glutamina sintetase (GS): assim, a indução da atividade da glutamato sintase (GOGAT) no citossol da planta pela atividade da nitrogenase nos nódulos tem sido indicada. Como o ATP e intermediários do ciclo de Krebs são requeridos para a ação das en-

zimas assimilatórias, a ocorrência de compostos aspartil na seiva, indicativos de melhor economia de carbono em relação aos compostos glutamil, sugere influência do bacteróide. Os compostos aspartil envolvem a atividade do sistema fosfoenol ácido pirúvico carboxilase nas raízes e nódulos como um mecanismo capaz de gerar ácido oxaloacético para o ciclo de Krebs.

A maioria das informações concernentes à atividade assimilatória das raízes provém da análise da seiva coletada das raízes ou do tecido do xilema, através de perfusão ou extração a vácuo de segmentos da parte aérea (LEA & MIFLIN, 1980). McCLURE *et al.* (1980) relataram a coleta da seiva do xilema por capilaridade. Após o corte da haste da planta de soja logo abaixo do primeiro nódulo cotiledonar, a coleta foi realizada, encostando-se uma pipeta capilar logo acima do xilema cortado.

Já a seiva do floema pode ser obtida pelo corte do tecido vascular. FELLOWS *et al.* (1980) descreveram a coleta pelo corte da extremidade final da vagem, dentro de uma solução de EDTA 20mM para evitar fechamento dos vasos, e introdução do final cortado em um frasco com 2 ml de solução de EDTA para o recolhimento da seiva, por três horas, sem que a vagem fosse destacada da planta.

A menor solubilidade dos ureídeos implica na necessidade do transporte de um volume grande de água, 2,6 vezes mais água que a necessária para transportar quantidades equivalentes de nitrogênio na forma de asparagina (SPRENT, 1980), razão pela qual, em clima temperado, de menor tempe-

ratura, diminui a solubilidade da alantoína e ácido alantóico, não sendo usual o sistema de transporte de N via ureídeos.

2.1. UREÍDEOS

Entre os ureídeos, compostos nitrogenados contendo uréia e fragmentos de dois carbonos, o ácido alantóico e a alantoína têm sido descritos como os principais compostos nitrogenados em uma variedade de espécies de plantas, apesar de outros compostos, como citrulina, serem abundantes em certas espécies (Bollard, em 1959, *in* THOMAS & SCHRADER, 1981b).

Maior quantidade de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) foi encontrada em cada órgão de planta de soja (exceto semente) fixando N_2 em comparação com plantas não-noduladas cultivadas com N-mineral (FUJIHARA *et al.*, 1977). Como principais sítios de acúmulo de ureídeos em soja nodulada, foram relatados ramos, pecíolos e pontos de crescimento (PATE *et al.*, 1980; THOMAS *et al.*, 1980) ou medula e xilema dos tecidos dos ramos e paredes de vagens em desenvolvimento (THOMAS & SCHRADER, 1981a; YONEYAMA & ISHIZUKA, 1982). Sendo baixa a concentração de ureídeos nas sementes e folhas, foi sugerido que, após transferência aos órgãos em desenvolvimento, os ureídeos seriam metabolizados a outros compostos nitrogenados (YONEWAMA & ISHIZUKA, 1982).

Segundo STREETER (1979), o teor de ureídeos aumentou no florescimento e foi maior na fase reprodutiva de

plantas de soja, ou na fase de formação inicial de vagem com enchimento de semente, pois N na forma de NO_3^- e aminoácido excedeu N-ureídeo no xilema antes do florescimento. N-ureídeo em haste e fruto declinou de 37,7% e 15,5% do N-total nas fases de desenvolvimento de vagem e de semente a quase zero na maturidade. N-ureídeo, portanto, não foi a principal forma de N translocada previamente ao desenvolvimento reprodutivo e após a maturidade.

SCHUBERT (1981) reportou que, em planta de soja nodulada crescendo em solução sem nitrogênio, ácido alantóico e alantoína respectivamente representaram de 60 a 95% do N-total na seiva do xilema, antes e depois da fixação plena.

STREETER (1979) encontrou relação entre alantoína e ácido alantóico de aproximadamente 60:40 para o N-ureídeo na folha, haste e frutos de planta de soja em desenvolvimento. Essa relação, porém, inverteu no xilema e em hastes e frutos de plantas maduras, sendo ácido alantóico maior que alantoína. Por outro lado, THOMAS & SCHRADER (1981a) encontraram maior quantidade de ácido alantóico, não alantoína, em folhas e frutos de soja em desenvolvimento. Também ácido alantóico foi a forma predominante de ureídeo em cada órgão de soja nodulada (THOMAS *et al.*, 1980), ou em seiva de xilema (McCLURE & ISRAEL, 1979; SCHUBERT, 1981), ou xilema de planta de soja crescendo em presença tanto de NO_3^- como NH_4^+ (THOMAS *et al.*, 1979). Segundo THOMAS *et al.* (1979), o ácido alantóico contribuiu com 13% do N-total em plantas cultivadas com NO_3^- , enquanto N- α -amino e N-amida contribuí-

ram com 22% e N-NO_3^- , com 60%. Em plantas crescendo com NH_4^+ , o ácido alantóico contribuiu com 43% do N-total na forma orgânica.

A evidência de que a planta de soja nodulada suprida com $^{15}\text{NH}_3$ tem baixa quantidade de ^{15}N na fração N-alantoína em relação a de N-aminoácido, sugere que grande parte do N-ureídeo seja produzido no nódulo através da fixação de N_2 . O NH_3 aumentou a quantidade do N-amino da raiz e haste, e não do ureídeo no nódulo, devendo ocorrer rápida assimilação do $^{15}\text{NH}_3$, conversão a aminoácidos e transporte (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978).

OHYAMA & KUMAZAWA (1979), tratando o sistema radicular de plantas de soja no início do florescimento com gases $^{15}\text{N}_2$ e NO_3^- ou ar e $^{15}\text{NO}_3^-$, encontraram alto conteúdo de ^{15}N na fração alantoína de hastes de planta com tratamento $^{15}\text{N}_2$, e a relação $^{15}\text{N}_2/^{15}\text{NO}_3^-$ da alantoína foi 10 a 50 vezes maior que a de outros componentes, sugerindo que alantoína foi ativamente sintetizada nos nódulos e rapidamente transportada nas partes vegetativas das plantas.

Embora existam fortes evidências associando a produção de ureídeos com fixação de N_2 , mesmo em plantas não noduladas são encontradas pequenas quantidades de ureídeos, principalmente nas raízes e folíolos (McCLURE & ISRAEL, 1979; PATE *et al.*, 1980).

Vários trabalhos têm sido realizados no sentido de verificar a possibilidade de usar o nível de ureídeo como indicador da fixação do N_2 . PATTERSON & La RUE (1983a) e BERKUM *et al.* (1985) encontraram correlação positiva para a

concentração de ureídeos como índice de fixação de N_2 , avaliada pelos métodos de redução de acetileno, diluição isotópica (^{15}N) e diferença do acúmulo de N em planta nodulada e não-nodulada.

Pela linearidade da relação encontrada entre ureídeos e fixação de N_2 em raízes e hastes de plantas de soja, a haste foi sugerida como o tecido mais adequado para usar a técnica de relacionamento dos níveis N -ureídeo/(N -ureídeo + nitrato) com o fim de quantificar a fixação de N_2 (HERRIDGE, 1982a).

PATTERSON & La RUE (1983b), inibindo a atividade de redução de acetileno (ARA) por anaerobiose na raiz, obtiveram diminuição do teor de ureídeos na seiva de xilema e tecido de haste, porém a concentração de ureídeos na seiva refletiu decréscimo da fixação de N_2 mais rapidamente que no tecido de haste. Por remoção da folha ou redução na intensidade de luz, obtiveram redução da ARA com aumento da concentração de ureídeos na haste. Por remoção da vagem, não ocorreu mudança na ARA, mas aumentou o teor de ureídeo da haste. Esta, portanto, pareceu servir como sítio de estocagem de ureídeos, não tendo ocorrido sempre um direto relacionamento entre fixação de N_2 e alteração na concentração de ureídeo, sugerindo não ser bom índice da fixação de N_2 . Em trabalho subsequente, PATTERSON & La RUE (1983c), observaram que a haste jovem de soja é o melhor tecido para verificar a quantidade de ureídeos como índice de fixação de N_2 , visto terem encontrado correlação em três estádios de crescimento a alta ou a baixa taxa de fixação. Esse método

tem a vantagem de não ser destrutivo em relação ao de redução de acetileno. Os autores usaram a fração N-ureídeo/(N-ureídeo + N-NO_3^-), semelhante à usada por HERRIDGE (1982a,b).

BERKUM *et al.* (1985) relataram que N-ureídeo de topo ou parte aérea de planta de soja pode ser indicativo da fixação de N_2 e efetividade do *Rhizobium*, ou seja, pode ser utilizado para a classificação de estirpes da bactéria. Com tratamento de inoculação utilizando vinte e sete estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, correlacionaram a variação N-ureídeo com redução de acetileno e massa nodular.

PATE *et al.* (1980) relataram que, devido à dissimilaridade de fixação e quantidade de ureídeo + nitrato recuperada pelas partes da planta, além da proporção relativamente pequena de N-total como N-NO_3^- ou N-ureídeo, é preferível usar a seiva do xilema, cuja composição é bem diferente em plantas de soja noduladas ou não. A fixação foi estimada através da relação N-(ureídeo + glutamina)/N-asparagina + NO_3^- , ou também em xilema, N-ureídeo/N-aminoácido segundo McCLURE *et al.* (1979), ou N-ureídeo/N-total por McCLURE *et al.* (1980).

2.2. METABOLISMO DE UREÍDEOS

O preciso comportamento, a localização e a regulação da assimilação de ureídeos não estão esclarecidos, havendo necessidade de investigações sobre como o N-ureídeo é convertido em proteína da semente, pois leguminosas economicamente importantes, como a soja, são produtoras de ureí-

deos.

THOMAS *et al.* (1980) não encontraram evidência em *Phaseolus* não-nodulado de síntese direta através da condensação de uréia e glioxilato, sendo consistente, porém, a síntese dos ureídeos via degradação das purinas.

THOMAS & SCHRADER (1981b) relataram a possibilidade de duas vias biossintéticas dos ureídeos através da reciclagem dos seus produtos de degradação: condensação direta da uréia e glioxilato formando o ácido alantóico com reação reversa da alantoinase (enzima de degradação do ácido alantóico), produzindo alantoína, ou reciclo do glioxilato para precursores das purinas cuja degradação originaria os ureídeos.

A figura 1 esquematiza as possíveis vias metabólicas para a síntese de ureídeos.

Conforme SCHUBERT (1981), em planta de soja nodulada desenvolvendo sem N-mineral, a taxa de redução de C_2H_2 e a atividade da fosforribosilpirofosfato sintetase que catalisa a formação de fosforribosilpirofosfato (PRPP) requerido para síntese da purina, aumentaram até o 49º dia, declinando depois, embora o exporte de ureídeos por planta tenha aumentado até o 63º dia. A atividade da glutamina sintetase (GS), que assimila o N_2 recentemente fixado, tornando-o disponível como um grupo amino para síntese de aminoácidos ou purinas, seguiu padrão similar ao da redução de acetileno, não declinando, porém, após o 49º dia. Também a atividade das enzimas do catabolismo da purina nos nódulos, xantina desidrogenase (XDH), uricase e alantoinase, aumen-

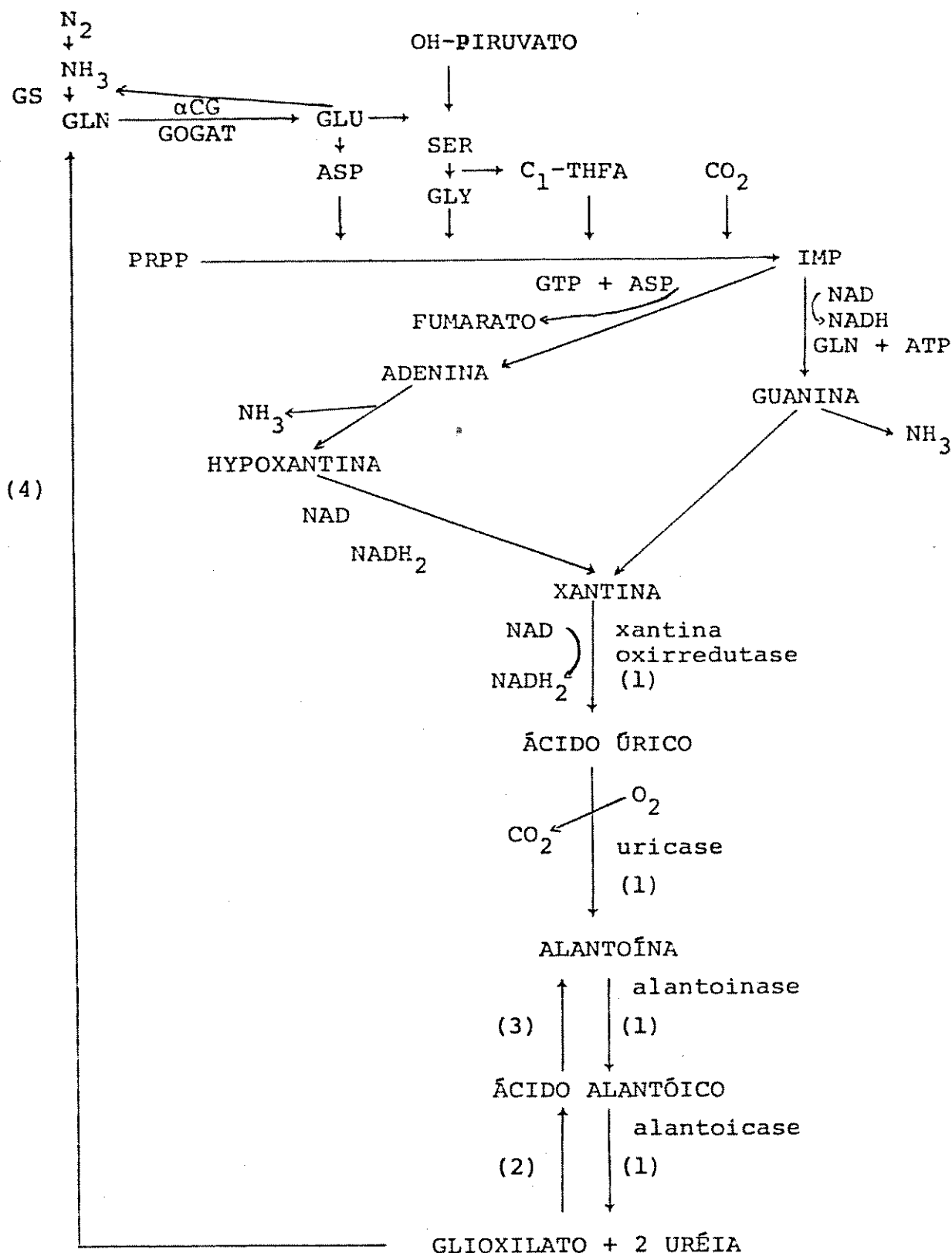


Figura 1. Possíveis vias metabólicas para a síntese de ureídeos: (1) degradação aeróbica da purina; (2) condensação do glioxilato-uréia; (3) reação reversa da alantoinase; (4) reciclo do glioxilato. Adaptação de LEA & MIFLIN (1980), THOMAS & SCHRADER (1981b) e SHELPS *et al* (1983). Abreviações: α CG, cetoglutarato; PRPP, fosforribosilpirofosfato; IMP, inosina monofosfato; THFA, tetrahidrofolato; OH-PIRUVATO, hidroxipiruvato.

taram em paralelo com o aumento da massa nodular e exporte de ureídeos. Segundo o autor, o N_2 recentemente fixado foi utilizado na síntese de novo das purinas, subseqüentemente, catalizado para produzir ureídeos.

REYNOLDS *et al.* (1982), em estudo com nódulos de soja, constataram o aumento da 5-fosforribosilpirofosfato amido transferase (PRAT), a primeira enzima da via biossintética de novo da purina logo após aumento da asparaginase. Depois aumentaram as enzimas envolvidas no suprimento dos precursores das purinas. Por último, ocorreu o aumento das enzimas oxidativas da purina para a biossíntese dos ureídeos, xantina desidrogenase e uricase, confirmando a via biossintética dos ureídeos pela síntese e degradação da purina. Os autores relataram a absorção do NH_4^+ e a síntese de ureídeos ocorrendo no citossol.

ATKINS *et al.* (1984b) verificaram que, em caupi nodulado, aumentou a atividade da nitrogenase e o conteúdo da hemoglobina seguido por rápido aumento das enzimas assimilativas de amônia, GS e GOGAT, da síntese de novo da purina, das enzimas de degradação das purinas, xantina oxidase e urato oxidase, de uma enzima com comportamento anaplerótico mais geral, a fosfoenol piruvato carboxilase e de ureídeos (alantoína e ácido alantônico) no xilema da planta. Quando, porém, as plantas foram cultivadas com o sistema de raízes noduladas mantidas na ausência de N_2 (em 80 Ar:20 O_2 , v/v), ocorreu pouco efeito na taxa de indução e aumento da atividade de nitrogenase, conteúdo de hemoglobina, enzimas assimilativas de amônia e da biossíntese de purinas ou ureí-

deos. A adição de baixo nível de NO_3^- (0,1-0,2 mM) neutralizou a deficiência de N da planta hospedeira, mas não aumentou o nível enzimático do metabolismo de N, tanto na fração bacteróide como na celular do nódulo da planta, assim como a síntese de novo da purina localizada no plastídeo, com consequente não-indução da síntese ureídica. Foi sugerido, portanto, que a síntese de ureídeos em nódulos, assim como a sequência de novo da purina localizada no plastídeo, sejam características especiais decorrentes do fluxo pronunciado de NH_4^+ pelos bacteróides.

Segundo FUJIHARA & YAMAGUCHI (1981), a uricase foi detectada só em nódulos viáveis e não em nódulos jovens onde a leghemoglobina não foi encontrada.

THOMAS & SCHRADER (1981b) descreveram as possíveis reações das enzimas de degradação dos ureídeos. A alantoïnase hidrolisaria a alantoína, originando o ácido alantóico. A alantoicase envolveria duas etapas de reação com duas enzimas, a alantoicase e a ureidoglicolase: a primeira etapa hidrolisaria o ácido em uréia e ácido ureidoglicólico e, a segunda, o ureidoglicolato em ácido glioxílico e uréia. Um comportamento alternativo na degradação dos ureídeos ainda não confirmado em plantas superiores, segundo os autores, é pela enzima alantoato amido-hidrolase, que hidrolisaria o alantoato em amônia, CO_2 e ureidoglicolato, ou por um intermediário desta reação enzimática, a ureidoglicina, produziria glicina e ácido oxalúrico.

ATKINS *et al.* (1982) verificaram que, com o suprimento de ($2\text{-}^{14}\text{C}$), ($1,3\text{-}^{15}\text{N}$) alantoína na corrente de

transpiração do mesófilo foliar de leguminosa nodulada, todos os órgãos dos ramos mostraram atividade ureolítica e metabolisaram prontamente o ^{14}C -alantoína a $^{14}\text{CO}_2$. O ácido alantóico encontrado em todos os órgãos dos ramos provou a atividade da alantoinase, assim como a existência de ^{14}C -uréia sugeriu a hidrólise do ^{14}C -ácido alantóico pela alantoicase ou amido hidrolase e ureidoglicolase. Um comportamento metabólico de utilização do N-ureídeo, portanto, foi indicado via ácido alantóico, a uréia e NH_3 .

SHELP & IRELAND (1985) não comprovaram a atividade da ureidoglicolase ou mesmo da alantoicase; relataram, porém, a evidência indireta de utilização, em folha de soja nodulada no escuro, de alantoína via alantoato, ureidoglicolato e glioxilato, com a produção de 2 moles de uréia originando 4 moles de NH_3 e 2 moles de CO_2 . Verificaram que o metabolismo tanto de ^{14}C -uréia como de $(2\text{-}^{14}\text{C})$ -alantoína, produziu NH_3 e $^{14}\text{CO}_2$ com a estequiometria aproximada de 2:1 e, pelo artefato de inibição da atividade ureolítica, encontraram redução similar da produção de NH_3 e CO_2 para ambos os substratos, com o concomitante acúmulo de uréia. Sendo a inibição da atividade ureolítica praticamente a causa da perda de produção de NH_3 , foi evidenciada apenas a via alantoato, ureidoglicolato e uréia, pois as demais rotas metabólicas, tais como ureidoglicolato e oxalurato ou amidohidrolase e ureidoglicina, continuariam a liberar parte de NH_3 mesmo com a inibição ureolítica (Figura 2).

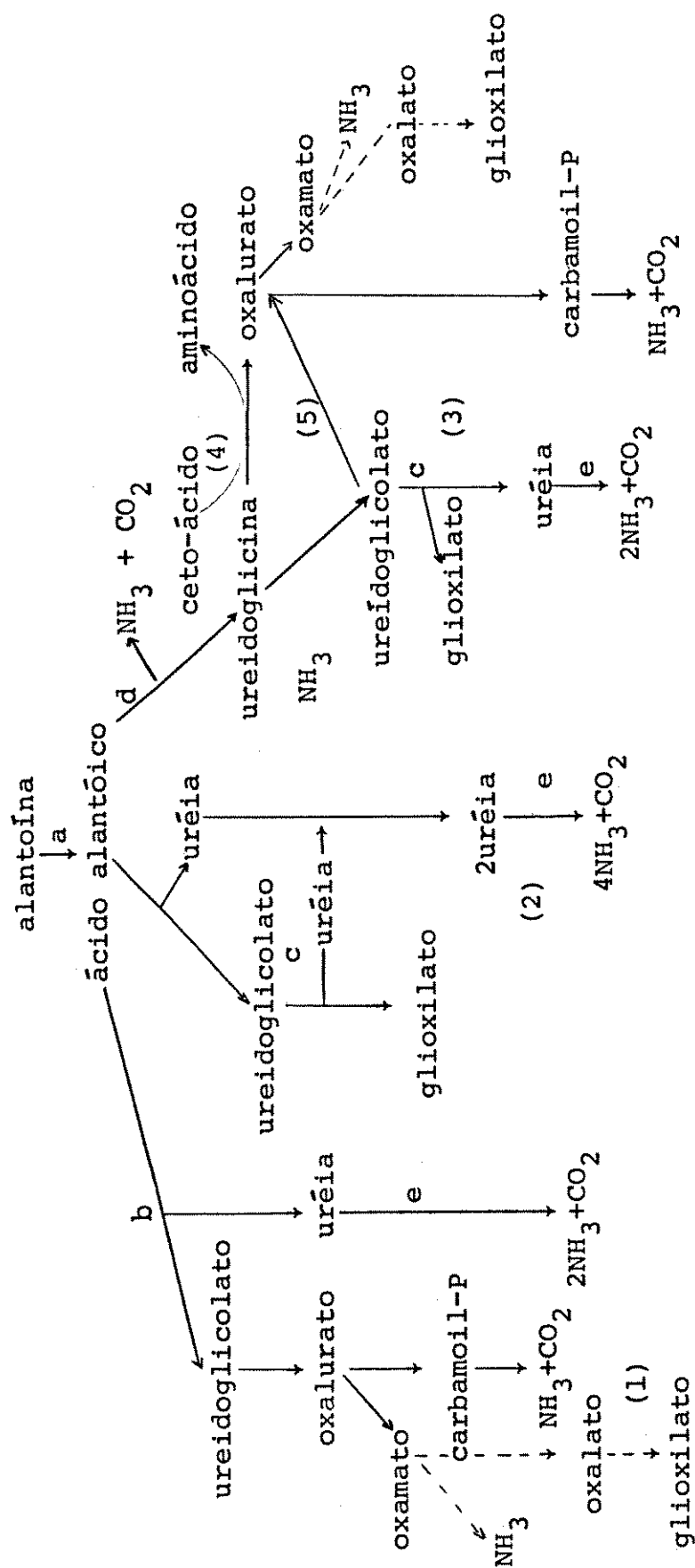


Figura 2. Possíveis vias metabólicas para a utilização da alantoina em leguminosas produtoras de ureídeos, de acordo com SHELPS & IRELAND (1985). Metabolismo do oxamato (---) não tem sido demonstrado em organismos reconhecidos com metabolismo de ureídeos. a: alantoinase; b: alantoicase; c: ureidoglicolase; d: alantoato amidohidrolase; e: urease.

