

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



FLÁVIA ANTUNES

**PAPEL DA REDUTASE DO NITRATO E DA
ASPARAGINA SINTETASE EM PLANTAS DE SOJA
(*Glycine max* L.) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE
DE NITROGÊNIO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Flávia Antunes
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

2007

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

An89p

Antunes, Flávia

Papel da redutase do nitrato e da asparagina em plantas de soja (*Glycine max* L.) sob condições de estresse de nitrogênio / Flávia Antunes. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Ladaslav Sodek.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nitrato redutases. 2. Asparagina. 3. Soja. 4. Nitrogênio - Metabolismo. 5. Xilema. I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: The role of nitrate reductase and asparagine synthetase in soybean (*Glycine max* L.) under nitrogen stress.

Palavras-chave em inglês: Nitrate reductases; Asparagina; Soybean; Nitrogen - Metabolism; Xylem.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Ladaslav Sodek, Juliana Domingues Lima, Marcelo Carnier Dornelas, Marlene Aparecida Schiavinato, Ricardo Antunes de Azevedo.

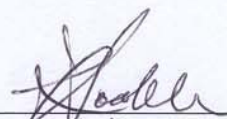
Data da defesa: 30/01/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 30 de janeiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Juliana Domigues Lima


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas


Assinatura

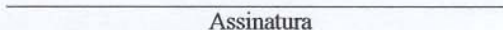
Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato


Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo


Assinatura


Profa. Dra. Ana Maria Andrade Magalhães Lagoa


Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad


Assinatura

Profa. Dra. Eduardo Caruso Machado


Assinatura

Aos meus pais Ivan e Leda,
a mais profunda gratidão.

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Ladaslav Sodek, pela valiosa orientação, amizade e confiança dedicadas a mim, permitindo o bom desempenho deste trabalho.

Aos professores Manuel Pineda e Miguel Aguilar, pela colaboração no trabalho e por terem me recebido e orientado com tanto carinho e atenção durante o estágio na Espanha.

Aos professores Cláudia Haddad, Marcelo Dornelas e Marlene Schiavinato, por todas as críticas e sugestões feitas a este trabalho e pelo carinho.

Aos professores Cláudia Haddad, Juliana Lima, Marcelo Dornelas e Ricardo Azevedo, por participarem da banca examinadora.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos e pelo agradável convívio.

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

A todos os colegas e amigos, pela ajuda, amizade e por tornarem os meus dias mais agradáveis e divertidos.

À minha família, em especial aos meus pais Ivan e Leda, pelo amor incondicional, pela educação, pelo incentivo e por todos os esforços para que nada me faltasse.

A Deus, pela minha existência repleta de conquistas.

ÍNDICE

Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiv
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão de Literatura	5
4. Material e Métodos	9
4.1. Material vegetal e Condições de Cultivo	9
4.2. Soluções nutritivas	9
4.3. Tratamentos	10
4.4. Delineamento experimental	11
4.5. Métodos analíticos	11
4.5.1. Coleta da seiva do xilema	11
4.5.2. Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	11
4.5.3. Redutase do nitrato (RN)	15
4.5.3.1. Extração e dosagem da enzima RN <i>in vitro</i>	15
4.5.3.2. Extração e dosagem da enzima RN <i>in vivo</i>	15
4.5.3.3. Dosagem de nitrito	16
4.5.4. Asparagina sintetase (AS)	17
4.5.4.1. Métodos de extração e preparação	17
4.5.4.2. Ensaio enzimático	17