2.3. OUTROS COMPOSTOS TRANSPORTADORES

Nas espécies de leguminosas em que o nível de ureídeos é baixo ou nulo, a exportação do N orgânico de suas raízes ocorre principalmente na forma das amidas asparagina e glutamina: a asparagina está usualmente presente em maior concentração, e a composição da seiva não muda aparentemente com a forma de N (N_2 , NO_3^- , NH_4^+ ou uréia) fornecida. Em contraste, todas as leguminosas produtoras de ureídeos, quando alimentadas simbioticamente ou por fonte de nitrogênio, mostram diferentes misturas dos compostos do xilema. O processo preponderante de assimilação de nitrogênio determina, em grande parte, o tipo de composto nitrogenado que é transportado e fica disponível para os órgãos de crescimento.

A ocorrência de amidas substituídas, α -metileno-glutamina, principal composto nitrogenado do xilema de amendoim, teanina, derivado da glutamina, responsável por 80% do conteúdo de aminoácido de raízes de plantas de chá jovens, foi relatada por Fowden, em 1954, e Takeo, em 1974 (in LEA & MIFLIN, 1980).

Estudos com $^{15}NH_4^+$ em nódulos destacados de soja encontraram maior acúmulo de ^{15}N no N-amida da glutamina, depois no glutamato e subsequente concentração na asparagina. Com o suprimento de (^{15}N)-amida-glutamina, o ^{15}N ocorreu quase que total no N-amida da asparagina. Estes estudos indicaram o sistema ativo glutamina ligada a asparagina nos nódulos (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1980).

A via biossintética glutamina ligada a asparagina foi confirmada como a preferencial para a assimilação de NH_4^+ , pelo aumento das enzimas GS, GOGAT e aspartato aminotransferase (AAT) paralelo a indução da nitrogenase e síntese da hemoglobina em nódulos de soja em desenvolvimento, assim como pelo fato de que a asparagina sintetase (AS) tem baixo K_M para a glutamina. O teor de asparagina inicialmente se elevou seguindo-se um declínio e novamente um aumento. Uma rota alternativa ou acúmulo foi sugerida como explicação da recuperação do teor de asparagina que ocorreu após a atividade de a AS ter declinado (REYNOLDS *et al.*, 1982).

Uma sugestão referente à inibição da síntese de asparagina foi relatada por PATE *et al.* (1980) como decorrente da competição biossintética entre a asparagina e os ureídeos, através da degradação de purinas. A biossíntese ureídica requer 2 átomos de N amídico, ou como glutamina ou asparagina, e 1 átomo de N de aspartato para formar 3 dos 4 átomos necessários.

Outra hipótese formulada foi baseada no fato de que em condições de excesso de carbono, o nível de ATP seria alto e haveria grande suprimento de α -cetoglutarato favorecendo a operação GS/GOGAT, sem a diversificação da glutamina para asparagina (MIFLIN & LEA, 1977). A assimilação do NH_4^+ induziria a diminuição da taxa de C/N e da via glutamina ligada a asparagina, a qual tem a relação 2N:4C, estimulando a biossíntese de ureídeos, de suficiente solubilidade na seiva de células, e a relação de 1N:1C necessitando de menos carbono que a asparagina (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1981).

Outros estudos com nódulos destacados de soja relataram que, após suprimento de (^{13}N) N_2 por 15 minutos (MEEKS *et al.*, 1978), ou $^{15}\text{NH}_4^+$ por 60 minutos (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1981), o maior acúmulo de ^{13}N ocorreu na alanina, seguida pelo glutamato. O ^{15}N , por sua vez, acumulou na alanina seguida pelo N-amida da asparagina e do glutamato. Foi, portanto, indicado que, após a incorporação do N pelas enzimas GS e GOGAT, ocorreram não apenas as vias biossintéticas pelas enzimas AAT e AS com formação do aspartato e asparagina, mas também pela enzima alanina aminotransferase.

A figura 3 esquematiza o metabolismo em nódulos de planta para transporte das amidas asparagina e glutamina e da alanina.

THOMAS *et al.* (1979) relataram que, em seiva de plântulas de soja crescendo com nitrato, asparagina foi o principal aminoácido, constituindo 44% do N-aminoácido total (N- α -amino livre e N-amida), seguido pela glutamina (13%), dois aminoácidos básicos, lisina (9%) e histidina (7%), e pelo ácido aspártico (7%), sendo os cinco responsáveis por 80% do N-aminoácido total. Quantidades significantes de arginina, valina, ácido glutâmico, treonina, γ -aminobutírico e serina foram também detectadas, com traços de alanina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina e tirosina.

OHYAMA & KUMAZAWA (1979) relataram que compostos de N solúvel derivados de $^{15}\text{NO}_3^-$ absorvidos pela raiz, foram transportados na mesma proporção da raiz para a haste, enquanto os derivados de $^{15}\text{N}_2$ absorvidos pelos nódulos manifestaram um sistema seletivo, resultando no maior transporte

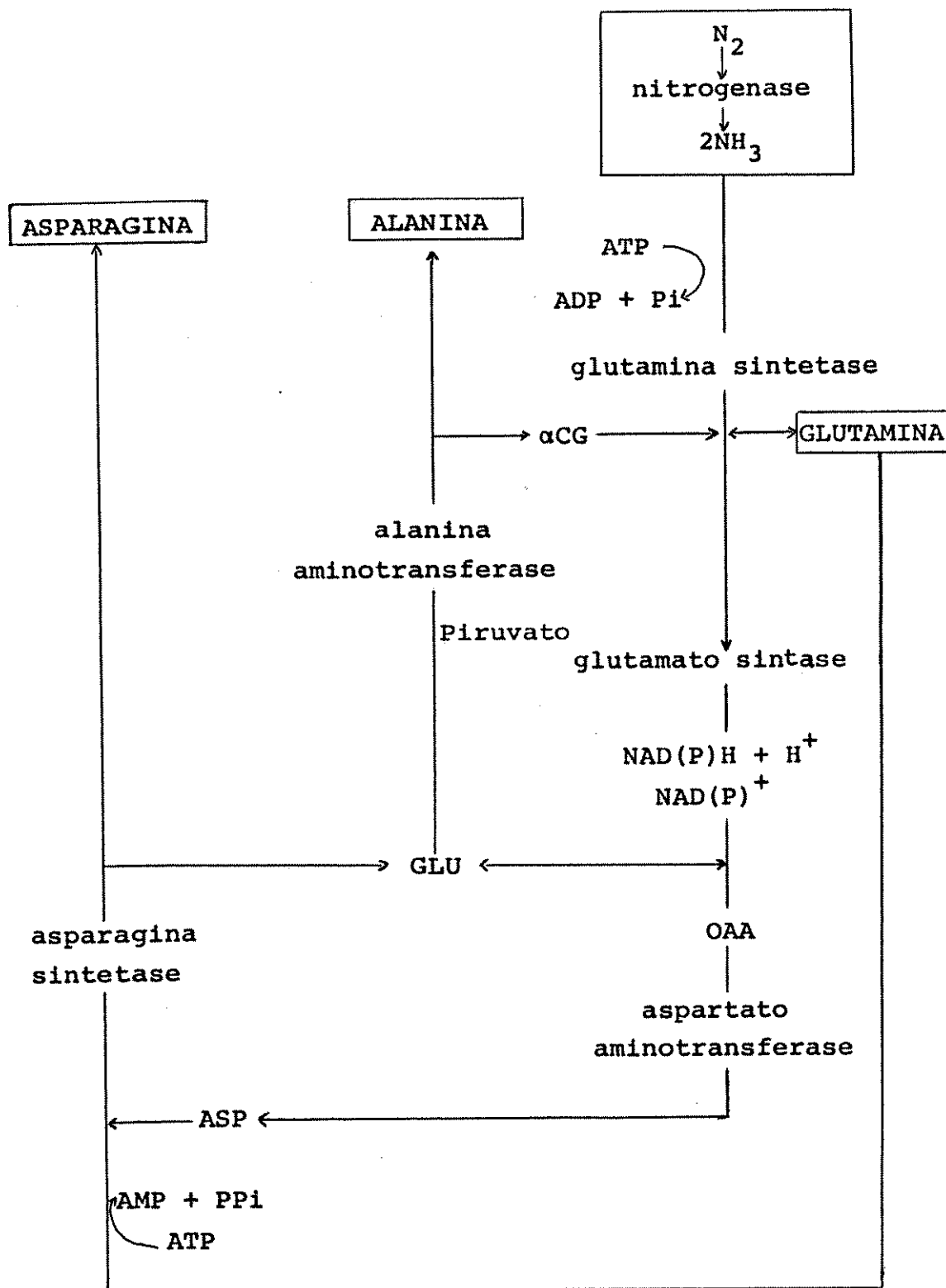


Figura 3. Metabolismo de N em nódulos para transporte das amidas asparagina e glutamina e da alanina. Adaptação de acordo com REYNOLDS *et al.* (1982) e FUJIIHARA & YAMAGUCHI (1981).

de alantoína, asparagina, ácido aspártico, glutamina e amônia dos nódulos para a planta.

Ácido aspártico, lisina, valina, leucina e ácido glutâmico foram os principais constituintes não-amídicos na seiva do xilema de leguminosas noduladas ou não, supridas com NO_3^- . Estes aminoácidos representaram 15-20% dos compostos, sendo os principais a asparagina e a glutamina. A taxa asparagina/glutamina aumentou com o aumento da dependência sobre o NO_3^- (PATE *et al.*, 1980).

Outros estudos com seiva de xilema relataram a asparagina como o principal aminoácido constituinte em planta de soja não-nodulada crescendo com nitrato (McCLURE *et al.*, 1979); ou em soja nodulada sem N-fertilizante (SCHUBERT, 1981); ou junto com a glutamina, em caupi não nodulado (ATKINS *et al.*, 1980); ou junto com o ácido aspártico, em ervilha com simbiose mais efetiva, enquanto em simbiose menos efetiva, a glutamina e a homosserina foram maiores (ROSENDAHL, 1984). THOMAS *et al.* (1983) relataram que a composição relativa do N na seiva de plantas de soja com três semanas foi semelhante tanto para simbiose mais efetiva como para simbiose comum.

Segundo LEA & MIFLIN (1980), a glutamina é o único composto que não requer energia adicional para o metabolismo, uma vez que a amida, por si só, é diretamente envolvida na assimilação da amônia. A asparagina perde os 3 mol de ATP requeridos para a síntese do grupo amida, quando a amônia é liberada. Por sua vez, os ureídeos utilizam alto teor de energia como compostos transportadores de N, pois a

síntese de purinas requer 6 moles de ATP junto com dois grupos metil ativados, os quais, mais tarde, são perdidos como CO_2 , e todo o N transportado é liberado como amônia, necessitando de energia para reassimilação.

3. INFLUÊNCIA DE FATORES EXTERNOS SOBRE FIXAÇÃO DE N_2

3.1. FOTOSSINTATOS

Uma vez conhecida a alta demanda energética, pois cerca de 6 elétrons e 12 mol de ATP são requeridos, pelo menos, para a redução do N_2 a NH_3 e 2 elétrons mais 4 mol de ATP para desprendimento do H_2 (PHILLIPS, 1980), o aumento da taxa fotossintética fornecedora de substrato para o metabolismo produtor de energia parece interessante como meio de aumentar a fixação. Portanto, o sistema ativo fixador de CO_2 pelas raízes e nódulos de soja (COKER & SCHUBERT, 1981), ou o enriquecimento do CO_2 do ar ao redor da leguminosa, aumentando a fotossíntese líquida (HARDY & HAVELKA, 1973), aumentariam os fotossintatos pela respiração aeróbica dos bacteróides, fornecendo esqueletos de carbono para assimilação do NH_4^+ e biossíntese de aminoácidos, além da energia e redutantes.

ATKINS *et al.* (1980) sugeriram que raízes de planta nodulada em relação a não-nodulada, além de requerimento extra para funcionamento do nódulo, devem ter maior proporção de componentes não assimilatórios da respiração, perdendo mais C como CO_2 na respiração. Estudando planta de

caupi nodulada dependente de fixação de N_2 e não-nodulada submetida a níveis de NO_3^- suficiente para proporcionar similar crescimento, encontraram maior proporção de fotossintato enviado para as partes inferiores em plantas noduladas.

3.2. NODULAÇÃO E ATIVIDADE DA NITROGENASE

No processo de infecção, bactérias se modificam formando bacteróides e nódulos por atividade meristemática das células infectadas. Simultaneamente, é produzido um pigmento vermelho, a leghemoglobina, que parece difundir o oxigênio aos bacteróides para manter a respiração e, ao mesmo tempo, devido à rápida formação de derivados oxigenados da hemoglobina, dispersar o oxigênio do sítio de fixação, prevenindo, assim, a inibição da enzima anaeróbica nitrogenase (BEEVERS, 1976). A essa enzima, produzida pelo bacteróide, é atribuída a capacidade para fixação do N atmosférico. Parece ser um complexo de duas enzimas, a molibdeno-ferroproteína, de PM 250.000-270.000, e a ferroproteína, de PM 55.000-57.000, requerendo uma fonte de elétrons, como a ferredoxina ou flavodoxina, e energia na forma ATP para reduzir o complexo nitrogenase, que então transfere seus elétrons a um acceptor apropriado, normalmente o nitrogênio (BEEVERS, 1976; RUSCHEL, 1979).

Segundo SHANMUGAN *et al.* (1978), a energia é usada não apenas para redução de N_2 , mas assimilação de NH_4^+ pelo citoplasma celular da planta e presumivelmente para absorção de compostos de carbono desse citoplasma pelos bacte-

róides, os quais são metabolizados via ciclo de Krebs acoplado a cadeia respiratória para produção de energia. Após produção de NH_4^+ pela nitrogenase dentro dos bacteróides, a exportação para a planta foi sugerida como consequência de que as atividades das enzimas de assimilação do NH_4^+ , GS e GOGAT, aumentariam na fração da planta e não no bacteróide. A não formação de glutamato pela GOGAT e glutamina pela GS foi relatada ser consequência da repressão das enzimas de assimilação do NH_4^+ pelo bacteróide. Dois sistemas adicionais, além da respiração, como fornecedor da fonte de elétrons, teriam importante ação no metabolismo de energia da nitrogenase, o de tomada de H_2 pela hidrogenase e o da nitrato redutase (NR).

RAINBIRD *et al.* (1983c) relataram que, juntamente com a fixação de N_2 em nódulos de leguminosas, a nitrogenase reduz prótons formando H_2 , com diminuição da energia disponível para redução de N_2 . Verificaram em caupi nodulado com estirpe de alta ou baixa evolução de H_2 , a não-ocorrência de diferenciação na fixação, produção de matéria seca e semente, solutos nitrogenados exportados ou distribuição de fotossíntese dentro da planta. Nódulos com baixa evolução de H_2 , porém, perderam menos CO_2 na respiração, economizando mais carbono.

RAINBIRD *et al.* (1983b) usaram a diferença entre evolução de H_2 de nódulos de caupi em ar ou $\text{Ar}:\text{O}_2$ (80:20, v/v) e o método de diluição isotópica de $^{15}\text{N}_2$, para estimar atividade da nitrogenase durante o dia, a 30°C , e à noite, a 20°C . Verificaram que não ocorreu variação diurna na

fixação de N_2 , porém a atividade da nitrogenase variou com o fluxo de elétron através da enzima, sendo à noite 60% da durante o dia, devido à menor evolução do H_2 , ou seja, à noite ocorreu menor competição para redução do N_2 .

ATKINS *et al.* (1984b) verificaram a liberação contínua de H_2 em plantas de caupi cultivadas com o sistema de raízes noduladas mantido na ausência de N_2 (em $Ar:O_2$), enquanto a taxa declinou a zero nos nódulos em ar, indicando que houve menos reciclagem efetiva de H_2 no sistema de $Ar:O_2$ comparado ao em ar. Aparentemente, a atividade de absorção pela hidrogenase, embora inicialmente induzida em ambos os sistemas, não foi mantida na ausência de N_2 ; a eficiência de uso do carbono pelos nódulos no sistema em $Ar:O_2$, portanto, foi aparentemente reduzida.

ATKINS *et al.* (1984a) verificaram que, proporcionando nitrato em plântulas de caupi noduladas com sistema de raiz crescendo em $Ar:O_2$ (sem fixação de N_2), aumentou largamente o nível de proteína da fração celular da planta em relação à dos bacteróides. Em contraste, tratamento de NO_3^- em plantas com sistema de raiz crescendo em ar (com fixação), aumentou a proteína das frações bacteróides e planta. Verificaram, ainda, que nódulos efetivos de planta desenvolvida de semente com ^{15}N apresentaram maior proporção de diluição de ^{15}N nos bacteróides em relação às células vizinhas do hospedeiro, indicando incorporação seletiva do N fixado recentemente dentro dos bacteróides. Estes resultados indicaram que a incorporação direta dos produtos de fixação (NH_4^+), pelos bacteróides, pode ser uma característica deci-

siva no estabelecimento e crescimento de uma simbiose efetiva.

STREETER (1985b) relatou, em planta de soja nodulada, o alto conteúdo (96%) de N-amino e N-ureídeo no citossol em comparação com o teor no bacteróide (4%), confirmando a assimilação de NH_4^+ e a síntese de ureídeos no citossol relatada por REYNOLDS *et al.* (1982).

Os geneticistas podem selecionar estirpes de *Rhizobium* mais efetivas no processo de infecção e na produção de nódulos ativos (BRILL, 1980), ou, ainda, selecionar plantas hospedeiras com maior potencial de nodulação, visto o número de nódulos estar sob controle genético (PHILLIPS, 1980).

O estabelecimento funcional dos nódulos das raízes, o mais cedo possível, parece interessante como meio de aumentar a fixação (PHILLIPS, 1980), pois a taxa máxima de fixação em plantas noduladas normalmente se inicia com o florescimento (FUJIHARA *et al.*, 1977; STREETER, 1979; THOMAS *et al.*, 1980; MARCUS-WYNER & RAINS, 1983).

A formação de nódulos eficientes na fixação de N é um processo sujeito a influências tanto endógenas como externas do meio radicular. O fator genético governa a compatibilidade entre a linhagem de *Rhizobium* e o hospedeiro, enquanto pH, nutrição mineral, temperatura, taxa de fotossíntese para suprimento de fonte de carbono, concentração de oxigênio e água no solo, presença de íons nitrogênio, fungicidas, herbicidas e outros compostos que inibem nodulação, limitam o processo de infecção.

3.2.1. FATORES GENÉTICOS

A especificidade entre bactéria e planta tem sido caracterizada pela ligação entre uma proteína, presente no pêlo radicular do hospedeiro, com um carboidrato compatível na célula do *Rhizobium*. Assim, DAZZO & BRILL (1978) verificaram a diminuição dos níveis da trifoliina, uma proteína presente nas raízes de trevo, paralela ao declínio da ligação do *R. trifolii* aos pêlos radiculares, com o aumento do suprimento de NO_3^- ou NH_4^+ .

THOMAS *et al.* (1983), comparando simbiose mais efetiva em relação a simbiose comum, em plantas de soja, verificaram que, com três semanas, as plantas de simbiose mais efetiva eram maiores, tinham maior taxa de redução de acetileno, fotossíntese, transporte de ureídeos pelo xilema, atividade alantoinase na folha e concentração de ureídeos no tecido radicular. Após cinco semanas de crescimento, no entanto, não ocorriam diferenças nas taxas dos processos fisiológicos e parâmetros de crescimento examinados. Linhagens com maior capacidade de fixar N_2 , portanto, tiveram maior rendimento somente no início do crescimento, não apresentando maiores produções mesmo na ausência de competição com outras linhagens.

3.2.2. pH

Para o desenvolvimento de leguminosas, a faixa ótima de pH varia de 6,0 a 6,5; entretanto, para a simbiose,

a faixa ótima pode ser inferior (SICHMANN, 1977).

PEIXOTO *et al.* (1986) verificaram que pH 4,5 prejudicou a infecção do *Rhizobium*, mas não o desenvolvimento dos nódulos em feijoeiro inoculado com *Rhizobium phaseoli*.

Por outro lado, SÁ *et al.* (1986) relataram que o pH não pareceu interferir acentuadamente na nodulação de estilósantes com estirpes de *Rhizobium* de diferentes níveis de efetividade na fixação de nitrogênio, porém o pH mais elevado favoreceu a nodulação das estirpes tolerantes à estreptomicina.

3.2.3. TEMPERATURA

Solos quentes e secos diminuem a sobrevivência de bactérias e a formação de nódulos.

DUKE *et al.* (1979) relataram que planta de soja com raiz mantida a 13°C não nodulou, mas de 15 a 20°C nodulou, registrando maior respiração e atividade de redução de C_2H_2 . Mudanças de temperatura da raiz nodulada de 20 para 13°C não influenciou as enzimas do metabolismo de nitrogênio das raízes, GS e GOGAT, assim como a enzima respiratória malato desidrogenase (MDH), mas diminuiu a respiração e a taxa de redução de C_2H_2 . Por outro lado, essa mudança afetou severamente, nas folhas, as enzimas da fotossíntese, ribulose-1,5-bifosfatocarboxilase (RuBPC), fosfoenol-piruvato carboxilase (PEPC) e ácido glicólico oxidase (GAO) e as do metabolismo do nitrogênio, GS, GDH e glutamato oxaloacetato

transaminase (GOT). Baixa temperatura, portanto, reduziu a proteína das folhas, enquanto nos nódulos a atividade das enzimas de assimilação foi suficiente para assimilação do NH_4^+ produzido pela fixação de N_2 .

SCHWEITZER & HARPER (1980) relataram que, em experimento de curta duração com soja (10 a 24 horas), na presença ou na ausência de luz a 27°C constante, não ocorreu mudança da atividade nodular, que aparentemente deve ter sido suportada pelos fotossintatos de reserva. Experimentos de longa duração (10 dias) de ausência de luz a 27°C indicaram a diminuição da atividade nodular a partir do terceiro dia, finalizando a atividade no sétimo dia. Com a alternância da temperatura de 18 para 27°C , houve diminuição a partir do quinto dia, findando no oitavo. Foi indicada a menor respiração com a alternância da temperatura de 18 para 27°C . Assim, ocorreu diminuição da atividade dos nódulos por diminuição da temperatura (18°C) e longa ausência de iluminação.

MARCUS-WYNER & RAINS (1982) encontraram a diminuição da taxa de redução de acetileno com queda de temperatura de 32 para 22°C .

RAINBIRD *et al.* (1983a) relataram também que mudanças na temperatura foram, de preferência às de iluminação, as responsáveis pela variação nas atividades relativas de redução de N_2 , diminuindo a fixação em temperatura abaixo de 20°C .

3.2.4. NITROGÊNIO MINERAL

3.2.4.1. Absorção e Assimilação

Os íons NO_3^- e NH_4^+ têm sido reportados afetando nodulação e fixação de N_2 (BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1978; THOMAS *et al.*, 1979; COTTINGHAM & JONES, 1980; WONG & STENBERG, 1980; NOEL *et al.*, 1982; ZENGBÉ *et al.*, 1984).

Embora o mecanismo de absorção de NH_4^+ pareça ser por difusão, em alto nível determina toxicidade, havendo depleção de carboidratos, energia e redutantes (HAYNES & GOH, 1978). A absorção, movimento de íons através do plasmalema das células epidérmicas e corticais das raízes, é similar ao de cátions monovalentes, particularmente K^+ . A assimilação pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) só ocorre em situação de excesso de NH_4^+ (MIFLIN & LEA, 1977; HAYNES & GOH, 1978).

MARCUS-WYNER & RAINS (1982), medindo a absorção de NH_4^+ por planta de soja nodulada, simultaneamente com a redução de acetileno, verificaram baixa sensibilidade de 15 a 30°C, sugerindo não depender diretamente da atividade metabólica e ser mediada pela difusão. A absorção de NH_4^+ foi favorecida no pré e no florescimento com o aumento do pH do meio (4,0 a 6,8), provavelmente porque a absorção de NH_4^+ seja acompanhada por um transporte em sentido oposto de íons de hidrogênio, sendo facilitada em ambiente de baixa acidez. Esses mesmos autores (MARCUS-WYNER & RAINS, 1983) verificaram que planta de soja nodulada dependente de fixa-

ção de N_2 exibiu generalizada deficiência de N e foi menos vigorosa, tendo menor porcentagem de N no tecido que planta não nodulada dependente de N inorgânico, Sugeriram que a menor absorção de NH_4^+ por planta nodulada em relação a não-nodulada pode não ser devida a mecanismos de absorção, mas função do decréscimo na massa das raízes de plantas noduladas, devido à condição de deficiência de N, a qual pode ocasionar menor nível de carboidrato.

Por outro lado, RUSCHEL *et al.* (1979), aplicando doses de 0,25 e 50kg/ha de N como $(NH_4)_2SO_4$, verificaram que uma linhagem de soja com capacidade de nodulação, absorveu mais N do que a não-nodulante, tendo ocorrido a máxima absorção e conteúdo de N nas vagens derivadas do N_2 fixado a 25kg/ha de N, quando a fixação de N_2 ainda permaneceu alta nas nodulantes. Apenas 25% do N aplicado foi absorvido pelas plantas. Foi sugerida, portanto, apesar de o N-fertilizante ter inibido o processo de fixação simbiótica, pois a 50kg/ha de N ocorreu a redução do N_2 , a ocorrência de um efeito sinérgico do N_2 fixado com o N do solo, ou que o N_2 fixado é mais facilmente assimilado pela planta.

O nitrato é atóxico e pode ser acumulado nos vacúolos das raízes. Sua absorção é um processo ativo e parece estar relacionada com a assimilação, na forma reduzida, pela enzima nitrato redutase, formando o nitrito, sendo ambos os processos de assimilação e absorção dependentes de energia. Requer, portanto, mais energia para a incorporação que o NH_4^+ , podendo suceder tanto nas raízes como nos meristemas ou folhas. A atividade seguinte de redução do nitrato pela ni-

trito redutase (Nir) previne a estocagem de altas concentrações de nitrito que pode ocasionar toxicidade à nitrogenase (HAYNES & GOH, 1978).

WYCH & RAINS (1979) verificaram que a taxa de absorção de NO_3^- em planta de soja não-nodulada foi duas vezes maior em relação à nodulada, no início do crescimento reprodutivo. A taxa de absorção de NO_3^- diminuiu depois progressiva e similarmente para ambas, podendo refletir maior suprimento de fotossintato translocado às raízes de plantas não-noduladas. Esse fato, além da falta inicial de N até formação do nódulo da planta, pode ter influído na menor altura das plantas dependentes de N simbiótico, as quais tiveram menor N no tecido vegetativo e produziram menos grãos por planta.

COTTINGHAM & JONES (1980) verificaram que a taxa de absorção de nitrato em *Vicia faba* foi aproximadamente constante durante o crescimento e proporcional ao suprimento de nitrato. Observaram maior retenção de NO_3^- nas raízes que em outros tecidos da planta, e uma redução da fixação de N_2 e peso nodular com aumento de nitrato. Além do mais, sementes de plantas com maior suprimento de nitrato continham ligeiramente mais N-total, sugerindo maior eficiência da assimilação do NO_3^- em relação à fixação de N_2 .

3.2.4.2. Influência nos compostos transportadores de nitrogênio

Segundo OHYAMA & KUMAZAWA (1979), nódulos de um

sistema radicular de soja pareceram assimilar nitrogênio como N_2 ou NO_3^- da mesma maneira, originando compostos semelhantes, porém raízes tratadas com NO_3^- apresentaram maior expressão na asparagina, sendo altos, γ -amino-butírico, ácido aspártico, glutamina, serina e ácido glutâmico. Nódulos com N_2 apresentaram, inicialmente, altos teores de ácido glutâmico, alanina, γ -amino-butírico e serina, e baixos de asparagina e glutamina. Assim, a amônia proveniente da redução de N_2 e NO_3^- pareceu ser assimilada por caminhos diferentes em nódulos e raízes.

THOMAS *et al.* (1979), verificaram que seiva de xilema de planta de feijão não-nodulada, crescendo em NH_4^+ ou NH_4NO_3 , em relação a planta crescendo em NO_3^- , continha maior concentração de N-orgânico, na maioria devido ao aumento de aminoácidos, embora o ácido alantóico também tenha aumentado duas a três vezes. Seiva de plantas com NH_4^+ foi composta na quase totalidade de N-orgânico, sendo o nível de NH_4^+ , embora, neste caso, o mais elevado, somente 1-2% do N-total. Por outro lado, quando plantas previamente desenvolvidas em nitrato foram suplementadas com NH_4^+ ou NH_4NO_3 por 40 horas, as concentrações na seiva de N- α - NH_2 e N-amida aumentaram 100%, enquanto a concentração de ácido alantóico só aumentou após prolongada alimentação com NH_4^+ .

3.2.4.3. Efeito inibitório

WONG & STENBERG (1980) verificaram que, expondo metade do sistema radicular de soja nodulada, a 15mM de NO_3^- ,

esse lado apresentava poucos nódulos, baixa atividade de redução de acetileno e alta de nitrato redutase, acumulando nitrato. A metade não exposta apresentava muitos nódulos, alta atividade de redução de acetileno e nenhuma de nitrato redutase, não acumulando nitrato. A atividade de nitrato redutase das folhas foi similar para todas as plantas, indiferente ao lado exposto a NO_3^- . Nitrato redutase de folha, portanto, não influenciou no efeito inibitório de NO_3^- sobre a simbiose de leguminosas, que ocorreu apenas quando as raízes, tendo alta atividade de nitrato redutase, foram expostas diretamente a NO_3^- .

ZENGBÉ *et al.* (1984) encontraram que seiva de xilema de plantas de soja associadas com *Rhizobium* efetivo ou inefetivo, com igual nodulação, em ausência de N exógeno, continha 10 a 20 vezes mais N-ureídeo em sistema simbiótico efetivo. O suprimento de NO_3^- ou NH_4^+ diminuiu a fixação e a concentração de ureídeos e aumentou N-aminoácido na seiva dos dois grupos de plantas. Na presença de NH_4^+ a fração ureídeo translocada por hora e por planta aumentou na planta nodulada pela estirpe inefetiva e variou pouco na com estirpe efetiva.

3.2.4.4. Hipótese acerca do efeito inibitório

A ação do efeito inibitório do nitrogênio mineral é ainda bastante discutida.

O fato de a nitrogenase ser extremamente oxigênio lábil e o suprimento de O_2 para a respiração aeróbica

dos bacteróides controlado por um córtex relativamente impermeável no nódulo, que permite o O_2 difundir e ser transportado para os bacteróides como uma solução tamponada de hemoglobina, originou a hipótese da inibição do nitrito formado pela redução do nitrato. O nitrito oxida a hemoglobina "in vitro", podendo impedir a ligação com o O_2 e interferir com os processos de fixação de N_2 . No entanto, esta viabilidade é discutida, pois vários trabalhos com mutantes de *Rhizobium* defectivos em nitrato redutase (NR) demonstraram continuar ocorrendo a diminuição da fixação do N_2 (GIBSON & PAGAN, 1977; MANHART & WONG, 1980), não sendo detectado nitrito nos nódulos (STREETER, 1982), embora tenha sido encontrada redução substancial do nitrato, apesar da baixa atividade da NR (WARNER & KLEINHOF, 1981).

STREETER (1985a) verificou que a concentração de nitrito, em nódulos de plantas de feijão inoculadas com oito estirpes de *Rhizobium*, não foi relacionada ao peso nodular por planta, ou à atividade de redução de acetileno. Mesmo quando a concentração de nitrito nos nódulos foi abaixo da requerida para inibição da nitrogenase por experimentos "in vitro", a atividade de redução de acetileno foi inibida 83% pelo nitrato.

Outro fator para explicar a inibição da fixação de N_2 em N-mineral é a menor eficiência de assimilação de nitrogênio na forma de N_2 fixado em relação à de NO_3^- reduzido.

Como já vimos, ATKINS *et al.* (1980) sugeriram que raiz nodulada de caupi, em relação à não-nodulada, deva

ter maior proporção de componentes não assimilatórios da respiração, perdendo mais C como CO_2 na respiração. Ainda, além do requerimento energético para o funcionamento nodular, raízes noduladas pareceram gastar mais energia. Esses autores analisaram in vitro órgãos de caupi não-nodulados de 40 dias, submetidos a níveis de NO_3^- nas raízes, encontrando a parte aérea como o sítio principal de assimilação de NO_3^- . Parte do NO_3^- assimilado, portanto, foi reduzido fotossinteticamente na parte aérea, no sistema superior, não no inferior, nas raízes, concordando com o menor gasto metabólico por planta não-nodulada em relação à nodulada dependente de N_2 de fixação.

BETHLENFALVAY & PHILLIPS (1978) não encontraram diferença de eficiência fotossintética devida à forma de nitrogênio aplicado a plantas de ervilha, porém, em alta taxa fotossintética, verificaram a neutralização parcial de inibição de fixação de N_2 em planta suprida com N-mineral (NH_4^+ ou NO_3^-). Ainda, a maior taxa de nitrogênio/peso seco de plantas fixando N_2 , em relação às supridas com N-mineral indicou crescimento superior das últimas, com NO_3^- ou NH_4^+ . Portanto, o aumento da taxa fotossintética foi utilizado para maior fixação e assimilação do N_2 pelas plantas noduladas.

Segundo FINKE *et al.* (1982), plantas de soja fixando N_2 perderam 25% da fotossíntese líquida diária, pela perda de carbono através do sistema de respiração das raízes, enquanto plantas não-noduladas em presença de NO_3^- perderam 16%, o que levou as primeiras a respirar uma taxa maior de carbono por mol de N incorporado.

Outra hipótese direcionada ao maior requerimento de energia por planta nodulada dependente de N_2 de fixação, é que a energia consumida pelos processos assimilatórios de N-mineral pode levar a uma diminuição da disponibilidade de fotossintatos para o processo de fixação de N_2 .

De acordo com esta hipótese, WONG (1980) encontrou que a inibição da fixação de N_2 em lentilha pelo NO_3^- (15mM) foi eliminada com a adição de carboidrato 75M (frutose, glucose ou sacarose).

NOEL *et al.* (1982) também não verificaram redução da atividade de nitrogenase em nódulos destacados de soja quando tratados com NO_3^- junto com uma fonte de carboidrato, ratificando a hipótese da diminuição da disponibilidade de fotossintato nos nódulos quando leguminosas são expostas a N exógeno.

3.2.5. OUTROS FATORES

Nutriente no solo é outro fator importante no processo de nodulação e atividade do nódulo. Segundo SICHMANN (1977), calagem e adubação fosfatada juntas têm efeito benéfico sobre nodulação.

ATHAÍDE *et al.* (1984) verificaram que Zn e Mo favoreceram a formação de maior número de nódulos, em plantas de feijão inoculadas e suplementadas com fósforo e potássio, ocasionando o aumento de 30% na inoculação, maior peso seco de nódulos e parte aérea, e produção superior de grãos, em relação a plantas sem os micronutrientes.

GATES & MULLER (1979) relataram o crescimento de nódulos em plantas de soja entre florescimento e enchimento de vagem, com alta resposta a P ou S, mas sem interação, que ocorreu apenas na maturidade, sendo a interação P x S a mais importante. A N x S ocorreu porque N prejudicou a nodulação mas foi neutralizado por altos níveis de S. Houve pouca tendência para N x P interagirem.

O efeito de sombreamento afetando nodulação e nitrogenase foi estudado por TRANG & GIDDENS (1980). Relataram que sombreamento diminuiu matéria seca, conteúdo de N, carboidrato estrutural e número de peso nodular. Todavia, a atividade total de redução de acetileno resultou maior nas plantas com 18% de sombreamento, devido a tendência de compensação da redução em tamanho e número de nódulos, pela maior eficiência quanto menor o nódulo por unidade de peso. Pela aplicação de N-fertilizante e variação de temperatura de 15 a 30°C, verificaram que a nodulação foi negativamente correlacionada com N aplicado, mas não com tratamento de temperatura.

ATKINS *et al.* (1984a) relataram que plântulas de caupi inoculadas, com sistema de raiz mantido em Ar:O₂ (80:20, v/v), durante desenvolvimento inicial do nódulo, comparadas àquelas com sistema radicular em ar, mostraram deficiência de N com inibição do crescimento e redução nas folhas da enzima fotossintética ribulose-1,5-difosfato carboxilase, proteína total e clorofila, efeitos esses também encontrados por DUKE *et al.* (1979) para baixas temperaturas. O fornecimento de pequenas quantidades de NO₃⁻ (0,1 a 0,2mM),

neutralizou a deficiência de N sobre o crescimento nodular, mas não o subsequente efeito degenerativo do tratamento Ar:O₂ sobre estrutura e senescência nodular.

O herbicida Trifluralin, segundo MACEDO *et al.* (1986), aplicado em soja na dose de 2,4 l/ha em pré-plantio, prejudicou a nodulação quanto ao número de nódulos, mas aumentou o peso específico dos mesmos, não afetando o rendimento em grãos.

O fungicida Captan foi relatado compatível com inoculante na forma granulada em semente de *Medicago sativa* por PIANTANIDA *et al.* (1986), resultando na produção de peso seco de forragem superior à obtida com aplicação do fungicida em semente inoculada da forma convencional, com inoculante na forma de fluido.

4. OBJETIVOS

Absorção, assimilação e transporte de N têm sido amplamente estudado em plantas (PATE, 1973; HEWITT, 1975; MIFLIN & LEA, 1976; LEA & MIFLIN, 1980). O fluxo de translocação pelos vasos do xilema é reconhecido como o principal meio de transporte do nitrogênio da raiz para parte aérea (BOLLARD, 1960). Por exame da seiva podemos obter informações qualitativas e quantitativas acerca da atividade de assimilação da raiz pelo tipo de composto nitrogenado enviado a parte aérea.

Plantas não-noduladas e cultivadas na presença

de NO_3^- continham baixos níveis de ureídeos, e o aminoácido asparagina foi a principal forma de nitrogênio presente nas vias de transporte, existindo uma correlação entre o nível de ureídeo relativo a outras formas de nitrogênio encontradas na seiva do xilema e a taxa de fixação de nitrogênio (McCLURE & ISRAEL, 1979; McCLURE *et al.*, 1980; PATE *et al.*, 1980). Esta proporção de ureídeos foi relatada ter potencial como parâmetro para avaliar a fixação de nitrogênio em plantas no campo (HERRIDGE, 1982).

No caso do suprimento de NH_4^+ , não havia na época em que foi iniciado este estudo, informações exatas quanto às formas de nitrogênio translocadas em plantas inoculadas. FUJIHARA *et al.* (1977) verificaram que o NH_4^+ adicionado a plantas noduladas resultou num aumento dos níveis de certos aminoácidos e ureídeos encontrados em folhas.

THOMAS *et al.* (1979) observaram altos níveis de ureídeos na seiva do xilema de plantas não-noduladas de *Phaseolus* cultivadas com NH_4^+ . Por outro lado, plantas de soja noduladas e incubadas com $^{15}\text{NH}_3$ incorporaram pouco ^{15}N em ureídeos (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978), e foi evidenciado que o NH_4^+ foi assimilado por caminhos diferentes em nódulos e raízes (OHYAMA & KUMAZAWA, 1979).

A inibição da fixação de N_2 pelo N do solo é um fator limitante para o processo biológico de fixação de N_2 por leguminosas em simbiose com bactérias. Melhor compreensão desse fenômeno é importante para fornecer subsídios para pesquisa visando às causas da inibição. Esta ocasiona, além da necessidade do suprimento de N-mineral ao solo, o gasto

de N-residual que poderia ser utilizado por cultura subsequente.

O objetivo do trabalho foi investigar a influência de fontes nitrogenadas (NO_3^- e NH_4^+) sobre a composição da seiva do xilema em soja nodulada e não nodulada, visando a melhor compreensão do funcionamento dessas fontes externas de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

As plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill "Santa Rosa") foram cultivadas em casa de vegetação em condições naturais de luz e temperatura entre os meses de setembro e maio. Como a cultivar estudada é uma planta de dia curto, floresce mais rapidamente quando recebe iluminação por um período inferior a certo número de horas por dia, foi realizada a indução ou inibição da floração. No estágio da primeira folha trifoliolada, durante quatro dias, as plantas que cresceram nos fotoperíodos mais longos (verão), foram expostas a nove horas de luz diária para a indução da floração. As plantas que cresceram na época de fotoperíodo mais curto (inverno) foram expostas, até atingirem o estágio da primeira folha trifoliolada, a luz suplementar incandescente até a meia-noite ,

para atrasar a floração. As sementes foram esterilizadas em solução de HgCl 0,1% por três minutos, lavadas com água destilada e germinadas nos próprios vasos, de 3 litros, utilizados para plantio com vermiculita previamente lavada para evitar problemas de toxicidade.

Foi feita a raleação para duas plantas por vaso, pouco antes da inoculação, cerca de duas semanas pós-plantio. A inoculação foi realizada colocando-se 2ml por vaso, de uma suspensão de cultura de bactérias da estirpe SMS 65 da espécie *Rhizobium japonicum*, fornecida pela Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas.

Com a expansão das folhas cotiledonares, além do fornecimento de água, sempre que necessário, iniciou-se o suprimento de 250 ml de solução nutritiva duas vezes por semana. De acordo com o tratamento, foram utilizadas as seguintes soluções: sem nitrogênio (-N), e com nitrato (NO_3^-) e com amônia (NH_4^+), as quais diferiram entre si apenas na composição em macronutrientes, a saber:

Macronutrientes (concentração final)

Soluções nutritivas

<u>"-N"</u>		<u>"NO₃⁻"</u>		<u>"NH₄⁺"</u>	
KH_2PO_4	1mM	KH_2PO_4	1mM	KH_2PO_4	1mM
K_2SO_4	2mM	KNO_3	5mM	K_2SO_4	2mM
$\text{Mg} \cdot \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5mM	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5mM
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2mM
				$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10mM

Fe-EDTA (1ml/l)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,64 : (27% EDTA 1M : 73% KOH 1N)

Micronutrientes (1ml/l)

H_3BO_3	2,86mg/l
$\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08mg/l
$\text{H}_2\text{MO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02mg/l

De acordo com o experimento, ou as plantas foram cultivadas apenas com a solução deficiente em N (para permitir a nodulação), e na época da floração (nodulação plena) submetidas aos tratamentos com as soluções contendo NO_3^- ou NH_4^+ (normalmente durante sete dias), ou foram tratadas com uma dessas três soluções desde o início. Estes detalhes são apresentados em Resultados. A figura 4 ilustra o aspecto geral das plantas antes da floração.

2. COLETA DE MATERIAL

2.1. COLETA DE SEIVA DE XILEMA

A seiva do xilema foi coletada de acordo com McClure *et al.* (1980), das 12 às 15 horas. Meia hora antes do corte do caule, molhou-se a planta com 500 ml da solução nu-



Figura 4. Aspecto geral das plantas antes da floração.

tritativa cuja composição variou de acordo com o tratamento. O caule foi cortado com uma lâmina imediatamente acima do nó cotiledonar. O exsudato foi coletado por capilaridade, encostando-se a pipeta capilar sobre o vaso do xilema cortado, ligeiramente inclinada, de maneira a facilitar a captação da seiva (Figura 5). A cada 0,01 ml de seiva coletada pela pipeta, expeliu-se aquela em frasco conservado no gelo. Procedeu-se à coleta durante meia hora, sendo os frascos armazenados a -18°C .

2.2. COLETA DE SEIVA DE FLOEMA

A seiva do floema (do fruto) foi coletado segundo FELLOWS *et al.* (1978). Cortou-se a extremidade final da vagem dentro de uma solução de EDTA 20 mM, pH 7,0 para evitar fechamento dos vasos, e introduziu-se o final cortado da vagem em um frasco com 2 ml de solução de EDTA similar para o recolhimento da seiva, por três horas, não se destacando a vagem da planta. A solução foi guardada a -18°C .