4.5.4.3. Método de quantificação dos produtos	18
4.6. Análises moleculares.....	18
4.6.1. Soluções.....	18
4.6.1.1. Solução de carga para eletroforese.....	18
4.6.1.2. Soluções para purificação do DNA plasmidial	18
4.6.1.3. Soluções para hibridização de RNA	19
4.6.2. Tampões.....	19
4.6.3. Meio de cultivo para bactérias	21
4.6.4. Gel de agarose	21
4.6.5. Extração de RNA.....	22
4.6.6. Síntese de cDNA	23
4.6.7. Desenho dos primers.....	23
4.6.8. Obtenção dos fragmentos de interesse	24
4.6.9. Concentração das amostras de ácidos nucleicos por precipitação	24
4.6.10. Inserção dos fragmentos no vetor	25
4.6.11. Condições de crescimento das bactérias	26
4.6.11.1. Estirpes bacterianas	26
4.6.11.2. Cultivos de <i>E. coli</i>	26
4.6.11.3. Conservação das bactérias	26
4.6.12. Preparação de células competentes.....	26
4.6.13. Transformação de células de <i>E. coli</i>	27
4.6.14. Extração e purificação de DNA plasmidial.....	27
4.6.15. Marcação das sondas.....	28
4.6.15.1. Sonda não radioativa.....	28
4.6.15.2. Sonda radioativa.....	29

4.6.16. <i>Southern Blot</i>	29
4.6.17. <i>Northern Blot</i>	31
5. Resultados	33
5.1. Efeito da deficiência de nitrogênio (N) sobre atividade da redutase do nitrato (RN) em plantas de soja	33
5.1.1. Estudo da atividade da RN em raízes de plantas de soja durante seu desenvolvimento.....	33
5.1.2. Atividade da RN em plantas de soja não-noduladas	37
5.1.3. Atividade da RN em plantas de soja noduladas.	41
5.1.4. Composição dos aminoácidos na seiva do xilema de plantas de soja não-noduladas sob a deficiência de nitrogênio e em plantas de soja noduladas transferidas para hidroponia com nitrato	47
5.2. Efeito da deficiência do N sobre a expressão gênica da asparagina sintetase (AS) em plantas de soja	51
5.2.1. Efeito da deficiência do N sobre a expressão gênica da AS e a composição da seiva do xilema de plantas de soja não-noduladas	58
5.2.2. Efeito da deficiência do N sobre a expressão gênica da AS e a composição da seiva do xilema de plantas de soja noduladas.....	62
5.2.3. Efeito do nitrato na expressão gênica da AS em plantas de soja noduladas	68
6. Discussão	70
7. Conclusões	80
5. Referências Bibliográficas	82

ABREVIATURAS

AMP	adenosina 5'-monofosfato
AS	asparagina sintetase
ASNase	asparaginase
ATP	adenosina trifosfato
BrEt	brometo de etídeo
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPS	desoxirribonucleotídeos
DO	densidade óptica
DEPC	dietilpirocarbonato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamina treta acético
FAD	flavina adenosina dinucleotídeo
GOGAT	glutamina-2-oxoglutarato amida transferase
GS	glutamina sintetase
HAc	ácido acético
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
H+N / H-N	hidroponia com nitrogênio / hidroponia sem nitrogênio
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	meio de cultura Luria-Bertani
MF	matéria fresca

MOPS	ácido 3-(N-morpholino) propanosulfônico
NAD ⁺	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, oxidada
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzida
NaOAc	acetato de sódio
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OPA	orto-ftaldialdeído
PCR	reação em cadeia da polimerase
PPi	pirofosfato
PVP 360	polivil pirrolidona
R-N	replanteio em vermiculita sem nitrogênio
RN	redutase do nitrato
RNA	ácido ribonucléico
SAS1/2/3	genes que codificam a asparagina sintetase em soja
SDS	sódio dodecil sulfato
SSC	citrato de sódio salino
TAE	tris-acetato-EDTA
Tris	tris[hidroximetil]aminometano
V+N / V-N	vermiculita mais nitrogênio / vermiculita sem nitrogênio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo

RESUMO

O sistema radicular da soja (*Glycine max* L.) é um importante sítio da assimilação do nitrogênio (N), seja pela assimilação do nitrato nas raízes, seja pela fixação simbiótica de N atmosférico nos nódulos. Os principais produtos da assimilação do N inorgânico, os aminoácidos asparagina e glutamina, os ureídeos, a alantoína e o ácido alantóico, são usados no transporte de N para a parte aérea. Assim, esses produtos representam uma fonte de N reduzido tanto para os sítios de consumo, quanto para a formação de outros aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e dos demais compostos nitrogenados sintetizados na célula. O transporte do N assimilado no sistema radicular para a parte aérea é realizado exclusivamente via xilema. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi, relacionar mudanças na composição de aminoácidos transportados no xilema de plantas de soja, provocadas pela deficiência de N, com o comportamento de enzimas de assimilação do N, encontradas no sistema radicular. Para causar a deficiência do N, as plantas de soja foram transferidas para um meio hidropônico sem nitrato ou qualquer outra fonte de N inorgânico. Nas plantas não-noduladas a deficiência se deu pela ausência do nitrato no meio de cultivo, e nas plantas noduladas, a manutenção em hidroponia inibiu a fixação do N₂. Foi observado um aumento na razão aspartato/asparagina (ASP/ ASN) na seiva do xilema das plantas não-noduladas e noduladas, quando foram submetidas à deficiência do N. Contudo, nas plantas noduladas esse aumento foi acentuado apenas no primeiro dia do tratamento. A recuperação do estresse só ocorreu em plantas não-noduladas, nas quais as concentrações de ASP e ASN retomaram seus valores. As análises da expressão dos genes que codificam a asparagina sintetase (AS) no sistema radicular das plantas de soja, durante o

tratamento e recuperação do estresse de N, indicam que essa enzima está relacionada com as alterações na razão ASP/ASN. A AS é a enzima que catalisa a biossíntese da ASN, transferindo o grupo amino da glutamina para o aspartato, produzindo asparagina e glutamato. A queda no suprimento de N, seja pelo impedimento da assimilação do nitrato ou da fixação do N₂, leva à uma diminuição dos níveis de glutamina, produto imediato da assimilação do íon amônio através da enzima glutamina sintetase (GS). Com a redução dos níveis de glutamina a atividade da AS também é reduzida, resultando na menor utilização de ASP. Em plantas não-noduladas, após transferência para o meio hidropônico sem nitrato, a expressão dos três genes para AS diminuiu bruscamente, e após o retorno das plantas ao meio com nitrato, os genes da AS foram expressos novamente. Nas plantas noduladas a expressão gênica da AS também reduziu durante o tratamento de deficiência de N, porém, apenas o gene SAS1 parece ter sido afetado. O gene SAS1 não recuperou seus níveis de expressão durante a tentativa de recuperação do estresse. Este fato é mais uma evidência da relação da AS com as alterações no perfil de aminoácidos transportados na seiva do xilema, pois as concentrações de ASN e ASP na seiva do xilema também não foram retomadas.

Devido à importância da enzima redutase do nitrato (RN) no processo de assimilação do nitrato pelo sistema radicular, foi avaliado o seu comportamento durante o tratamento de deficiência do nitrato e sua recuperação. A atividade da RN aumentou, consideravelmente, quando as plantas foram expostas ao nitrato. Esse aumento pôde ser observado em raízes de plantas de soja não-noduladas e também no sistema radicular (raízes e nódulos) das plantas noduladas. Quando as plantas não-noduladas foram transferidas para uma solução sem nitrato, a atividade da RN caiu, apresentando valores muito baixos dentro de 24 horas. As atividades da RN

nas raízes e nódulos de plantas de soja, cultivadas na ausência do nitrato, foram muito baixas, sendo que em nódulos a atividade sempre foi ligeiramente maior que nas raízes. A baixa atividade encontrada nas raízes e nódulos de soja pode representar a forma constitutiva da enzima, pois as plantas foram cultivadas sem a adição do nitrato durante o ciclo todo. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da presença de traços de nitrato na água usada para regar as plantas e isto ter sido suficiente para induzir a baixa atividade encontrada. Se por um lado podem existir dúvidas quanto ao fato da enzima ser constitutiva, a indução da enzima pelo substrato (NO_3^-) parece bastante clara. De qualquer forma, a forte dependência da RN da presença do nitrato é um dado inédito para raízes de plantas de soja. O nitrato também afetou a expressão gênica da AS nas raízes de plantas noduladas, cultivadas sem nenhuma fonte de N mineral. A expressão dos genes da AS aumentou quando essas plantas receberam solução contendo nitrato.