3. PREPARO DOS EXTRATOS DE FOLHA, HASTE E VAGEM

A extração do material para as análises de micromoléculas efetuou-se de acordo com a metodologia de RENA & MASCIOTTI (1976). Logo após destacado, o material vegetal foi picado e colocado em frasco com 100 ml de solução de metanol-clorofórmio-água, 12:5:1 (v/v/v) e guardado a -18°C . O material foi homogeneizado através de aparelho tipo Virtis

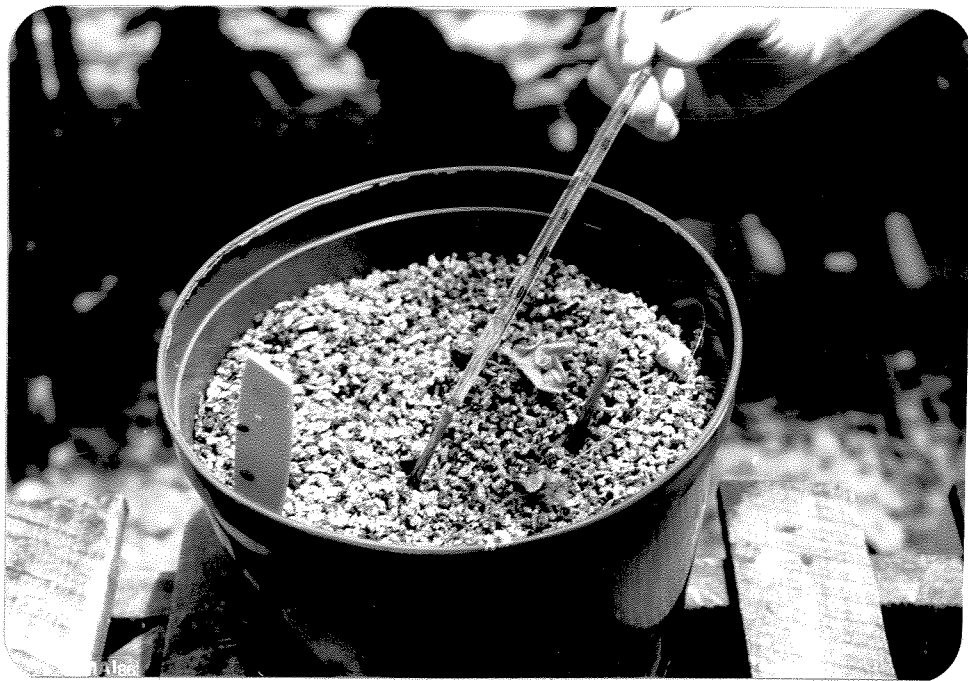


Figura 5. Aspecto da coleta de seiva de xilema, de acordo com McCLURE *et al.* (1980).

e o extrato, separado do resíduo por centrifugação a 4.500 rpm por 10 minutos, foi agitado com 2,3 ml de clorofórmio e 3,3 ml de H₂O destilada para cada 6 ml de extrato, em funil de separação. A porção aquosa (H₂O-metanol), contendo os ureídeos, aminoácidos livres e outras micromoléculas, foi separada da porção solvente (clorofórmio) contendo clorofila e lipídeos, coletada e diluída em balão volumétrico de 50 ml.

4. ANÁLISE

4.1. AMINOÁCIDOS

a) Aminoácidos livres totais

Foram dosados de acordo com YEMM & COCKING (1955), por reação colorimétrica com ninidrina, baseada na produção estequiométrica quantitativa da dioxohidrindilidena-dioxohidrindamina (DYDA), pigmento púrpura. Pela reação da ninidrina com todos os aminoácidos e peptídeos que apresentam um α -amino grupo livre, ocorre produção de pigmento púrpura. Na prolina e hidroxiprolina, em que o α -aminogruppo é substituído, o derivado produzido tem cor amarela (Figura 6).

Para análise de seiva de xilema, diluiu-se inicialmente cerca de cem vezes o extrato para se obter cerca de 0,1 micromol de aminoácidos por mililitro, enquanto para seiva de floema tomou-se a alíquota de 0,5 ml da solução de 2 ml do extrato com EDTA. Para análise de haste, folha e vagem, usaram-se alíquotas de 1 ml da porção aquosa contendo

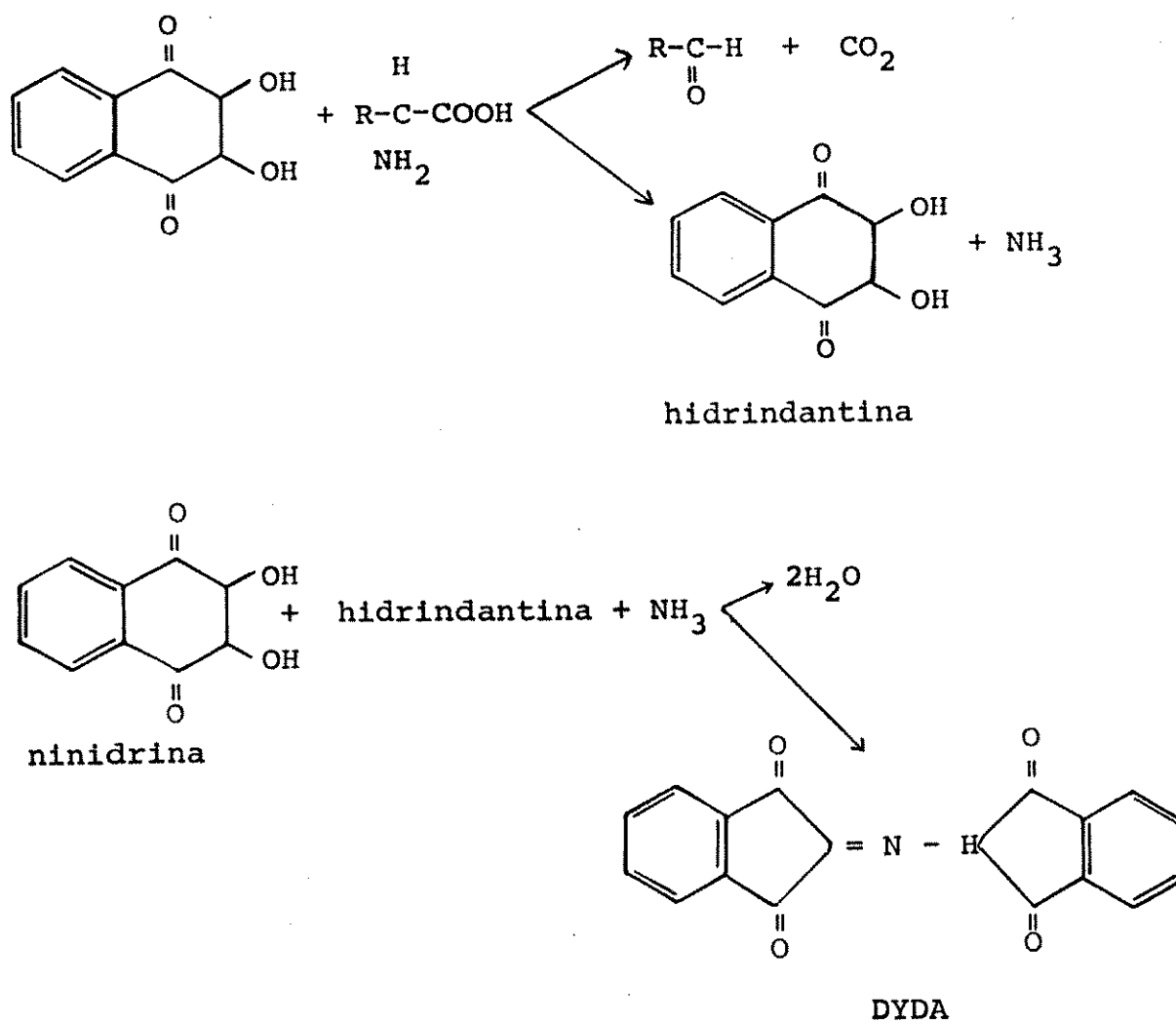


Figura 6. Reações envolvidas na determinação de aminoácidos (LEHNINGER, 1976).

os aminoácidos livres.

De acordo com a marcha analítica, em um tubo de ensaio com tampa rosqueável, foi colocado 1 ml de solução de amostra, adicionado de 0,5ml de tampão citrato pH 5,0 (0,2M), 0,2 ml de ninidrina 5% em metilcelussolve e 1,0 ml de cianeto de potássio (2% v/v KCN 0,01M em metilcelussolve). O tubo foi rosqueado e aquecido a 100°C por 20 minutos. Após resfriamento, seu volume foi completado para 4,0 ml com etanol 60%, e a leitura feita a 570 nm dentro de uma hora. O "branco" foi preparado pela mesma marcha analítica, contendo H₂O em vez de amostra. Igual procedimento foi realizado para alíquotas de solução padrão de leucina com concentrações variando de 0,025 a 0,626 micromol.ml⁻¹, obtendo-se a reta $Y = 0,297X - 0,002$, onde Y é a concentração de aminoácidos e X, a leitura de absorbância, sendo o coeficiente da correlação, r igual a 0,985.

b) Composição de aminoácidos

A composição de aminoácidos, em algumas amostras específicas, foi determinada pelo analisador de aminoácidos Hitachi-Perkin-Elmer modelo KLA-3b, utilizando o princípio descrito por SPACKMAN *et al.* (1958), porém com resina e tampões para troca de ligantes (PERKIN-ELMER, 1969, 1971), utilizando zinco como metal complexante de aminoácidos. Aplicou-se cerca de 0,15 ml de seiva bruta de xilema diluído no dobro do volume com tampão pH 3,1. A identificação e quantificação dos aminoácidos separados por esta técnica foi rea-

lizada através de comparação com padrões.

4.2. UREÍDEOS

Ureídeos foram dosados de acordo com TRIJBELS & VOGELS (1966), por método colorimétrico que estima a reação do derivado de hidrazina com o ferricianeto de potássio, K_3FeCN_6 . O derivado de hidrazina é formado pela hidrólise ácida do ureídeo ácido em uréia mais ácido glioxílico. O outro ureídeo, alantoína, é transformado em ácido alantóico por hidrólise básica. A sequência de reações seguida neste método é apresentada na figura 7.

De acordo com a marcha analítica, em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml de solução de amostra contendo de 0,02 a 0,38 micromol alantoína. A seguir, adicionou-se 0,2 ml de NaOH 0,5N e aqueceu-se por 8,5 minutos em banho-maria a $100^{\circ}C$ (hidrólise básica). Após esfriamento, adicionou-se 0,2 ml de HCl 0,65N, agitou-se e acrescentou-se 0,2 ml de fenilhidrazina, $C_6H_5NH.NH_2$ 0,33%. Aqueceu-se em banho-maria ($100^{\circ}C$) por dois minutos (hidrólise ácida), esfriando-se imediatamente em banho de gelo e fez-se a reação de coloração com adição de 0,8 ml de HCl concentrado e 0,2 ml de solução $K_3Fe(CN)_6$ 0,65%. Completou-se o volume do tubo para 3 ml e procedeu-se à leitura da absorbância a 525 nm após 10 minutos, em relação ao branco de mesma marcha analítica, com H_2O no lugar de amostra. O mesmo procedimento foi realizado para alíquotas de solução padrão de alantoína com concentrações de $0,002 \text{ micromol.ml}^{-1}$ a $0,140 \text{ micromol.ml}^{-1}$, obtendo-se a reta $Y = 0,153X - 0,0002$, onde Y é a concentração de alan-

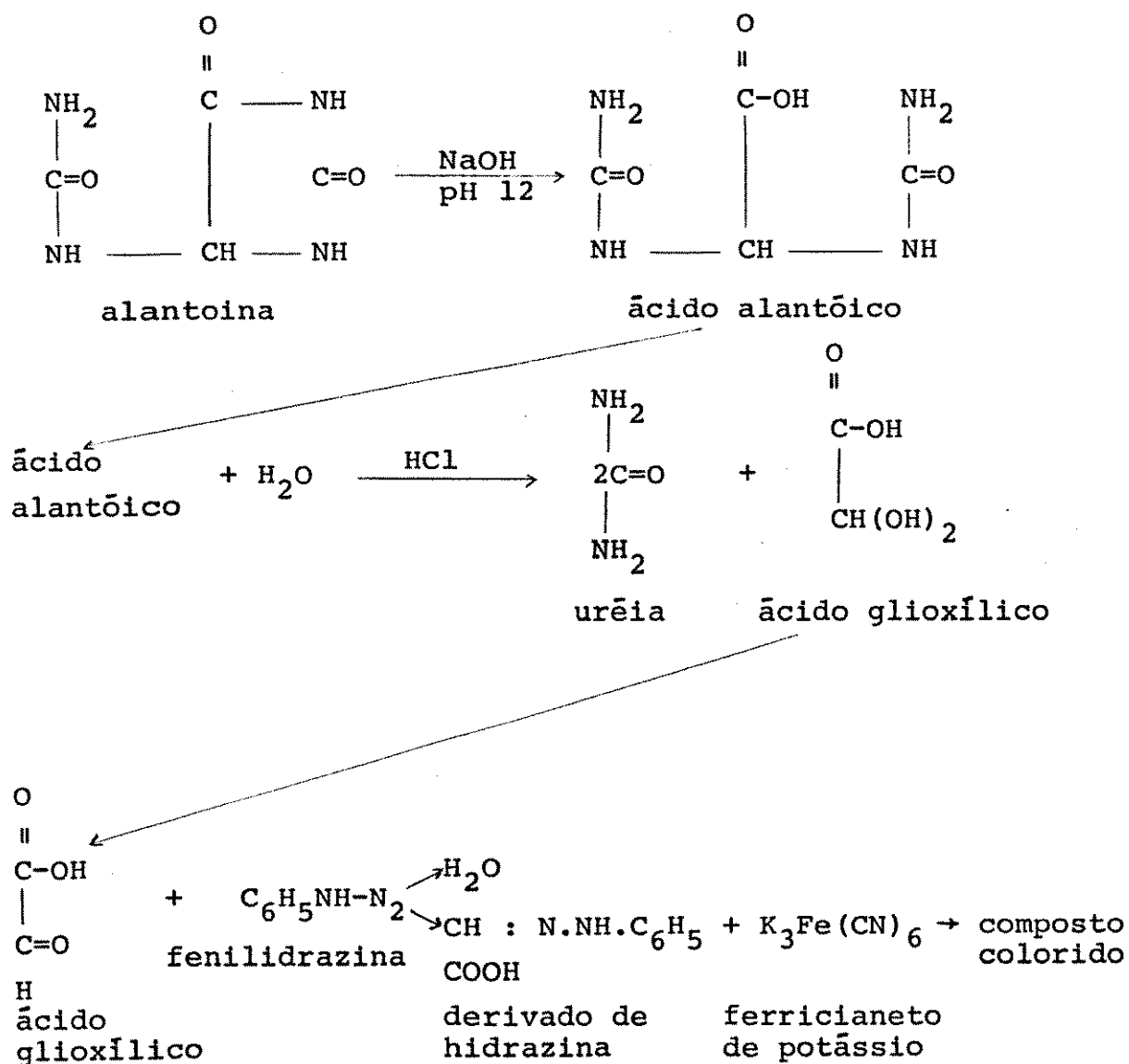


Figura 7. Reações envolvidas na determinação de ureídeos (YOUNG & CONWAY, 1942).

toína em $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ e X, a leitura de absorbância, sendo r igual a 0,99.

Para as análises, tomou-se a alíquota de 1 ml para a seiva do xilema diluída cem vezes e 1 ml para a porção aquosa de haste, vagem e folha, enquanto para o floema foi usado 0,5 ml da solução de 2 ml de extrato com EDTA.

4.3. ÁCIDO ALANTÓICO

Para análise do teor de ácido alantóico na seiva do xilema, utilizou-se a mesma marcha analítica descrita para ureídeos, porém sem o tratamento inicial de extrato com NaOH 0,5N, de transformação da alantoína em ácido alantóico, sendo avaliado somente o teor de ácido alantóico nas amostras.

4.4. ALANTOÍNA

O teor de alantoína foi avaliado por diferença entre os teores de ureídeos totais e ácido alantóico.

4.5. NH_4^+ E NO_3^-

As determinações de NH_4^+ e NO_3^- foram realizadas na seiva do xilema, de acordo com, respectivamente, McCULLOUGH (1967) e CATALDO *et al.* (1975).

4.5.1. ANÁLISE DE NH_4^+

Amônia foi analisada pela formação do composto colorido azul-de-indofenol. Em um tubo de ensaio, a cada 0,02 ml de seiva diluída com 0,08 ml de H_2O destilada, adicionou-se para deproteinação, 0,05 ml H_2SO_4 1M e 0,05 ml de tungstato de sódio 10%. Para ocorrer a reação colorimétrica, 1 ml do reagente I e 1 ml do reagente II foram adicionados com agitação, à temperatura de 37°C por 35 minutos.

A leitura de absorbância foi feita a 625 nm em relação ao "branco" de mesma marcha analítica, com H_2O no lugar de amostra. O reagente I consistiu na solução aquosa de 10 g de fenol mais 50 mg de nitroprussiato de sódio por litro, e o reagente II, na solução aquosa de 5 g NaOH mais 53,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ mais 10 ml de NaOCl (10-14%Cl) por litro. Para a curva-padrão, foi utilizada a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas concentrações de 0,006 a 0,117 μmol de NH_3 , que originou a reta $Y = 0,0917X + 0,0068$, onde Y é a concentração em $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ de NH_3 e X, a absorbância, sendo r igual a 0,992.

4.5.2. ANÁLISE DE NO_3^-

O NO_3^- foi analisado pela formação do cromóforo proveniente da nitração do ácido salicílico sob condições altamente ácidas. Em um tubo de ensaio, a cada 0,02 ml de seiva, foi adicionado com agitação 0,2 ml de ácido salicílico-ácido sulfúrico 5% (peso/volume), seguido por repouso durante 20 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se a

seguir 3 ml de NaOH 2N, sendo feita a leitura a 410 nm em relação ao "branco". Para a curva-padrão, utilizou-se a solução de KNO_3 nas concentrações de 0,0032 a 0,806 μmol de NO_3^- , que originou a reta $Y = -0,03022 + 0,0825X$, onde Y é a concentração de $\mu\text{mol.ml}^{-1}$ de NO_3^- e X, a absorbância, sendo r igual a 0,996.

4.6. NITROGENASE

A atividade da enzima fixadora do nitrogênio atmosférico foi dosada pela técnica de redução de acetileno, de acordo com HARDY *et al.* (1968). O sistema radicular das plantas foi destacado, agitado até livre de vermiculita e colocado dentro de um frasco de soro de 700 ml, com tampo de borracha. Foram introduzidos no frasco 40 ml de acetileno e retiradas amostras de 0,5 ml a cada 15 minutos (até duas horas), por meio de seringa, e analisadas por cromatografia gasosa para determinar a quantidade de etileno formada. O cromatógrafo a gás utilizado nas análises foi da marca Varian modelo 2440D, equipado com detector de ionização de chama e coluna de Porapak T, 100-200 mesh, de 0,2 x 100 cm. As condições de temperaturas do injetor, detetor e coluna foram de 130, 180 e 110°C e vazões de 40 ml/min, 1.600 ml/min e 30 ml/min, para o H_2 , ar e N_2 respectivamente.

Para o cálculo da concentração do acetileno reduzido no tempo de uma hora, dividiu-se a altura do pico de etileno obtido após incubação do acetileno com as raízes por uma hora, pela altura do pico de 500 ppm do padrão etileno

(C_2H_4), e multiplicou-se pelo número de micromols correspondente aos 500 ppm do etileno em 350 ml de volume gasoso, ou seja,

$$Y = \frac{\text{altura pico } C_2H_4}{\text{altura pico 500 ppm } C_2H_4} \times \text{nº micromol 500 ppm } C_2H_4 \times \frac{350}{700}$$

onde Y é igual ao número de micromoles de acetileno reduzido por duas plantas em uma hora.

4.7. NÓDULOS

Foi feita a contagem e pesagem dos nódulos destacados de plantas submetidas aos tratamentos N_2 , NO_3^- e NH_4^+ para análise de número e peso seco de nódulos. Estes foram secos a $105^\circ C$ durante 24 horas.

4.8. ESTATÍSTICA

Foram realizadas as análises de variância de acordo com GOMES (1977), pelo delineamento inteiramente casualizado. No terceiro experimento, foi feita a análise de grupos de experimentos, sendo considerados os dois tratamentos em seis épocas para o teor de NH_4^+ , uma vez que a relação entre o maior e o menor quadrado médio residual não foi maior que quatro vezes. O teste de Tukey foi aplicado ao nível de 5%.

RESULTADOS

1. PLANTAS CULTIVADAS COM N MINERAL

Foi realizado um cultivo de soja para verificar a ação de três fontes diferentes de N, ou seja, NO_3^- , NH_4^+ e N-atmosférico, na nodulação e atividade da nitrogenase. Tal estudo foi efetuado através das análises apresentadas no quadro 1, relativas ao número e peso seco de nódulos, taxa de redução de acetileno na época do florescimento, teor de ureídeos e aminoácidos de seiva do xilema. Os resultados de quatro repetições por tratamento são dados em mg de nódulo, micromol de $\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1}$, planta⁻¹, μmol alantoina. ml^{-1} e μmol de leucina. ml^{-1} .

A total ausência de nódulos em plantas cultivadas desde o início do desenvolvimento com NO_3^- (Quadro 1) demonstra claramente que esta forma de nitrogênio inibe-lhes a

formação. Na presença de NH_4^+ , também houve inibição da nodulação, embora as plantas tenham apresentado nodulação equivalente a um terço da observada na ausência de nitrogênio mineral. A taxa de redução de acetileno apresentada pelo sistema radicular variou de acordo com o grau de nodulação, ou seja, foi maior na ausência de N mineral e menor na presença do nitrato. Os valores encontrados para os teores de acetileno (Y) em relação ao tempo (X), forneceram as retas e os coeficientes de regressão para os tratamentos N_2 , NO_3^- e NH_4^+ seguintes:

Tratamento N_2 : $Y = 0,096X_1 - 0,082$ ($r_1^2 = 0,985$); $Y_2 = 0,152X_2 - 1,142$ ($r_2^2 = 0,968$); $Y_3 = 0,151X_3 - 1,014$ ($r_3^2 = 0,981$); $Y_4 = 0,139X_4 - 1,318$ ($r_4^2 = 0,979$);

Tratamento NO_3^- : $Y_1 = 0,079X_1 - 0,231$ ($r_1^2 = 0,966$); $Y_2 = 0,063X_2 - 0,571$ ($r_2^2 = 0,876$); $Y_3 = 0,056X_3 - 0,131$ ($r_3^2 = 0,992$); $Y_4 = 0,038X_4 + 0,133$ ($r_4^2 = 0,983$);

Tratamento NH_4^+ : $Y_1 = -0,0007X_1 + 0,113$ ($r_1^2 = 0,730$); $Y_2 = -0,0032X_2 + 0,140$ ($r_2^2 = 0,980$); $Y_3 = -0,0008X_3 + 0,150$ ($r_3^2 = 0,920$); $Y_4 = 0,0010X_4 + 0,088$ ($r_4^2 = 0,088$).

O teor de ureídeos na seiva do xilema foi significativamente maior, cerca de dez vezes, nas plantas dependentes da fixação de nitrogênio atmosférico como fonte de nitrogênio em relação as tratadas com nitrogênio mineral. Os teores verificados nos tratamentos com adição de nitrogênio não foram significativamente diferentes. O teor de aminoácidos do xilema de plantas cultivadas com NO_3^- foi semelhante ao de plantas utilizando nitrogênio atmosférico,

Quadro 1. Média do número e peso seco de nódulos, taxa de redução de acetileno e teor de ureídeos e aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja com 66 dias, inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65 e cultivadas com solução $-N$, NO_3^- e NH_4^+ durante desenvolvimento.

Fonte de N	Número nódulo	Peso seco nódulo	Acetileno reduzido	Teor ureídeo	Teor aminoácido
		mg	$\mu\text{mol.h}^{-1} \cdot \text{planta}^{-1}$	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$
NO_3^-	0	0	$0,17^c^{(1)}$	$1,23^b$	$6,94^b$
NH_4^+	55	120	$8,77^b$	$1,64^b$	$9,50^a$
N_2	155	333	$14,89^a$	$12,72^a$	$6,82^b$

⁽¹⁾ Letras iguais indicam diferenças não significativas (p < 0,05).

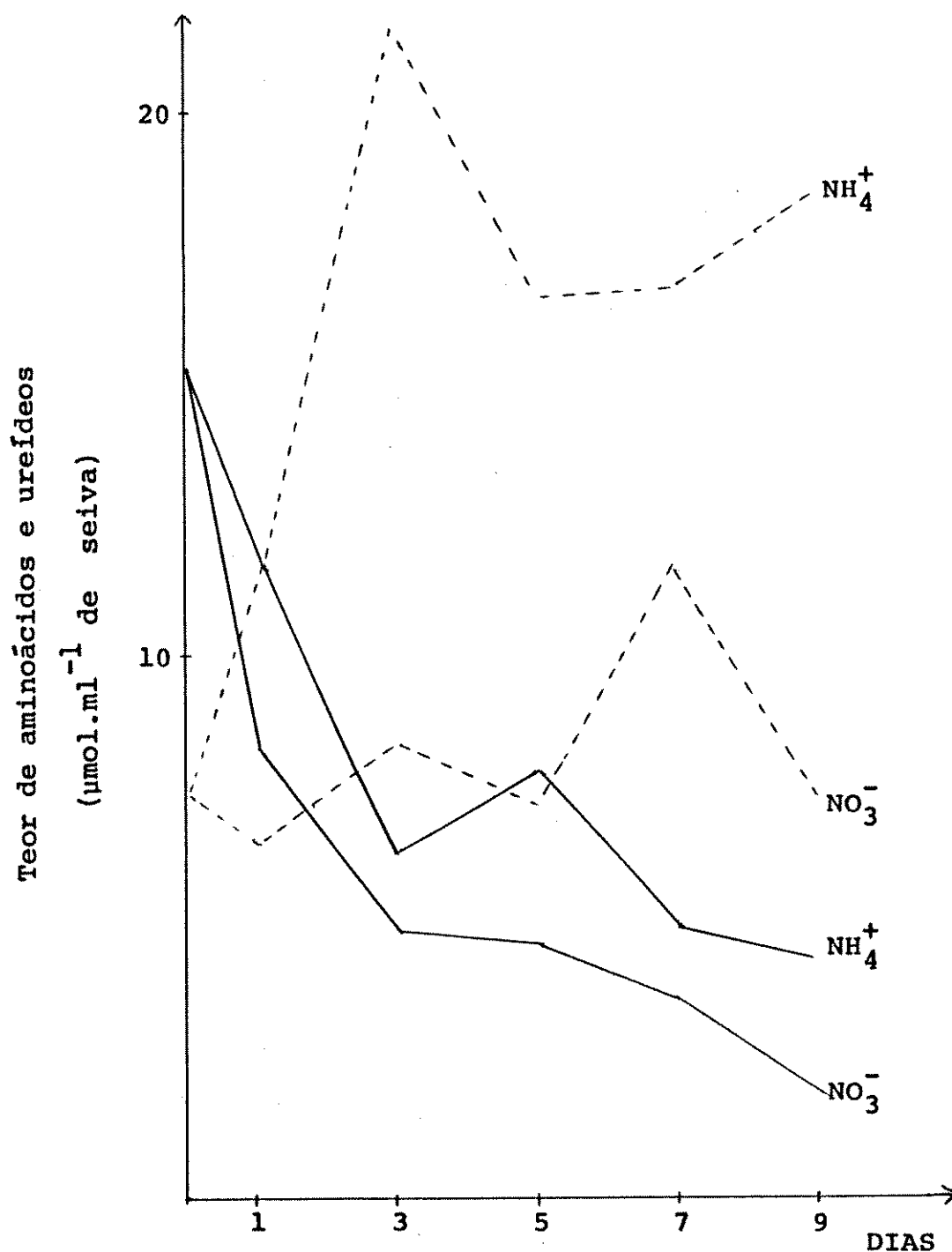
enquanto o das plantas que receberam NH_4^+ foi significativamente mais elevado.

2. PLANTAS NODULADAS TRATADAS COM N MINERAL

O experimento anterior demonstra uma forte inibição de N mineral sobre a nodulação e, conseqüentemente, a fixação do nitrogênio atmosférico. Para verificar o efeito destas fontes minerais sobre a atividade do nódulo, foi necessário cultivar as plantas em solução nutritiva sem N para permitir uma nodulação completa, para depois iniciar os tratamentos com diferentes fontes de N.

É desconhecido o tempo necessário para que o NO_3^- ou NH_4^+ possa exercer seu efeito máximo sobre o nódulo. Inicialmente, portanto, foi necessário verificar a ação do NO_3^- e NH_4^+ sobre plantas noduladas com relação à duração da aplicação em termos de teor de ureídeos e aminoácidos em exsudatos de xilema, coletados seqüencialmente durante nove dias após início do tratamento com N mineral. Os resultados de quatro repetições são apresentados na figura 8.

Quedas nos níveis de ureídeos podem ser observadas desde o primeiro dia de aplicação de NO_3^- ou NH_4^+ . As mudanças mais acentuadas continuaram até aproximadamente o terceiro dia, seguidas por decréscimos menores. Os níveis de aminoácidos permaneceram mais ou menos constantes no tratamento NO_3^- , enquanto mais que dobraram no NH_4^+ , sendo que este aumento também ocorreu nos três primeiros dias. Em termos gerais, os dados estão de acordo com o experimento anterior, ou



----- aminoácidos; ——— ureídeos

Figura 8. Teor de ureídeos e aminoácidos da seiva do xilemas de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias. A coleta foi realizada a 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o início do tratamento com N mineral.

seja, ocorre uma diminuição do teor de ureídeos na presença de nitrogênio mineral e elevação do nível de aminoácidos na presença de NH_4^+ .

Em função dos efeitos claros de NO_3^- e NH_4^+ sobre a composição do xilema, foram realizadas análises mais detalhadas com relação aos compostos nitrogenados ali presentes. Como a medida de ureídeos totais representa a soma das concentrações de dois componentes, o ácido alantóico e a alantofina (THOMAS & SCHRADER, 1981b), era interessante verificar a natureza da queda acentuada de ureídeos nos tratamentos NO_3^- e NH_4^+ em termos desses componentes. Com esse objetivo, foram feitas as análises de alantofina e ácido alantóico com determinadas amostras utilizadas na figura 8, e que se encontram no quadro 2; tais análises foram feitas na seiva resultante da mistura de todas as repetições por dia de coleta (0, 1, 3 e 7 dias) para cada tratamento.

Verifica-se, por esse quadro, que o ácido alantóico correspondeu a cerca de 70 a 90% do ureídeo total com tratamento NO_3^- e de 70 a 80% com tratamento NH_4^+ , ou seja, o ácido alantóico foi percentualmente maior que a alantofina, confirmando os dados de literatura (McCLURE & ISRAEL, 1979; THOMAS *et al.*, 1979; SCHUBERT, 1981). Verifica-se ainda, que ocorreu uma queda maior em alantofina. Antes de iniciar os tratamentos com NO_3^- ou NH_4^+ , a porcentagem de ureídeos na forma de ácido alantóico situava-se em torno de 70%, enquanto com três dias de tratamento com NO_3^- ou NH_4^+ , ela se elevou para cerca de 90 e 80% respectivamente.

Além dos compostos nitrogenados orgânicos, foram

Quadro 2. Teor de alantofina e ácido alantóico de seiva de xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução de -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias.

Dias	NO_3^-		NH_4^+	
	Ácido		Ácido	
	Alantofina	alantóico	Alantofina	alantóico
	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$	(%total)	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$	(%total)
0	4,63	10,44 (69,3)	5,09	11,48 (69,3)
1	2,22	6,27 (73,9)	4,77	7,03 (59,6)
3	0,47	4,20 (89,9)	1,12	5,15 (82,1)
7	0,44	3,22 (88,0)	1,03	3,96 (79,4)

realizadas análises do N-inorgânico na forma dos íons NH_4^+ e NO_3^- , nas mesmas amostras da figura 8, e apresentadas no quadro 3.

O teor de nitrato no xilema, como se pode ver, aumentou basicamente a partir do primeiro dia com o tratamento NO_3^- , chegando a níveis cerca de 55 vezes o valor inicial. Por outro lado, o tratamento NH_4^+ mostrou pequenas variações no nível de NO_3^- , embora algumas significativas. Para o teor do íon amônia, praticamente não ocorreu variação com os tratamentos NO_3^- e NH_4^+ , tendo apenas aumentado significativamente no último dia com tratamento NH_4^+ . Esses resultados indicaram a maior transferência do íon NO_3^- aplicado as raízes e a parte aérea, em relação ao íon NH_4^+ , que aparentemente foi incorporado em aminoácidos nas raízes.

Para conhecimento do nível de importância de cada composto nitrogenado envolvido no transporte de N no xilema, os dados foram transformados em porcentagem do N-total (soma dos componentes), levando-se em conta o número de átomos de N por mol de cada componente (p. ex.: ureídeo, 4N ; aminoácido, 2N). Tais dados se encontram no quadro 4. Verifica-se que os ureídeos são responsáveis por cerca de 80% do transporte do N para a parte aérea em plantas dependentes da fixação de N_2 (dia 0), com cerca de 20% na forma de aminoácidos, e apenas traços de NO_3^- e NH_4^+ . Após aplicação do N-mineral, o N-ureídeo diminuiu 64 e 61%, enquanto o N-aminoácido aumentou 66 e 71% pela aplicação de NO_3^- e NH_4^+ respectivamente. No caso do tratamento NO_3^- , este aumento na importância de aminoácido no transporte de N decorre exclusiva-

Quadro 3. Teor de NH_4^+ e NO_3^- de seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias. A coleta foi realizada a 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o início do tratamento.

Dias	Tratamento NO_3^-		Tratamento NH_4^+	
	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-
	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$			
0	0,58 ^{bc(1)}	0,07 ^c	0,58 ^{bc}	0,07 ^c
1	0,49 ^{bc}	4,70 ^a	0,84 ^b	0,10 ^c
3	0,44 ^{bc}	3,84 ^{ab}	0,72 ^{bc}	0,22 ^{bc}
5	0,61 ^{bc}	3,19 ^b	0,64 ^{bc}	0,43 ^{ab}
7	0,36 ^c	3,78 ^{ab}	0,82 ^b	0,54 ^a
9	0,38 ^c	3,93 ^{ab}	1,42 ^a	0,14 ^{bc}

(¹) Letras iguais indicam diferenças não-significativas.

Quadro 4. Porcentagem do N-total transportado na forma de ureídeos, aminoácidos, NH_4^+ e NO_3^- de seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias.

A coleta foi realizada a 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias após o início do tratamento

Dias	Tratamento NO_3^-			Tratamento NH_4^+		
	Ureídeos	Aminoácidos	NH_4^+	NO_3^-	Ureídeos	Aminoácidos
0	80,2	19,0	0,7	0,1	80,2	19,0
1	64,9	25,2	0,9	9,0	66,1	32,6
3	48,4	41,0	1,1	9,5	37,0	61,6
5	50,6	39,1	1,7	8,6	47,8	50,5
7	34,7	55,4	0,9	9,0	36,4	61,1
9	28,9	55,2	1,4	14,5	31,4	65,8

mente na queda de ureídeos, conforme figura 8. Os níveis de NO_3^- , apesar do grande aumento em plantas após tratadas com NO_3^- , não representam uma proporção expressiva do N transportado, sendo cerca de 10% em média com valor mais alto de 14,5% no dia 9. A contribuição de NH_4^+ , por outro lado, permaneceu muito baixa, numa faixa que não ultrapassou 1,4%.

Para verificar a ocorrência de variação entre os aminoácidos devida aos tratamentos de amônia ou nitrato, foram realizadas as análises pelo analisador de aminoácidos das amostras correspondentes às coletas dos dias 0 e 7 da figura 6, e apresentadas no quadro 5.

Esses dados indicam que a amida asparagina predominou, com os valores cerca de 62% do N-aminoácido total para plantas dependentes de N_2 atmosférico (dia 0), 70% em plantas com aplicação de NO_3^- e 85% em plantas com suprimento de NH_4^+ . As demais porcentagens mais expressivas corresponderam a 24% de ácido aspártico, 9% de glutamina e 5% de lisina para plantas dependentes de N_2 atmosférico, ou 20% de ácido aspártico e 3% para ácido glutâmico, lisina e histidina em plantas supridas com NO_3^- , ou 7% de ácido aspártico e 5% de glutamina para plantas com NH_4^+ . A asparagina junto com o ácido aspártico correspondeu de 86 a 93% do total de aminoácidos. O tratamento NH_4^+ aparentou percentualmente aumentar a asparagina e diminuir o ácido aspártico, e o NO_3^- diminuir a glutamina.

Quadro 5. Análise quantitativa e qualitativa de aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias. As análises foram feitas na seiva resultante da mistura de todas as repetições por dia de coleta (0 e 7 dias) para cada tratamento e são expressas em $\mu\text{mol}.\text{ml}^{-10}$ de seiva de xilema

Aminoácidos	Inicial 0 dia		Tratamento NO_3^- 7 dias		Tratamento NH_4^+ 7 dias	
	μmol	mol%	μmol	mol%	μmol	mol%
Asn	0,288	62,5	0,447	70,6	1,819	85,5
Gln	0,041	8,9	0,005	0,8	0,110	5,2
Asp	0,111	24,0	0,124	19,6	0,160	7,5
Glu			0,020	3,2	0,012	0,6
Thr	tr ⁽¹⁾		tr		tr	
Ser	tr				tr	
Ala					tr	
Gly			tr		tr	
Val			tr		tr	
Ile			tr			
Lys	0,021	4,6	0,020	3,2	0,026	1,2
His	tr		0,017	2,7	tr	
Desconhecida	0,044	-			0,015	-
Amônia	0,089	-	0,104	-	0,205	-

(¹) tr indica quantidade menor que 0,2 mol%

3. PLANTAS NODULADAS COM ESTIRPE EFICIENTE E INEFICIENTE

Estabelecida a duração do tratamento de plantas noduladas com nitrogênio mineral, um quarto experimento foi conduzido com plantas inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65 e com a ineficiente 166 (LOPES *et al.*, 1976); a análise do exsudato foi feita no sétimo dia após o início do tratamento com NO_3^- e NH_4^+ , na época da floração. Foram incluídos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ aplicados desde o início do plantio, para fins de comparação, e avaliada também a atividade da nitrogenase nas plantas noduladas com a estirpe eficiente. No quadro 6 acham-se os resultados de quatro repetições, em μmol de alantoína ou leucina por ml do exsudato de seiva.

Pode-se observar que a associação entre a produção de ureídeos e a fixação de nitrogênio ficou claramente demonstrada pelos dados obtidos com a estirpe eficiente, SMS 65, comparada com a ineficiente SMS 166. Embora o grau de nodulação obtido com a última fosse semelhante ao da estirpe eficiente, ou seja, elas apresentaram massas nodulares respectivas de 1.033mg (erro padrão da média de cerca de 68) e 1.431 (erro padrão da média de cerca de 120), significativamente não diferentes, o nível de ureídeos foi extremamente baixo em relação ao encontrado para a estirpe eficiente.

A aplicação de NH_4^+ em plantas noduladas com ambas as estirpes provocou um aumento marcante nos níveis de aminoácidos, superando até os encontrados em plantas cultivadas com NH_4^+ desde o início.

O íon NH_4^+ causou uma diminuição na produção de

Quadro 6. Taxa de redução de acetileno e teor de ureídeos e aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65 e a ineficiente SMS 166. As plantas foram cultivadas em solução -N (noduladas) e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- na época de floração (70 dias). A coleta foi realizada sete dias após iniciar o tratamento. Plantas do tratamento T-NH_4^+ e T-NO_3^- foram cultivadas com a respectiva fonte de nitrogênio desde a sua inoculação (SMS 65)

Fonte de N	Ureídeos (Ur)		Aminoácidos (AA)		Ur/(Ur + AA)		Acetileno reduzido
	SMS 65	SMS 166	SMS 65	SMS 166	SMS 65	SMS 166	
	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$		$\mu\text{mol.ml}^{-1}$		%		$\mu\text{mol.h}^{-1}$ planta $^{-1}$
T-NH_4^+	3,42 ^{c(1)}		11,96 ^b		22,2		
T-NO_3^-	1,23 ^d		6,94 ^b		15,1		
NH_4^+	6,29 ^b	2,90 ^a	23,82 ^a	24,40 ^a	20,9	10,6	4,22 ^b
NO_3^-	2,03 ^c	1,14 ^b	7,86 ^b	10,50 ^b	20,5	9,8	3,59 ^b
N_2	12,25 ^a	0,51 ^b	9,08 ^b	2,20 ^c	57,4	18,8	8,64 ^a

(¹) Letras iguais indicam diferenças não-significativas.

ureídeo encontrado na seiva de plantas com estirpe eficiente, mas não de forma tão drástica como no caso do NO_3^- (Quadro 6). Essa diferença entre NO_3^- e NH_4^+ não foi observada em termos de inibição da nitrogenase. Os íons NO_3^- e NH_4^+ inibiram a nitrogenase parcialmente e com intensidade semelhante (diferença não-significativa). Assim sendo, a maior produção de ureídeos por raiz nodulada na presença de NH_4^+ comparado com o NO_3^- , sugere que houve transformação de uma parcela do NH_4^+ assimilado em ureídeos. Esta hipótese parece fortalecida pelos resultados obtidos com a estirpe ineficiente, onde as plantas dependentes do nitrogênio atmosférico produziram menos ureídeos que as plantas com tratamento NH_4^+ . Aparentemente, o NH_4^+ retirado do meio externo é rapidamente assimilado em aminoácidos nas raízes, e menor quantidade transformada em ureídeos, provavelmente pelos nódulos.

O teor relativo de ureídeos (ureídeos/ureídeos + aminoácidos) apresentou valor de 57% para plantas dependentes do nitrogênio atmosférico, enquanto nos tratamentos NO_3^- e NH_4^+ ficou em torno de 20%. Embora os índices para o NO_3^- e NH_4^+ tenham sido semelhantes, é importante ressaltar que o obtido com o NH_4^+ se deve ao alto teor de aminoácidos, e o obtido com NO_3^- , ao baixo teor de ureídeos.

Em uma repetição do experimento anterior para verificar a ação do NO_3^- e NH_4^+ por sete dias em plantas noduladas com a estirpe eficiente SMS 65, foram analisados, na seiva do xilema, os teores de ureídeos, ácido alantóico, alantoina, NH_4^+ e NO_3^- e aminoácidos por colorimetria e pelo analisador de aminoácidos. Os resultados de oito repetições por

tratamento são apresentados nos quadros 7, 8, 9 e 10.

Verifica-se, pelo quadro 7, que, como anteriormente observado (Quadro 3), com aplicação do tratamento NO_3^- ocorreu grande aumento do teor do íon NO_3^- , enquanto o teor do NH_4^+ permaneceu significativamente estável. Com o tratamento NH_4^+ , o teor de nitrato não aumentou, porém ocorreu um pequeno acréscimo no íon NH_4^+ , não significativo pelo teste de Tukey a 1%, indicando que a variação do NH_4^+ foi muito pequena.

O quadro 8 corroborou os dados de inibição do íon NO_3^- sobre os níveis de ureídeos (Quadro 6). Embora neste caso o efeito do NH_4^+ não tenha sido significativo, aumentou o teor de aminoácidos. A prevalência do ácido alantóico sobre a alantoína também ocorreu (Quadros 2 e 8), tendo variado de 69% em plantas dependentes de N_2 atmosférico para 67% com aplicação do NH_4^+ e para 77% com NO_3^- , enquanto nas plantas cultivadas exclusivamente com NO_3^- correspondeu a 83%. Parece confirmada (Quadros 2 e 8) a ligeira tendência de maior proporção de ácido alantóico na presença de NO_3^- .

Fazendo-se o teor relativo de ureídeos acrescido do nitrato (ureídeo/ureídeo + aminoácido + nitrato), verificaram-se as mesmas tendências obtidas anteriormente (Quadro 6), isto é, que embora os índices obtidos para os tratamentos NO_3^- e NH_4^+ tenham sido semelhantes, o com NH_4^+ se deve ao alto teor de aminoácidos e o com NO_3^- , ao baixo teor de ureídeos, evidenciando, ainda, as distorções desse valor na presença de NH_4^+ .

Ficou confirmado, pelo quadro 9, que a aplicação

Quadro 7. Teor de NH_4^+ e NO_3^- de seiva de xilema de soja inoculada com a estirpe eficiente SMS 65, cultivada em solução -N (noduladas) e tratada com solução NH_4^+ e NO_3^- na época de floração (67 dias). A coleta foi realizada sete dias após iniciar o tratamento. Plantas do tratamento T- NH_4^+ e T- NO_3^- foram cultivadas com a respectiva fonte de nitrogênio desde a sua inoculação

Fonte de nitrogênio	NH_4^+	NO_3^-
	$\mu\text{mol.ml}^{-1}$	
T- NH_4^+	-	-
T- NO_3^-	0,31 ^{b(1)}	4,06 ^b
NH_4^+	0,94 ^a	0,25 ^c
NO_3^-	0,29 ^b	1,73 ^a
N_2	0,57 ^b	0,05 ^c

(¹) Letras iguais indicam diferenças não-significativas.

Quadro 8. Teor de aminoácidos, ureídeos, ácido alantóico e alantoína de seiva de xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias por sete dias. Plantas do tratamento T- NH_4^+ e T- NO_3^- foram cultivadas com a respectiva fonte de nitrogênio desde a sua inoculação

Fonte de N	Ureídeos	Ácido alantóico	Alantoína	Aminoácidos	Ur/(Ur+AA+ NO_3^-)
			$\mu\text{mol.ml}^{-1}$		%
T- NH_4^+	2,09 ^{c(1)}	-	-	10,92 ^b	16,1
T- NO_3^-	2,15 ^c	1,78	0,37	9,71 ^b	13,5
NH_4^+	15,78 ^a	10,56	5,22	19,50 ^a	44,4
NO_3^-	8,68 ^b	6,70	1,98	11,05 ^b	40,4
N_2	15,81 ^a	10,96	4,85	8,69 ^b	64,4

(¹) Letras iguais indicam diferenças não-significativas.

Quadro 9. Valores (%) do N total dos teores de ureídeos, aminoácidos, NO_3^- e NH_4^+ de seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- na época de floração (70 dias). A coleta foi realizada sete dias após iniciar o tratamento. Plantas do tratamento T- NH_4^+ e T- NO_3^- foram cultivadas com a respectiva fonte de nitrogênio desde a sua inoculação (SMS 65)

Fonte de N	Ureídeos	Aminoácidos	NO_3^-	NH_4^+
T- NH_4^+	27,7	72,3	-	-
T- NO_3^-	26,6	60,0	12,5	1,0
NH_4^+	61,1	37,8	0,2	1,0
NO_3^-	59,0	37,6	2,9	0,5
N_2	77,8	21,4	0,1	0,7

do íon NO_3^- aumentou sensivelmente a proporção de N-total correspondente ao nitrato, em relação ao aumento da proporção de N-total de amônia decorrente da aplicação de NH_4^+ , assim como o fato de que a proporção de N-total correspondente aos ureídeos diminuiu com a aplicação do N-mineral, embora aumente o volume de N-total de aminoácidos. Além das observações já citadas no quadro 4, neste experimento verificou-se que o comportamento da porcentagem de N-total correspondente aos ureídeos e aminoácidos quase não se diferenciou para ambos tratamentos NO_3^- e NH_4^+ (Quadro 9). Embora os valores absolutos dos teores de ureídeos e aminoácidos foram maiores para o xilema de plantas submetidas ao tratamento NH_4^+ em relação ao NO_3^- (Quadro 8), o valor em porcentagem de N-total para ambos tratamentos quase não diferiu. Com aplicação de N- NO_3^- e N- NH_4^+ o ureídeo diminuiu, respectivamente, 24 e 22% enquanto o N-aminoácido aumentou 43% para ambos tratamentos. Estes dados são consequentes do fato de que o N-total correspondente a soma de N-aminoácido, N-ureídeo, N- NO_3^- e N- NH_4^+ , foi maior para plantas tratadas com NH_4^+ em relação as com NO_3^- .

Os dados sobre a composição de aminoácidos do xilema confirmaram (Quadros 5 e 10) que a amida asparagina é o aminoácido predominante, correspondendo a 90% do N-aminoácido total para plantas dependentes do N_2 atmosférico, 85% para plantas com aplicação de NH_4^+ , 87% para as T- NH_4^+ (plantas cultivadas em NH_4^+), 76% para plantas com aplicação de NO_3^- e 51% para as T- NO_3^- (plantas cultivadas em NO_3^-). As demais porcentagens mais expressivas corresponderam a 5% de

Quadro 10. Análise quantitativa e qualitativa de aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivadas em solução -N e tratadas com solução NH_4^+ e NO_3^- aos 67 dias por sete dias. Plantas do tratamento T-NH_4^+ e T-NO_3^- foram cultivadas com a respectiva fonte de nitrogênio desde a sua inoculação. O resultado corresponde à mistura das repetições expresso em $\mu\text{mol.ml}^{-10}$ de seiva do xilema

Aminoácidos	N_2		NO_3^-		NH_4^+		T-NO_3^-		T-NH_4^+	
	μmol	mol%	μmol	mol%	μmol	mol%	μmol	mol%	μmol	mol%
Asn	0,460	90,4	0,330	76,4	1,933	84,6	0,240	51,3	0,350	87,0
Gln					0,181	7,9	tr		0,018	4,3
Asp	0,025	4,9	0,076	17,6	0,089	3,9	0,201	42,9	0,008	2,0
Glu	0,008	1,6	tr		0,017	0,7	0,009	1,9	0,004	1,0
Ser	tr ⁽¹⁾									
Ala									0,008	2,0
Gly					tr		tr		tr	
Val					tr		tr		tr	
Lys	0,016	3,1	0,016	3,7	0,021	0,9	0,013	2,8		
His	tr		0,010	2,3	0,025	1,1	0,005	1,1	0,015	3,7
Arg					0,020	0,9				
Desconhecida			0,056	-	0,052	-	0,016	-	0,024	-
Amônia	0,195	-	0,078	-	0,157	-	0,128	-	0,129	-

⁽¹⁾ tr indica quantidade menor que 0,2 mol%.

ácido aspártico, 3% de lisina e 1% de ácido glutâmico, nas plantas dependentes de N_2 atmosférico. Nas plantas com aplicação de NO_3^- , a 18% de ácido aspártico, 4% de lisina e 2% de histidina. Nas plantas T- NO_3^- , a 43% de ácido aspártico, 3% de lisina, 2% de ácido glutâmico e 1% de histidina. Nas plantas com T- NH_4^+ , a 4% de glutamina, 4% de histidina, 2% de ácido aspártico, 2% de alanina e 1% de ácido glutâmico. Nas plantas com NH_4^+ , a 8% de glutamina, 4% de ácido aspártico, 1% de histidina, 1% de lisina, 1% de arginina, e 1% de ácido glutâmico. Os resultados das testemunhas de N-mineral estão de acordo com HAYNES & GOH (1978) de que as amidas são encontradas em níveis maiores de plantas supridas com $N-NH_4^+$ em comparação as em $N-NO_3^-$. Verificou-se que não houve correspondência dos valores de plantas dependentes do N_2 atmosférico do quadro 5 em relação ao quadro 10, porém pareceu confirmada a tendência de o tratamento NO_3^- originar baixo teor de glutamina e maior de ácido aspártico em relação ao NH_4^+ , que, por sua vez, parece aumentar o teor de glutamina.

4. TECIDOS DE PLANTAS NODULADAS TRATADAS COM NH_4^+

Embora os ureídeos sejam encontrados em cada órgão de planta de soja (FUJIHARA, 1977), os principais sítios de acúmulo foram relatados como sendo nos ramos e pontos de crescimento (PATE *et al.*, 1980; THOMAS *et al.*, 1980) ou paredes de vagens em desenvolvimento (THOMAS & SCHRADER, 1981a; YONEWAMA & ISHIZUKA, 1982). Para verificar a ação do NH_4^+ em plantas noduladas com relação à seiva do floema e aos extra-

tos de folha, caule e vagem, foram feitas as análises de ureídeos e aminoácidos nas amostras coletadas em soja inoculadas com a estirpe eficiente SMS 65, cultivada em solução -N e tratada com solução NH_4^+ na época do florescimento. Os dados, apresentados no quadro 11, correspondem a oito repetições por tratamento, e μmol de alantoína ou leucina por grama de peso fresco de tecido ou por solução de floema em 2ml de EDTA.

Os dados correspondentes à folha e ao floema não indicaram diferenças no teor de ureídeos e aminoácidos, enquanto caule e vagem apresentaram diferenças significativas, não refletindo, porém, pelo menos até o sétimo dia de aplicação do N mineral, o decréscimo do teor de ureídeos encontrado no xilema. Esses materiais indicaram não serem adequados para verificação de inibição da nitrogenase pelo teor de ureídeo, concordando com PATE *et al.* (1980).

Quadro 11. Teor (média) de ureídeos e aminoácidos de seiva de floema, extrato aquoso de folha, vagem e caule de soja inoculada com a estirpe eficiente SMS 65, cultivada em solução -N e tratada com a solução NH_4^+ aos 66 dias. A coleta foi realizada a 0, 1, 4 e 7 dias após o início do tratamento, apresentada por grama de peso fresco (PF) ou mililitro de floema

Material	Dia 0		Dia 1		Dia 4		Dia 7	
	Ur	AA	Ur	AA	Ur	AA	Ur	AA
	$\mu\text{mol/g PF ou ml}$							
Floema	0,18 ^a (1)	7,65 ^a	0,17 ^a	8,49 ^a	0,20 ^a	9,32 ^a	0,21 ^a	-
Folha	1,44 ^a	21,02 ^a	1,75 ^a	23,35 ^a	1,44 ^a	16,37 ^b	1,05 ^a	16,77 ^a
Caule	2,28 ^b	11,34 ^b	4,86 ^a	15,11 ^a	4,92 ^a	15,48 ^a	4,65 ^a	10,12 ^b
Vagem	5,26 ^b	25,01 ^a	13,35 ^a	15,93 ^b	8,27 ^b	15,67 ^b	4,87 ^c	16,86 ^b

(¹) Letras iguais indicam diferenças não-significativas (entre colunas).

DISCUSSÃO

Conhecendo-se a grande economia em fertilizantes nitrogenados que o processo de fixação de N_2 possibilita, é reconhecida a necessidade de melhor compreensão do funcionamento dos processos assimilatórios em nódulos e raízes na presença de íons NO_3^- e NH_4^+ .

Leguminosas noduladas como a soja possuem dois processos assimilatórios bem definidos na raiz: a redução e assimilação do nitrato, e a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico (localizado no nódulo). Cada um desses processos leva à formação de compostos característicos para o transporte do N assimilado. No caso da fixação de N_2 , é geralmente aceito que os ureídeos são produtos específicos do processo (FUJIHARA *et al.*, 1977; MATSUMOTO *et al.*, 1977a; OHYAMA & KUMAZAWA, 1979; SCHUBERT, 1981). Os dados obtidos neste trabalho (Quadro 6) também são uma forte evidência. A

quase total ausência de ureídeos no xilema de plantas noduladas com uma estirpe de *Rhizobium* ineficiente, comparada com os altos níveis encontrados com a estirpe eficiente, indica que a fonte desses compostos é o processo de fixação de N_2 . Além disso, os dados do quadro 6 demonstram que o NO_3^- inibe a fixação de N_2 (redução de acetileno) e, paralelamente, leva a uma diminuição no nível de ureídeos. Apesar da evidente estreita relação entre a fixação de N_2 e a produção de ureídeos, a formação destes não é exclusiva do processo de fixação. SCHUBERT (1981) sugeriu que, na fase inicial e final de desenvolvimento nodular de soja, cuja fixação de N_2 é pequena, o catabolismo dos ácidos nucléicos pode ser responsável por parte da síntese de ureídeos, justificando o alto nível de 58% do N-total encontrado em seiva de xilema de planta com apenas doze dias pós-plantio. HERRIDGE (1982b), por sua vez, encontrando altos níveis de ureídeos no eixo de haste e raízes de plantas de soja cultivadas no campo, ainda sem a formação nodular, sugeriu a procedência ureídica a partir do N-amônia assimilado pela absorção e redução do NO_3^- suprido. Os dados do presente trabalho também evidenciaram que plantas livres de nódulos e cultivadas na presença de NO_3^- transportam ureídeos, embora em pequenas quantidades (Quadro 1), o que está em concordância com os de McCLURE & ISRAEL (1979), PATE *et al.* (1980) e GOMES & SODEK (1982).

É conhecido que os ureídeos produzidos em função da fixação de N_2 no nódulo são sintetizados fora dos bacteróides, no citoplasma (WOO *et al.*, 1980; SCHUBERT, 1981; REYNOLDS *et al.*, 1982; SHELP *et al.*, 1983; ATKINS *et al.*, 1984b). Des-

ta forma, é possível que a fixação de N_2 , de forma desconhecida, leva a um grande estímulo da biossíntese de ureídeos nos tecidos vegetais, ou seja, o caminho já existe e é ativado por um componente da fixação de N_2 .

Os dados do quadro 1 confirmam o fato de que os produtos da redução e assimilação do NO_3^- são os aminoácidos. Entretanto, os aminoácidos não foram produtos apenas desse processo, uma vez que plantas noduladas cultivadas na ausência de N-mineral, portanto totalmente dependentes de N_2 atmosférico, possuem quantidades de aminoácidos no xilema até semelhantes às aquelas cultivadas com NO_3^- (Quadros 1, 6 e 8). A conclusão de que os aminoácidos também são produtos da fixação de N_2 (embora menos importante do que os ureídeos) é reforçada pelos dados do quadro 6, que mostra um baixo nível de aminoácidos no xilema de plantas noduladas com estirpe ineficiente. OHYAMA & KUMAZAWA (1979) verificaram que em nódulos supridos com $^{15}N_2$ ocorreu um sistema seletivo de derivação dos compostos de N-solúvel, resultando em maior nível de ureídeo e alguns aminoácidos em relação aos compostos derivados da absorção do $^{15}NO_3$ pelas raízes, portanto, constatando a derivação de aminoácidos da fixação de N_2 .

Em resumo, as evidências disponíveis permitem afirmar que os ureídeos são produtos quase exclusivos do processo de fixação de N_2 , enquanto os aminoácidos são produtos dos dois processos assimilatórios.

Embora existam evidências na literatura de que a fixação de N_2 atmosférico esteja localizada nos nódulos (associados no sistema radicular), o processo de redução e as-

similação do NO_3^- está localizado tanto na parte aérea (folhas principalmente), como no sistema radicular. A importância relativa dos sistemas foliar e radicular varia em função da espécie e a disponibilidade do NO_3^- (PATE, 1980). No caso da soja, já foi comprovado que o sistema radicular possui certa capacidade para a assimilação do NO_3^- (OHYAMA & KUMAZAWA, 1979; CRAFTS-BRANDNER & HARPER, 1980; WONG & STENBERG, 1980; YONEYAMA & ISHIZUKA, 1982). Os dados do trabalho evidenciaram certa capacidade por parte do sistema radicular em assimilar NO_3^- . O nível de NO_3^- translocado no xilema de plantas cultivadas com esse material é baixo em relação ao N-orgânico (tratamento T- NO_3^- , Quadro 9). Supondo-se que o N-orgânico represente os produtos do processo de assimilação, e o NO_3^- , a fração não-processada, as plantas cultivadas com NO_3^- assimilam na própria raiz cerca de 80% ou mais de NO_3^- absorvido.

As estimativas da importância relativa do sistema radicular para a redução e assimilação de NO_3^- são válidas apenas para as condições do experimento. Com diferentes níveis de NO_3^- as estimativas podem variar bastante (PATE *et al.*, 1980). Uma análise dos dados da literatura revela grande variação quanto ao nível de NO_3^- transportado para a parte aérea. Sô no caso da soja, encontramos valores para a porcentagem de N do xilema em forma de NO_3^- de 23% (LAYZELL & La RUE, 1982) a cerca de 60% (McCLURE & ISRAEL, 1979).

Outro dado que demonstra claramente a alta capacidade assimilatória do sistema radicular é o grande aumento em aminoácidos no xilema de plantas noduladas com a estirpe

ineficiente após tratamento com NO_3^- (Quadro 6).

A influência de N-mineral sobre os dois processos de assimilação foi bastante nítida, embora condições especiais fossem necessárias para separar efeitos sobre a nodulação e processo de fixação de N_2 por si. Em primeiro lugar, cultivando simplesmente as plantas na presença das fontes de N-mineral em estudo acarretou forte inibição do processo de nodulação. O NO_3^- inibiu totalmente a formação de nódulos (Quadro 1). Este efeito já é bem conhecido (RAGGIO *et al.*, 1965; MUNNS, 1968; GIBSON & PAGAN, 1977; DAZZO & BRILL, 1978; HEICHEL & VANCE, 1979; COTTINGHAM & JONES, 1980; WONG & STENBERG, 1980; HERRIDGE, 1982b), existindo uma relação entre o grau de inibição e a concentração aplicada (MATSUMOTO *et al.*, 1977b; HERRIDGE, 1982a). Normalmente, uma concentração de 10 a 15 mM é suficiente para suprimir totalmente a nodulação em leguminosas (MATSUMOTO *et al.*, 1977b; HERRIDGE, 1982a), sendo de 15 mM a concentração de NO_3^- presente na solução nutritiva usada neste estudo.

O íon NH_4^+ também inibiu a nodulação, aparentemente com eficiência um pouco menor do que o NO_3^- (Quadro 1), embora as condições do experimento não permitam uma compreensão estreita, principalmente porque não houve um controle rígido da concentração dos íons no meio.

A ação do efeito inibitório do nitrogênio na nodulação não está ainda esclarecida. Segundo WILSON & FRED (1939) o balanceamento da relação carboidrato-nitrogênio é que controla o sistema de fixação simbiótica, ou seja, o número, tamanho e distribuição dos nódulos e suas proprieda-

des de simbiose. Portanto, o efeito do N-combinado seria exercido internamente sobre o tecido da planta. Os autores consideram esta teoria mais completa que a da disponibilidade de carboidrato, de ALLISON & LUDWIG (1936), pois apreciavam em apenas uma hipótese, o suprimento de nitrogênio e carboidrato. A inibição da nodulação devida a deficiência de carboidrato disponível seria decorrente ao maior requerimento de carbono para o balanceamento da relação C:N quanto maior o fornecimento de nitrogênio à planta.

Várias teorias contestam essa noção de que o conteúdo de carboidrato de planta é correlacionado ao efeito do nitrogênio sobre a formação nodular. RAGGIO *et al.* (1965) em experimento com sistema de raiz isolada que permite a alimentação via interna pela base da raiz, ou externa, pelo meio de crescimento, verificaram que a inibição da nodulação ocorreu apenas quando o nitrato foi suprido externamente. A alimentação interna com nitrato em raiz suprida com carboidrato chegou a promover a nodulação. Sugeriram, portanto, que a inibição do nitrato é exercida apenas sobre os rizóbios, enquanto a promoção é mediada pelo hospedeiro. Por sua vez, HEICHEL & VANCE (1979) encontraram que enquanto a nodulação diminuiu com o suprimento de nitrato, o conteúdo de carboidrato total disponível aumentou, tanto em plântula de alfafa nodulada, como na não-nodulada. Não encontraram diferenças suficientes entre o conteúdo de carboidrato total disponível de planta nodulada em relação a de não-nodulada, para justificar que a nodulação tivesse sido mediada por carboidratos solúveis armazenados.

Considerando-se que a maioria dos rizóbios reduzem nitrato a nitrito, decorre a teoria da ação inibitória do nitrato pela destruição catalítica do ácido indol-3- acético (AIA) pelo nitrito (TANNER & ANDERSON, 1964). O nitrito foi relatado destruir o AIA (GEORGI & BEGUIN, 1939), que por sua vez, foi considerado representar um fator para encurvamento radicular e crescimento das linhas de infecção e iniciação da divisão celular levando a formação nodular (KEFFORD *et al.*, 1960; MUNNS, 1968). A ação inibitória do nitrato é também relatada ser direta por MUNNS (1968), que encontrou a interferência do nitrato diretamente na penetração do rizóbio na raiz, devido inibir as secreções rizobiais de formação, elongação e encurvamento das raízes radiculares.

Por outro lado, DAZZO & BRILL (1978) encontraram que a inibição da infecção e nodulação pelos íons NO_3^- e NH_4^+ ocorreu em plantas de trevo inoculadas com o *Rhizobium trifolii* devido ao declínio na ligação do *Rhizobium* às raízes radiculares e nos níveis da lectina da planta, trifoliina, sobre a superfície radicular. Portanto, os íons de nitrogênio interferiram no processo inicial de reconhecimento da simbiose.

Para estudar o efeito direto do NO_3^- e NH_4^+ sobre o processo de fixação de N_2 , foi necessário cultivar as plantas primeiro em condições favoráveis à nodulação, ou seja, na ausência de N-mineral, para então aplicar esses íons às plantas após a nodulação plena. Dessa maneira, foi possível realizar este estudo sem a complicação de efeitos indiretos sobre a nodulação.

Os dados apresentados nos quadros 1 e 6 demonstram que os íons NO_3^- e NH_4^+ inibiram a nitrogenase (redução de acetileno) e diminuíram marcadamente o nível de ureídeos na seiva, confirmando a inibição do N-mineral sobre a fixação.

A ação do efeito inibitório do nitrato é ainda bastante discutida. A hipótese da inibição do nitrito formado pela redução do nitrato se baseia no fato de que o nitrito reduz e oxida a leg-hemoglobina "in vitro", podendo impedir a ligação com o O_2 e interferir com os processos de fixação de N_2 . Essa viabilidade é discutida, pois vários trabalhos com mutantes de *Rhizobium* defectivos em nitrato redutase (NR) demonstraram continuar ocorrendo a diminuição da fixação do N_2 (GIBSON & PAGAN, 1977; MANHART & WONG, 1980), não sendo detectado nitrito nos nódulos (STREETER, 1982), ou em baixo nível (STREETER, 1985a), embora tenha sido encontrada redução substancial do nitrato, apesar da baixa atividade da NR (WARNER & KLEINHOF, 1981).

Outro fator para explicar a inibição da fixação de N_2 por N-mineral é a menor eficiência de assimilação de nitrogênio na forma de N_2 fixado em relação à de NO_3^- reduzido. ATKINS *et al.* (1980) sugeriram que raiz nodulada de caupi em relação a não-nodulada deva ter maior proporção de componentes não assimilatórios da respiração, perdendo mais C como CO_2 na respiração e necessitando de mais energia. Esse maior requerimento de energia se deveria ainda ao funcionamento nodular e ao maior gasto metabólico, considerando-se que parte do NO_3^- assimilado é reduzido fotossinteticamen-

te na parte aérea em plantas não-noduladas. A maior eficiência de assimilação do NO_3^- em relação à fixação de N_2 parece ser comprovada pelo maior conteúdo de N-total em sementes de plantas com maior suprimento de NO_3^- (COTTINGHAM & JONES, 1980), ou pela menor altura e nitrogênio do tecido vegetativo, assim como menor semente em planta dependente de N simbiótico (WYCH & RAINS, 1979). Ainda, enquanto nas não-noduladas ocorreu maior crescimento com o aumento da taxa fotossintética, nas noduladas ocorreu maior fixação e assimilação do N_2 (BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1978), e menor perda da fotossíntese líquida diária por plantas não-noduladas em presença de NO_3^- em relação às noduladas (FINKE *et al.*, 1982).

A supressão da redução da fixação de N_2 em plantas na presença de NO_3^- pela adição de carboidrato (WONG, 1980; NOEL *et al.*, 1982), parece concordar com a hipótese de que a energia consumida pelos processos assimilatórios de N-mineral pode levar a uma diminuição da disponibilidade de fotossintatos para o processo de fixação de N_2 . STREETER (1985b), por outro lado, após suprir plantas controle de soja (com 2 mM de NO_3^-) com 15 mM de NO_3^- , por sete dias e após com nenhum NO_3^- , não encontrou, nos nódulos, diferenças na composição de carboidrato entre os tratados e os controles, embora tenha diminuído a atividade da nitrogenase das plantas tratadas.

Até o presente momento, também não se conhece a ação do efeito inibitório do NH_4^+ . O menor vigor e deficiência de nitrogênio de soja nodulada em relação à não-nodulada dependente de NH_4^+ foi encontrado por MARCUS-WYNER & RAINS

(1983). Esses autores sugeriram, porém, que a menor absorção de NH_4^+ nas noduladas não tenha ocorrido devido a mecanismos de absorção, mas ao decréscimo na massa de raízes. Por outro lado, BETHLENFALVAY & PHILLIPS (1978) encontraram maior crescimento de plantas dependentes tanto de NO_3^- como NH_4^+ com o aumento da taxa fotossintética. Assim, além da menor eficiência de assimilação de nitrogênio na forma de N_2 fixado em relação à de NH_4^+ , poderia ser sugerida a hipótese de que a energia consumida pelos processos assimilatórios de N-mineral levasse a uma diminuição da disponibilidade de fotossintato para o processo de fixação de N_2 (NOEL *et al.*, 1982).

Os dados apresentados na figura 8 demonstram que os efeitos de N-mineral sobre os processos assimilatórios avaliados através dos reflexos nos níveis dos seus produtos encontrados no xilema, são sentidos, na maior parte, dentro de três dias após a aplicação às plantas noduladas. Nos demais experimentos, foi utilizado um período de sete dias entre aplicação e análise.

Mudanças substanciais nos níveis de ureídeos ou aminoácidos foram observadas, conforme a natureza do mineral aplicado. O NO_3^- levou a uma queda brusca no nível de ureídeos no xilema (Figura 8, Quadros 6 e 8), o que sugere forte inibição da nitrogenase. De fato, a taxa de redução de acetileno diminuiu após aplicação de NO_3^- (Quadro 6). Apesar da forte inibição da formação de ureídeos, o nível desses compostos em plantas noduladas com estirpe ineficiente foi um pouco maior quando tratadas com NO_3^- , embora a diferença não

tenha sido significativa. Outros autores (McCLURE & ISRAEL, 1979; PATE *et al.*, 1980; HERRIDGE, 1982b; GOMES, 1982) têm observado que plantas não noduladas cultivadas com NO_3^- transportam mais ureídeos (embora o nível absoluto seja muito baixo). Um estudo com $^{15}\text{NO}_3^-$ demonstrou que em soja uma pequena fração desse íon pode ser reduzida no nódulo e, subsequentemente, incorporado em ureídeos (OHYAMA & KUMAZAWA, 1979). Dessa forma, é possível que o NO_3^- de um lado iniba a nitrogenase e, de outro, estimule levemente a biossíntese de ureídeos dos tecidos vegetais.

O NO_3^- aparentemente não acarretou mudanças significativas em aminoácidos no xilema (Figura 8, Quadros 6 e 8). À primeira vista, esse dado é surpreendente, visto que o NO_3^- é o próprio substrato do sistema de assimilação e, como discutido anteriormente, o sistema radicular possui alta capacidade para assimilar o NO_3^- . Entretanto, como os aminoácidos são também produtos da fixação de N_2 , a forte inibição da fixação de N_2 pelo NO_3^- , além de diminuir acentuadamente a produção de ureídeos deve inibir a formação de aminoácidos, produtos da fixação. Assim, o aumento em aminoácidos provenientes da assimilação do NO_3^- foi mascarado ou contrabalanceado pelo decréscimo em aminoácidos oriundos da inibição de fixação de N_2 . Por outro lado, em outros trabalhos, o suprimento de NO_3^- foi relatado aumentar, em seiva de xilema de planta de soja não-nodulada em relação à nodulada, a porcentagem de N-aminoácido de 20 para 30% (McCLURE & ISRAEL, 1979) ou em nódulos de 10 para 20% (STREETER, 1985b).

O íon NH_4^+ teve um efeito contrário ao NO_3^- em

termos dos compostos encontrados no xilema: aumentou o teor de aminoácidos, enquanto sua influência foi menor sobre os ureídeos. A interpretação dos dados obtidos com NH_4^+ deve levar em conta o fato de que esse íon é intermediário dos dois processos assimilatórios. O grande aumento em aminoácidos no xilema (Figura 8, Quadros 6 e 8) é reflexo certamente de uma rápida e eficiente assimilação na raiz. Isso porque não houve aumento no transporte de NH_4^+ , que permaneceu em níveis baixos (cerca de 1 a 2%, Quadros 4 e 9), ou seja, o NH_4^+ transportado não foi excessivo. Plantas não noduladas também demonstraram o mesmo efeito (Quadro 1); o fenômeno, portanto, é próprio da raiz e independe do nódulo. Assim, em plantas noduladas, uma boa parte do NH_4^+ deve ter sido assimilado via glutamina sintetase normalmente envolvida na assimilação do NH_4^+ resultante da redução de NO_3^- . O íon NH_4^+ é altamente tóxico, tanto para raízes como para folhas (PURITCH & BARKER, 1967): sua rápida e eficiente assimilação, portanto, se torna essencial como mecanismo de detoxificação (HAYNES & GOH, 1978), havendo evidências de que, quando em excesso, o NH_4^+ inibe o metabolismo energético através do desacoplamento da síntese de ATP (HEWITT, 1975). A reação da glutamina sintetase incorpora o NH_4^+ em glutamina; e nesse respeito, é interessante observar que a presença de glutamina no xilema, normalmente muito baixa, aumenta significativamente após tratamento com NH_4^+ (Quadro 10).

O NH_4^+ teve menor efeito sobre a atividade do processo de fixação de N_2 , pelo menos em termos da produção de ureídeos (Quadros 6 e 8). Entretanto, os dados com a re-

dução de acetileno (Quadro 6) sugerem que NH_4^+ inibe a nitrogenase com quase a mesma intensidade que o NO_3^- (diferença não-significativa entre a amônia e nitrato). Como o NH_4^+ é inibidor da nitrogenase (BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1978; NOEL *et al.*, 1982; ZENGBE *et al.*, 1984), parece, pois, que o efeito inibitório do NH_4^+ sobre a fixação de nitrogênio seja mascarado ou parcialmente mascarado por um aumento na síntese de ureídeos a partir do próprio NH_4^+ . Assim, em plantas noduladas, o NH_4^+ não é apenas assimilado via processo associado à reductase de nitrato responsável pelo grande aumento em aminoácidos, mas também por processo associado à fixação de N_2 no nódulo. Outros dados que apoiam esta hipótese são aqueles obtidos com a estirpe ineficiente (Quadro 6). Neste caso, onde praticamente não ocorre fixação do nitrogênio e, portanto, produção de ureídeos, o efeito do NH_4^+ em aumentá-los pode ser verificado claramente. Por outro lado, ZENGBE *et al.* (1984) observaram que em plantas noduladas de soja com estirpe ineficiente, o NH_4^+ não elevou os baixos níveis de ureídeos, concluindo que a ineficiência da estirpe estava relacionada a algum bloqueio na síntese de ureídeos. A nosso ver, os baixos níveis de ureídeos podem também ter sido decorrentes da baixa atividade da nitrogenase da estirpe ineficiente (em torno de 10% da eficiente). Entretanto, no caso da planta nodulada com estirpe eficiente, o tratamento com NH_4^+ inibiu a atividade da nitrogenase mas não diminuiu o nível de ureídeo na seiva do xilema. Baseando-se neste fato, os autores concluíram que parte do NH_4^+ aplicado foi transformado em ureídeos.

McCLURE & ISRAEL (1979) encontraram que em sei-

va de soja nodulada durante a fase vegetativa e de enchimento de vagem cerca de 80% do N-total como N-ureídeo, sendo o ácido alantóico a forma predominante, enquanto McCLURE *et al.* (1980) relataram que o conteúdo relativo de ureídeo de seiva de xilema de soja coletada durante a fase diurna variou de 82 a 90% do N-total. SCHUBERT (1981) verificou que, mesmo com apenas doze dias após o plantio, os ureídeos eram a forma predominante no xilema de soja, correspondendo a 58% do N-total e aumentando até 98% do N-total após vinte e um dias. Esses dados demonstram a predominância ureídica em soja nodulada, estando de acordo com os encontrados neste trabalho (Quadros 4 e 9).

Os quadros 2 e 8 mostram a prevalência do ácido alantóico sobre a alantoina na seiva do xilema, com tendência para aumentar a proporção do ácido à medida que as plantas são supridas com N-mineral e nas plantas com NO_3^- em relação às com NH_4^+ . Embora STREETER (1979) tenha encontrado a relação entre alantoina e ácido alantóico de aproximadamente 60:40 para o N-ureídeo de folha, haste e fruto de soja em desenvolvimento, essa relação inverteu em haste e fruto de planta madura, concordando com THOMAS & SCHRADER (1981a) e em xilema, de acordo com McCLURE & ISRAEL (1979), THOMAS *et al.* (1979), McCLURE *et al.* (1980), SCHUBERT (1981). McCLURE *et al.* (1980) encontraram que a relação alantoina:ácido alantóico variou durante a coleta diurna de 20:60 a 10:80 do N-total, que, convertidos em porcentagem de ácido alantóico, correspondem a 67 e 88%, bem de acordo com nossos dados (Quadro 2). Pelos quadros 2 e 8 pode-se sugerir que a menor quan-

tidade de ureídeos na seiva de plantas supridas com N-mineral proporcione condições mais favoráveis para maior atuação da alantoinase nas raízes, originando alto ácido alantóico. HERRIDGE *et al.* (1978) relataram que a relação alantoína:ácido alantóico em xilema de raiz de soja nodulada variou conforme crescimento da planta. Com a diminuição do teor de ureídeo total dos 45 aos 80 dias pós-plantio, a relação alantoína:ácido alantóico passou de cerca de 1,0:1,5 para 1,0:0,8 e para 1,0:2,3 em planta com cerca de 100 dias quando o teor de ureídeo total continuou baixo. A diminuição do teor de ureídeos coincidente com a queda de proporção do ácido alantóico parece não corroborar a sugestão de que, quanto mais baixo o nível ureídico, melhores as condições de atividade da alantoinase. Cumpre salientar que, neste trabalho, o tratamento de nitrato originou menor teor de ureídeos, com ligeiro maior teor de ácido alantóico, em relação ao tratamento com amônia.

Os resultados dos quadros 3 e 7 mostram que o teor de nitrato do xilema aumentou bastante com a aplicação de NO_3^- às raízes das plantas (de acordo com PATE *et al.*, 1980), mas variou pouco com aplicação de NH_4^+ . O teor de amônia, por outro lado, variou pouco com ambos os tratamentos. Esses resultados indicaram a maior transferência do íon NO_3^- suprido as raízes, à parte aérea, em relação ao íon NH_4^+ , possivelmente incorporado em aminoácidos nas raízes para não determinar níveis de toxicidade. PATE *et al.* (1984) relataram que a parte aérea utilizou o N- NO_3^- para sintetizar aminoácidos previamente a transferência de N do xilema ao floe-

ma, não detectando NO_3^- em seiva de xilema ou floema de plantas dependentes de fixação de N_2 . No nosso caso, a detecção do NO_3^- de plantas noduladas no tempo zero, embora em baixo nível (Quadro 3), só pode ser justificada pela presença de traços de NO_3^- na água de torneira usada para regar as plantas.

O teor relativo de ureídeos vem sendo estudado para verificar a viabilidade como indicador da fixação de N_2 . HERRIDGE (1982a) sugeriu a haste de planta de soja como o tecido mais viável para medir a relação N-ureídeo/N-ureídeo+ NO_3^- . PATTERSON & La RUE (1983b), entretanto, relataram que a haste seria um sítio de estocagem de ureídeos, não refletindo sempre um direto relacionamento entre fixação de N_2 e alteração na concentração de ureídeos. PATTERSON & La RUE (1983c) em trabalho subsequente, confirmaram que haste jovem de soja é o melhor tecido para quantificação de ureídeos, sendo um método não destrutivo. BERKUM *et al.* (1985) relataram que N-ureídeo de topo de planta de soja pode ser indicativo, além da fixação de N_2 , da efetividade do *Rhizobium*. PATE *et al.* (1980), por outro lado, relataram que devido à dissimilaridade de fixação e quantidade de ureídeo recuperada pelas partes da planta, além da proporção relativamente pequena de N-total como N- NO_3^- ou N-ureídeo, é preferível usar a seiva de xilema, cuja composição é bem diferente em plantas de soja noduladas ou não, através da relação N-(ureídeo + glutamina)/N-(asparagina + NO_3^-). Ainda PATE *et al.* (1984), utilizando a técnica de coleta de floema de fruto através do puncionamento por agulha resfriada, "cryopunctu-

re^u, verificaram que quase não se alterou o teor de ureídeo do floema de plantas de caupi (de $7,1 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ em planta suprida com NO_3^- para $5,1 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ em planta dependente de fixação de N_2), mesmo quando o teor de ureídeo no xilema alterou bastante (de $8,4 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ em planta dependente de fixação simbiótica para $0,3 \mu\text{mol.ml}^{-1}$ em planta suprida com NO_3^-). Esses dados concordam com a pouca alteração encontrada nos teores de ureídeos em floema (Quadro 11), assim como os de PATE *et al.* (1980), com o pouco decréscimo ureídico em folha, caule e vagem (Quadro 11)), sendo utilizado, portanto, neste trabalho o teor de ureídeo em seiva de xilema. McCLURE *et al.* (1979) e McCLURE *et al.* (1980) também utilizaram a seiva do xilema com as relações N-ureídeo/N-aminoácido e N-ureídeo/N-total. Por outro lado, o teor relativo ureídeo/ureídeo + aminoácido + NO_3^- sofreu distorção na presença de NH_4^+ , indicando não ser bom parâmetro de fixação de N_2 . Como a distorção se deveu ao maior teor de aminoácidos na presença de NH_4^+ , indica-se a precaução quando em face desse problema (Quadro 8).

Quanto à análise qualitativa, verificou-se que o nível de Asp e Gln das plantas dependentes de N_2 atmosférico do quadro 5 em relação ao quadro 10 é maior, sugerindo que, no primeiro caso, na época de coleta da seiva, não havia ocorrido igual amidação do Asp através Gln via asparagina sintetase (LEA & MIFLIN, 1980). De acordo com a hipótese de MIFLIN & LEA (1977), pode-se sugerir que as plantas dependentes de N_2 atmosférico do quadro 5 estariam com menor quantidade de carbono disponível nas raízes. Segundo essa

teoria, a Asn atua como estoque temporário do N reduzido, particularmente sob condições de limitação de C, ocorrendo, pois a diversificação de Gln para Asn, habilitando a planta de prevenir o aparecimento de NH_4^+ tóxico. Assim, quando ocorre carbono suficiente para a síntese de aminoácidos e proteínas, favorecendo a operação GS-GOGAT e formação do Glu, a formação da Asn seria diminuída. Supõe-se ainda que a adição de fonte externa de N, aumentando a quantidade de C nas raízes, favorece a operação GS-GOGAT, a formação de Glu e demais aminoácidos, o que parece confirmado pela maior diversificação de aminoácidos encontrada na seiva de plantas tratadas com N-mineral. Este fato também estaria de acordo com a maior produção de aminoácidos decorrente da adição de N-mineral as raízes, visto diminuir a fixação, processo altamente energético.

Os resultados gerais, no entanto, indicam que ocorreu a manutenção da relação Asn/Gln, de acordo com PATE *et al.* (1980). No quadro 5, verificou-se que em plantas dependentes de fixação de N_2 a porcentagem de Asn aumentou com aplicação de NH_4^+ e NO_3^- enquanto diminuiu a de Gln. No quadro 10, a aplicação de NH_4^+ nas plantas dependentes de N_2 atmosférico diminuiu a porcentagem de Asn e aumentou a de Gln, enquanto a aplicação de NO_3^- diminuiu a de Asn e quase não influenciou na de Gln, aumentando consideravelmente, porém, o Asp. Esses dados sugerem que a Gln e Asn seriam maiores na seiva de planta com adição de NH_4^+ em relação ao NO_3^- , devido ao maior gasto de energia para a rápida incorporação da amônia pela glutamina sintetase, de modo a não ocorrerem ní-

veis tóxicos. Assim, nem toda Gln seria metabolizada em Asn pela falta de suficiente asparagina sintetase (MIFLIN & LEA, 1977), porém ocorreria a falta de C, que induziria a diversificação para Asn. Já na seiva de plantas com NO_3^- , onde menos energia seria gasta para absorção de nitrogênio, ocorreria a formação de Asp via intermediários do ciclo de Krebs (MITCHELL & BIDWELL, 1970), que não seriam totalmente metabolizados a Asn devido à inibição da asparagina sintetase pelo excesso de C.

Conclui-se, portanto, que a diferenciação na formação de aminoácidos (o tratamento NH_4^+ em relação ao NO_3^- originou seiva de xilema com maior teor de glutamina e asparagina e menor de ácido aspártico), seria decorrente dos processos específicos de absorção de nitrogênio.

As altas porcentagens de asparagina encontradas em todas as plantas confirmaram a via glutamina ligada a asparagina (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1980), que foi relatada como a preferencial para a assimilação do NH_4^+ por REYNOLDS *et al.* (1982), corroborado pelo maior teor de asparagina e glutamina em plantas supridas com NH_4^+ .

Os resultados demonstraram, levando-se em consideração apenas as quantidades em termos absolutos de nitrogênio constituído pelos ureídeos e aminoácidos, visto as porcentagens de nitrogênio como NO_3^- e NH_4^+ não terem sido expressivas (média máxima de 10%, Quadros 4 e 9), que plantas dependentes de fixação de N_2 exportaram maior quantidade de nitrogênio pelo xilema, seguidas pelas plantas supridas com NH_4^+ e depois com NO_3^- . Esses dados confirmaram os de RUSCHEL

et al. (1979) que relataram a maior assimilação pelas vagens do $N-N_2$ em relação ao $N-NH_4^+$.

Mesmo plantas noduladas com estirpe de *Rhizobium* ineficiente apresentaram maior transporte de N quando supridas com NH_4^+ em relação a NO_3^- , conforme quadro 6. Por esse mesmo quadro, foi constatada a inibição da nitrogenase em intensidade semelhante pelos íons NO_3^- e NH_4^+ ; fica reforçada, portanto, a sugestão que ocorre a transformação de uma parcela maior do nitrogênio assimilado como NH_4^+ em relação ao NO_3^- , em ureídeos, possibilitando maior transporte de nitrogênio de plantas supridas com NH_4^+ em relação às com NO_3^- .

O suprimento de $N-NH_4^+$ teve um comportamento intermediário entre os dois processos, o de fixação de N_2 e o de suprimento de $N-NO_3^-$ em relação à quantidade de N transportada. Teoricamente, seria preferível utilizar o $N-NH_4^+$ em relação ao $N-NO_3^-$ como fertilizante nitrogenado inicial, isto é, até o estabelecimento da nodulação que permite o processo de fixação de N_2 , pois o NH_4^+ possibilita maior transporte de nitrogênio pelo xilema.

CONCLUSÕES

Os íons nitrato e amônia inibiram a nodulação, atividade da nitrogenase e formação de ureídeos. Embora a atividade da nitrogenase tenha sido igualmente inibida por ambos os íons, a amônia diminuiu menos a formação de nódulos e ureídeos em relação ao nitrato.

Os três processos de assimilação de nitrogênio - fixação de N_2 , absorção de NH_4^+ e absorção de NO_3^- - originaram aminoácidos e ureídeos, sendo a fixação mais voltada para a formação de ureídeos e, a absorção de N-mineral para a formação de aminoácidos. Ocorreu, pois, o aumento de aminoácidos com a aplicação de N-mineral nas plantas noduladas dependentes de N_2 atmosférico, sendo o teor relativo de ureídeos maior para plantas com aplicação de NH_4^+ em relação à de NO_3^- .

A seiva de xilema provou ser melhor fonte para obtenção do teor relativo de ureídeo como índice de fixação de N_2 , do que seiva de floema ou tecido de haste e folha. Por outro lado, o teor relativo ureídeo/ureídeo + aminoácido + NO_3^- sofreu distorção na presença de NH_4^+ , indicando não ser bom parâmetro de fixação de N_2 . Como a distorção se deveu ao maior teor de aminoácidos de plantas supridas com NH_4^+ em relação às com NO_3^- , indica-se a precaução quando em face desse problema.

A maior proporção de ácido alantóico em relação à alantoina aumentou com a exposição da planta a N- mineral, sugerindo a ocorrência de maior atividade da alantoinase no menor teor de ureídeos.

O tratamento NH_4^+ em relação ao NO_3^- originou seiva de xilema com maior teor de glutamina e asparagina e menor de ácido aspártico, sugerindo que a diferenciação na formação de aminoácidos tenha sido decorrente dos processos específicos de absorção de nitrogênio.

O teor de nitrato do xilema aumentou com a aplicação de NO_3^- às raízes, mas variou pouco com a aplicação de NH_4^+ , enquanto o teor de amônia alterou pouco com ambos os tratamentos. Esses resultados indicaram a maior transferência do íon NO_3^- à parte aérea em relação ao íon NH_4^+ .

O transporte de nitrogênio pelo xilema decresceu do processo de fixação de N_2 para o de absorção de NH_4^+ , ao de absorção de NO_3^- , sugerindo que o transporte de nitrogênio tenha dependido da interação entre presença de N-mineral no solo e disponibilidade de energia. A fixação de N_2 , proces-

so mais dispendioso de energia, possibilita maior produção de ureídeos, que exportam mais nitrogênio que os amino-ácidos.

Teoricamente, parece preferível utilizar o N-NH_4^+ em relação ao N-NO_3^- como fertilizante nitrogenado inicial, pois o NH_4^+ possibilita maior transporte de nitrogênio pelo xilema.

RESUMO

Plantas de soja, inoculadas com *Rhizobium japonicum*, foram cultivadas em vermiculita com solução nutritiva sem nitrogênio, em casa de vegetação. Foi estudado o efeito de NO_3^- e NH_4^+ sobre a atividade do nódulo em termos da capacidade de fixação de nitrogênio (redução de acetileno), dos níveis de ureídeos (alantoína e ácido alantóico), aminoácidos (total e qualitativo por analisador de aminoácidos), NO_3^- e NH_4^+ , encontrados na seiva do xilema. Para esse fim, as plantas (noduladas) foram tratadas durante sete dias com soluções nutritivas contendo os íons NO_3^- (15mM), NH_4^+ (10mM), ou sem nitrogênio (controle), aplicadas próximo à época de floração. Verificou-se uma inibição do NO_3^- sobre a nitrogenase (redução de acetileno) e uma diminuição marcante do nível de ureídeos na seiva, mas nenhum efeito significativo no nível dos aminoácidos. O íon NH_4^+ inibiu a nitrogenase com a mesma intensidade que o NO_3^- , mas teve menor efeito sobre o nível de ureídeo. Por outro lado, aumentou substancialmente o nível dos aminoácidos. Apesar disso, a relação ureídeo/aminoácido diminuiu de maneira semelhante na presença desses íons, de forma que este valor se torna suspeito como indicador da fixação de nitrogênio, quando NH_4^+ estiver presente. O tratamento NH_4^+ não alterou o teor de N- NH_4^+ , mas aumentou ligeiramente o nível de glutamina e asparagina em comparação com o tratamento NO_3^- que por sua vez aumentou ligeiramente o ácido aspártico e bastante o teor de N- NO_3^- . A maior proporção de ácido alantóico em relação a alantoína aumentou com a exposição da planta a N-mineral. O íon NH_4^+ teve um comportamento intermediário entre os dois processos, o de fixação de N_2 e

o de absorção de N-NO_3^- em relação à quantidade de N transportado para a parte aérea. Somente traços de ureídeos foram encontrados em plantas noduladas com uma estirpe ineficiente de *Rhizobium*. Neste caso, o tratamento com NH_4^+ aumentou o nível de ureídeos, sugerindo que uma parcela do NH_4^+ é transformada em ureídeos, semelhante ao encontrado pela fixação N_2 . Todavia, o principal efeito do NH_4^+ foi sobre a formação de aminoácidos.

SUMMARY

Soybean plants, inoculated with *Rhizobium japonicum*, were grown in vermiculite with a nitrogen deficient nutrient solution in a greenhouse. The effect of NO_3^- and NH_4^+ on nodule activity was studied in terms of N_2 -fixing capacity (acetylene reduction) and ureide and amino acid levels of the xylem sap. Nodulated plants were treated with nutrient solution containing NO_3^- (15mM), NH_4^+ (10mM), or without nitrogen (control) for 7 days close to flowering. NO_3^- was found to inhibit nitrogenase (acetylene reduction) and strongly reduce the level of ureides, but had not significant effect on the amino acid level. NH_4^+ inhibited nitrogenase at the same level as NO_3^- , but had a lower effect on ureide levels. On the other hand, the amino acid level increased substantially. The relative ureide content fell to low but similar levels for both these ions, such that this value may be suspect as an indicator of N_2 fixation when NH_4^+ is present. NH_4^+ did not alter the levels of N-NH_4^+ , but increased slightly the level of NO_3^- . NO_3^- caused slight increase in aspartic acid and a large increase in NO_3^- . The higher proportion of alantoic acid relative to allantoin was found to be even greater in plants growing on mineral N. The NH_4^+ ion had an intermediary effect on the two N-assimilatory processes with respect to the quantity of N transported to the aerial parts.

Only traces of ureide were in plants nodulated with an inefficient *Rhizobium* strain. In this case, the

treatment with NH_4^+ increased the ureide level, suggesting that some NH_4^+ is transformed in ureides like that resulting from N_2 fixation. However, the major effect of NH_4^+ was on amino acid levels.

ABREVIATURAS

α CG	- α cetoglutarato
GS	- sintetase de glutamina
GOGAT	- sintase de glutamato
GDH	- desidrogenase glutâmica
Gln	- glutamina
Glu	- ácido glutâmico
Asn	- asparagina
Asp	- ácido aspártico
Ser	- serina
Gly	- glicina
Thr	- treonina
Ala	- alanina
Val	- valina
Ile	- isoleucina
Lys	- lisina
His	- histidina
ATP	- trifosfato de adenosina
GTP	- trifosfato de guanosina
NAD	- dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

BIBLIOGRAFIA

- ALLISON, F.E. & LUDWIG, C.A. 1936. The cause of decreased nodule formation on legumes supplied with abundant combined nitrogen. Soil Sci., 37:431-443.
- ATHAYDE, J.T.; FRANCO, A.A. & DESSAUNE, N.F. 1984. Macro e micronutriente na fixação simbiótica do N₂ em feijoeiro. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12, Campinas. Resumos. Campinas, Fundação Cargill. p. 138.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; GRIFFITHS, G.J. & WHITE, S.T. 1980. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO₃-grown) cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.). Plant Physiol., 66:978-983.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; RITCHIE, A. & PEOPLES, M.B. 1982. Metabolism and translocation of allantoin in ureide producing grain legumes. Plant Physiol., 70:476-482.
- ATKINS, C.A.; SHELP, B.J.; KUO, J.; PEOPLES, M.B. & PATE, J. S. 1984a. Nitrogen nutrition and the development and senescence of nodules on cowpea seedlings. Planta, 162: 316-326.
- ATKINS, C.A.; SHELP, B.J.; STORER, P.J. & PATE, J.S. 1984b. Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. Planta, 162: 327-333.

- BEEVERS, L. 1976. Nitrogen nutrition. In: BEEVERS, L. Nitrogen metabolism in plants. London, Edward Arnold Publ's. p.1-14.
- BERKUM, P.V.; SLOGER, C.S.; WEBER, D.F.; GREGAN, P.B. & KEYSER, H.H. 1985. Relationship between ureide N and N_2 fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* L. (Merr.). Plant Physiol., 77:53-58.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. 1978. Interactions between symbiotic nitrogen fixation, combined-N application, and photosynthesis in *Pisum sativum*. Physiol. Plant, 42:119-123.
- BOLLARD, E.G. 1960. Transport in the xylem. Ann. Rev. of Plant Physiol., 11:141-166.
- BRILL, W.J. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. Microbiological Reviews, 44:449-467.
- CAMARGO, P.N. 1970. Absorção foliar de macro e micronutrientes. In: CAMARGO, P.N. Princípios de nutrição foliar. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres Ltda. p. 59-71.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHADER, L.E. & YOUNGS, U.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. and Plant Anal., 6:71-80.
- COKER, G.T. & SCHUBERT, K.R.S. 1981. Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules. I. Characterization and comparison with N_2 fixation and composition of xylem exudate during early nodule development. Plant Physiol., 67:691-696.

- COTTINGHAM, D.G.H. & JONES, L.C.P. 1980. The influence of nitrate supply on nitrogen fixation during growth of the field bean *Vicia Faba* in sand. *Physiol. Plant*, 48: 116 - 120.
- CRAFTS-BRANDNER, S.J. & HARPER, J.E. 1982. Nitrate reduction by roots of soybean (*Glycine max* L. Merr.) seedlings. *Plant Physiol.*, 69:1298-1303.
- DAZZO, F.B. & BRILL, W.J. 1978. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium* clover symbiosis. *Plant Physiol.*, 62:18-21.
- DUKE, S.H.; SCHRADER, L.E.; HENSON, L.A.; SERVAITES, J.C.; VOGELZANG, R.D. & PENDLETON, J.W. 1979. Low root temperature effects on soybean nitrogen metabolism and photosynthesis. *Plant Physiol.*, 63:956-962.
- FELLOWS, R.J.; EGLI, D.B. & LEGGET, J.E. 1978. A pod leakage technique for phloem translocation studies in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Physiol.*, 62: 812-814.
- FINKE, R.L.; HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. 1982. Efficiency of nitrogen assimilation by N_2 -fixing and nitrate-grown soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Physiol.*, 70:1178-1184.
- FUJIHARA, S.; YAMAMOTO, K.; YAMAGUCHI, M. 1977. Possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant and Soil*, 48:233 - 242.

- FUJIIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. 1978. Probable site of allantoin formation in nodulating soybean plants. Phytochemistry, 17:1239-1243.
- FUJIIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. 1980. Asparagina formation in soybeans nodules. Plant Physiol., 66:139-141
- FUJIIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. 1981. Assimilation of $^{15}\text{NH}_3$ by root nodules detached from soybean plants. Plant & Cell Physiol., 22:797-806.
- GATES, C.T. & MÜLLER, W.J. 1979. Nodule and plant development in the soybean, *Glycine max* (L.) Merr.: growth response to nitrogen, phosphorus and sulfur. Aust. J. Bot., 27: 203-215.
- GEORGI, C.E. & BEGUIN, A.E. 1939. Heteroanscin production by efficient and innefficient strains of *Rhizobía*. Nature, 143:25.
- GIBSON, A.H.; PAGAN, J.D. 1977. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase-deficient mutants of *Rhizobium*. Planta, 134:17-22.
- GOMES, F.P. 1977. Curso de estatística experimental. 7ed. In: GOMES, F. P. São Paulo, Livraria Nobel S.A., p. 1-78 e 168-196.
- GOMES, M.A. 1982. Metabolismo de ureídeos e asparagina durante a ontogenia do fruto de plantas de soja noduladas. Campinas, UNICAMP, 1982. Tese (Mestr.) Instituto de Biologia.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C.

1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol., 43:1185 - 1207.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. 1973. Symbiotic N_2 -fixation: multi-fold enhancement by CO_2 enrichment of field grown soybean. Plant Physiol., 51. Abstracts 190.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HERBERT, R.R.; HOLSTEN, R.D. & JACKSON, E.K. 1980. Nitrogen input with emphasis on N fixation in soybeans. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 2: Proceedings. CORBIN, F.T., ed. West-view Press, Boulder, Colorado, p. 57-72.
- HAYNES, R.J. & GOH, K.M. 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plant. Biol. Rev., 53:465-510.
- HEICHEL, G.H. & VANCE, C.P. 1979. Nitrate-N and rhizobium strain roles in alfalfa seedlings nodulation and growth. Crop. Sci., 19:512-518.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & RAINBIRD, R. R. . 1978. Allantoin and allantoinic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Plant Physiol., 62:495-498.
- HERRIDGE, D.F. 1982a. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. Plant Physiol., 70: 1-6.
- HERRIDGE, D.F. 1982b. Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of field-grown soybeans. Plant Physiol., 70:7-11.

- HEWITT, E.J. 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Ann. Rev. Plant Physiol., 26:73-100.
- KEFFORD, N.P.; BROCKWELL, J. & ZWAR, J.A. 1960. The symbiotic synthesis of auxin by legumes and nodule bacteria and its role in nodule development. Aust. J. of Biol. Sci. , 13:456-467.
- LAYZELL, D.B. & LaRUE, T.A. 1982. Modeling C and N transport to developing soybean fruits. Plant Physiol., 70: 1290-1298.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. The Biochemistry of Plants, 5:569-607.
- LEHNINGER, A.L. 1976. Aminoácidos. In: BLUCHER, E. ed. Bioquímica. 2.ªed. São Paulo, 1976. v.1, p.60.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; KIIHL, E. & IGUE, T. 1976. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Bragantia, Campinas, 35:1-12.
- MACEDO, E.C.; GARCIA BLANCO, H.; CHIBA, S. & LOPES, E.S. 1986. Efeito do herbicida trifluralin na interação simbiótica *Rhizobium*/soja. Anais da REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE Rhizobium, 12. Campinas, Instituto Agronômico, 1986. p. 572.
- MANHART, J.R. & WONG, P.P. 1980. Nitrate effect on nitrogen fixation (acetylene reduction)-Activities of legume root nodules induced by rhizobia with varied nitrate reductase activities. Plant Physiol. , 65:502.505.

- MARCUS-WYNER, L. & RAINS, D.W. 1982. Simultaneous measurement of NH_4^+ -absorption and N_2 -fixation by *Glycine max* L.: Response to temperature, pH, and external nitrogen concentration. Plant Physiol., 69:460-464.
- MARCUS-WYNER, L. & RAINS, D.W. 1983. Patterns of ammonium absorption and acetylene reduction during soybean development growth. Plant Physiol., 59:79-82.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, R. 1977a. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. Plant & Cell Physiol., 18:459-462.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, R. 1977b. Effects of oxigenous nitrogen compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organ of soybean plants. Plant & Cell Physiol., 18:613-624.
- McCLURE, P.R. & ISRAEL, D.W. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. Plant Physiol., 64:411-416.
- McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. & VOLK, R.J. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N_2 fixation in soybeans. Plant Physiol., 66:720 - 725.
- McCLULLOUGH, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood, by a direct colorimetric method. Nitrogen determination-Berthelot. Clin. Chim. Acta, 17:297-304.
- MEEKS, J.C.; WOLK, C.P.; SCHILLING, N.S.; SHAFFER, P.W.; AVISSAR, Y. & CHIEN, W.S. 1978. Initial organic products of fixation of (^{13}N) dinitrogen by root nodules of soybean

- (*Glycine max*). Plant Physiol., 61:980-983.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1977. Amino acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 28:299-329.
- MITCHELL, D.J. & BIDWELL, R.C. 1970. Comportaments of organic acids in the synthesis of asparagine and homoserine in pea roots. Can. J. Bot., 48:2001-2007.
- MIYASAKA, S. 1977. I - Generalidades. In: MIYASAKA, S. A soja no Brasil Central. Campinas, Fundação Cargill, 1977. p.1-21.
- MUNNS, D.N. 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture: III Effects of nitrate on root hairs and infection. Plant and Soil, 29:33-47.
- NOEL, K.D.; CARNEOL, M. & BRILL, W.J. 1982. Nodule protein synthesis and nitrogenase activity of soybeans exposed to fixed nitrogen. Plant Physiol., 70:1236-1241
- OHYAMA, T. & KUMAZAWA, K. 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from $^{15}\text{N}_2$ fixation and $^{15}\text{NO}_3^-$ absorption. Soil Sci. Plant Nutr., 25:9-19.
- PATE, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous soluter. Ann. Rev. Plant Physiol., 31:313-340.
- PATE, J.S.; ATKINS, C.A.; WHITE, S.T.; RAINBIRD, R.M. & WOO, K.C. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. Plant Physiol., 65:961-965.
- PATE, J.S.; PEOPLES, M.B. & ATKINS, C.A. 1984. Spontaneous phloem bleeding from cryopunctured fruits of a ureide-pro-

- ducing legume. Plant Physiol., 74:499-505.
- PATTERSON, T.G. & La RUE, T.A. 1983a. Nitrogen fixation (C_2H_2) by soybeans: seasonal and cultivar effects, and comparison of estimates. Crop. Sci., 23:487-492.
- PATTERSON, T.G. & La RUE, T.A. 1983b. N_2 fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans: environment effects and source-sink manipulations. Crop. Sci., 23:819-824.
- PATTERSON, T.G. & La RUE, T.A. 1983c. N_2 fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans: ureides as an index of fixation. Crop. Sci., 23:825-831.
- PEIXOTO, R.T.G.; ALMEIDA, D.L. & FRANCO, A.A. 1986. Efeito do composto de lixo urbano enriquecido com fosfato natural na nodulação e crescimento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em latossolo ácido. Anais da REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE Rhizobium, 12. Campinas, Instituto Agrônomo, 1986. p. 250-256.
- PERKIN-ELMER, 1969. Instruction manual for the model KLA-3D. Amino Acid Analyser. N-6055E-2. Japan, Ed. Hitachi Ltda. 193p.
- PERKIN-ELMER, 1971. Instruction manual for ligand exchange chromatography, USA, nº 6499-E, 70p.
- PHILLIPS, D.A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol., 31:29-49.
- PIANTANIDA, N.A.; BASURCO, J.C.P.; BRUTTI, L.N. & DIÉGUEZ, R.N. 1986. Compatibilidad de un inoculante granulado y el fungicida captan aplicado a semilla de *Medicago sativa*.

Anais de REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12.
Campinas, Instituto Agronômico, 1986. p. 335-339.

PORTO, M.P. 1983. Melhoramento para óleo e proteína. In:
VERNETTI, F.J. Soja: genética e melhoramento. Campinas,
Fundação Cargill, 1983. v.2, p.801-832.

PURITCH, G.S. & BANKER, A.V. 1967. Structure and function
of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. Plant
Physiol., 42:1229-1238.

RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. 1983a. Significan-
ce of hydrogen evolution in the carbon and nitrogen econo-
my of nodulated cowpea. Plant Physiol., 71:122-127.

RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. 1983b. Diurnal
variation in the functioning of cowpea nodules. Plant
Physiol., 72:308-312.

RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. 1983c. Effect of
temperature on nitrogenase functioning in cowpea nodules.
Plant Physiol., 72:392-394.

RAGGIO, M.; RAGGIO, N.; TORREY, J.G. 1965. The interaction
of nitrate and carbohydrates in rhizobial root nodule for-
mation. Plant Physiol., 40:601-605.

RENA, A.B. & MASCIOTTI, G.Z. 1976. The effect of dehydra -
tion on nitrogen metabolism and growth of 4 bean cultivars
(*Phaseolus vulgaris* L.). Revista Ceres, Viçosa, 23:288 -
301.

- REYNOLDS, P.H.S.; BOLAND, M.J.; BLEVINS, D.G.; SCHUBERT, K.R. & RANDALL, D.D. 1982. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. Plant Physiol., 69:1334-1338.
- ROSENDAHL, L. 1984. Rhizobium strain effects on yield and bleeding sap amino compounds in *Pisum sativum*. Physiol. Plant., 60:215-220.
- RUSCHEL, A.P. 1979a. Fixação biológica de nitrogênio. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal. São Paulo, EPU:Universidade de São Paulo. v.1. p.167-207.
- RUSCHELL, A.P.; VOSE, P.B.; VICTORIA, R.L. & SALATI, E. 1979b. Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization of dinitrogen fixation in soybean, *Glycine max*. Plant and Soil, 53:513-525.
- RUEDELL, J. 1983. Controle de plantas daninhas em soja. In: VERNETTI, F.J. Soja - Planta, Clima, Pragas, Moléstias e Invasores. Campinas, Fundação Cargill, 1983. p.129-180.
- SÁ, N.M.H.; SCOTTI, M.R.M.M.L.; PEDERSOLI, J.L.; VARGAS, M. A.T. & DOBEREINER. 1986. Efeito do pH na nodulação de variedades de *Stylosanthes* com estirpes de *Rhizobium* sp nativas em solos de cerrados. Anais da REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE Rhizobium, 12. Campinas, Instituto Agrônomo, 1986. p. 69-78.
- SCHUBERT, K.R. 1981. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*. I. Comparison of activities with N₂ fixation and composition of xylem exudate during

nodule development. Plant Physiol., 68:1115-1122.

SCHWEITZER, L.E. & HARPER, J.E. 1980. Effect of light, dark and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybeans. Plant Physiol., 65:51-56.

SHANMUGAM, K.T.; GARA, F.O.; ANDERSEN, K. & VALENTINE, R. 1978. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Plant Physiol., 29:263-276.

SHELP, B.J. & IRELAND, R.J. 1985. Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean plants. Plant Physiol., 77: 779-783.

SHELP, B.J.; ATKINS, C.A.; STORER, P.J. & CANVIN, D.T. 1983. Cellular and subcellular organization of pathways of ammonium assimilation and ureide synthesis in nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Arch. of. Biochem. and Biophys., 224-429-441.

SICHMANN, W. 1977. A cultura da soja. In: MIYASAKA, S. A soja no Brasil. Campinas, Fundação Cargill. p.219-240.

SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. 1980. Historical background. In: SMITH, A.K. Soybeans: chemistry & technology. Connecticut, AVI Publishing Company, Westport. 2^{ed}. p.1-26.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Anal. Chem., 30:1190-1206.

SPRENT, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. Plant Cell Environ., 3:35-43

- STREETER, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. Plant Physiol., 63:478-480.
- STREETER, J.G. 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. Plant Physiol., 69:1429-1434.
- STREETER, J.G. 1985a. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. Plant Physiol., 77:321-324.
- STREETER, J.G. 1985b. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. II. Short term studies with high nitrate supply. Plant Physiol., 77:325-328.
- TANNER, J.W. & ANDERSON, I.C. 1964. External effect of combined nitrogen on nodulation. Plant Physiol., 39:1039 - 1043.
- THOMAS, R.J.; FELLER, U. & ERISMANN, K.H. 1979. The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. New Phytol., 82:657-669
- THOMAS, R.J.; FELLER, U. & ERISMANN, K.H. 1980. Ureide metabolism in Non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. J. of Exp. Bot., 31:409-417.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. 1981a. The assimilation of ureides in shoot tissues of soybeans. Plant Physiol., 67:973-976.

- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. 1981b. Ureide metabolism in higher plants. Phytochemistry, 20:361-371.
- THOMAS, R.J.; JOKINER, K. & SCHRADER, L.E. 1983. Effect of *Rhizobium japonicum* mutants with enhanced N₂ fixation activity on N transport and photosynthesis of soybeans during vegetative growth. Crop. Sci., 23:453-456.
- TRANG, K.M. & GIDDENS, J. 1980. Shading and temperature as environment factors affecting groth, nodulation, and symbiotic N₂ fixation by soybeans. Agron.J., 72:305-308.
- TRIJBELS, F. & VOGELS, G.D. 1966. Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. Biochim. Biophys. Acta, 113: 292-301.
- WARNER, R.L. & KLEINHOF, A. 1981. Nitrate utilization by nitrate reductase-deficient barley mutants. Plant Physiol., 67:740-743.
- WILSON, P.W. & FRED, E.B. 1939. The carbohydrate-nitrogen relation in legume symbiosis. J. Amer. Soc. Agron., 31: 497-502.
- WYCH, R.D. & RAINS, D.W. 1979. Nitrate absorption and acetylene reduction by soybeans during reproductive development. Physiol. Plant, 47:200-204.
- WONG, P.P. 1980a. Nitrate and carbohydrate effects on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) activity of lentil (*Lens esculenta* Moench). Plant Physiol., 66:78-81.

- WONG, P.P. & STENBERG, N.E. 1980. Effects of directly and indirectly applied nitrate on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) activity of soybeans. Plant Physiol., 65, 6 suppl. Abstracts 594.
- WOO, K.C.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. 1980. Biosynthesis of ureides from purines in a cell-free system from nodule extracts of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Plant Physiol., 66:735-739
- YEMM, E.W. & COCKING, E.C. 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. Analyst, 80:209-213.
- YONEYAMA, T. & ISHIZUKA, J. 1982. ^{15}N study on the partitioning of the nitrogen taken by soybeans from atmospheric dinitrogen, medium nitrate or ammonium. Soil Sci. Plant Nutr., 28:451-461.
- YOUNG, E.G. & CONWAY, C.F. 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. J. Biol. Chem., 142:839-853.
- ZENGBE, M.; TILLARD, P.; CLEYET-MAREL, J.C. & SALSAC, L. 1984. Influence de la souche de *Rhizobium* et de l'azote minéral sur la synthèse des uréides chez le soja. Physiol. Vég., 22:285-294,