Os dados sobre o comportamento das enzimas avaliadas aqui indicam que as alterações em aminoácidos transportados no xilema, em plantas de soja submetidas à deficiência de N, estão relacionadas com os processos assimilatórios do sistema radicular, e que a AS parece ser a principal responsável pelas alterações na razão ASP/ASN.

SUMMARY

The root system of soybean (*Glycine max* L.) is an important site for the assimilation of nitrogen, whether by nitrate assimilation in the roots, or by symbiotic nitrogen fixation in the nodules. The main products of inorganic nitrogen assimilation, the amino acids asparagine and glutamine and the ureides allantoin and allantoic acid, are used in the transport of assimilated nitrogen to the shoot. Thereby, these products represent a source of reduced nitrogen for the sink tissues, for the formation of other amino acids, proteins, nucleic acids and all the other nitrogenous compounds synthesized in the cell. Therefore, the objective of this study was to relate changes in the transport of nitrogen in the xylem of soybean caused by nitrogen deficiency with the behaviour of certain enzymes of nitrogen assimilation in the root system. Nitrogen deficiency was induced by the transfer of soybean plants to a hydroponic system without nitrate or any other source of inorganic nitrogen. In the case of non-nodulated plants deficiency was imposed by the interruption of nitrate assimilation by the roots, and for the nodulated plants nitrogen fixation was inhibited by immersion of the nodules in the hydroponic system. Under nitrogen deficiency, an increase in the aspartate/asparagine (ASP/ASN) ratio of the xylem sap was observed in both nodulated and non-nodulated plants. Nevertheless, this increase was substantial only on the first day of treatment. The recovery from the stress was only observed for the non-nodulated plants, where the levels of ASP and ASN returned to their initial values. Analyses of asparagine synthetase expression in the root system of soybean during treatment and recovery from nitrogen stress indicates that this enzyme can underlay the changes in ASP/ASN ratios. AS is an enzyme that catalyses the biosynthesis of Asn, by transferring the amide nitrogen from glutamine to aspartate,

producing asparagine and glutamate. The fall in N supply, whether by interruption of nitrate assimilation or nitrogen fixation, leads to a decline in glutamine, the immediate product of ammonium ion assimilation via glutamine synthetase. With the reduction in glutamine levels the activity of AS is also reduced resulting in diminished utilization of ASP. In non-nodulated plants, after the transfer to the hydroponic system without nitrate, the expression of the three genes declines sharply, and after the return of the plants to a supply of nitrate the AS genes are expression again. In nodulated plants the expression of AS was also reduced during treatment, however, in this case only the gene SAS1 was affected. The SAS1 gene did not recover its initial levels of expression after removing the stress which is further evidence for the correlation between AS activity and the changes in ASP/ASN ratios in the xylem sap, since these ratios were also not recovered.

In view of the importance of nitrate reductase (NR) in the process of nitrate assimilation by the root system, its behaviour was evaluated during nitrate deficiency and recovery. The activity of NR increased considerably when plants were supplied with nitrate, in the case of roots of non-nodulated as well as the root system (roots and nodules) of nodulated plants. When non-nodulated plants were transferred to a nutrient solution free of nitrate, NR activity fell sharply, almost disappearing within 24 hours. RN activities in roots and nodules of soybean grown in the absence of nitrate were very low, with activity in the nodules being somewhat higher than in the roots. The low activity found in the roots and nodules could be due to a constitutive enzyme since plants were grown throughout with nitrate-free medium. However, the possible presence of trace amounts of nitrate in the tap water used to irrigate the plants cannot be discarded and may have been sufficient to induce the low levels of enzyme found. If on the one hand there are doubts as to the presence of a constitutive enzyme, the

presence of the induced form is very clear. In any case, the strong dependence of NR on the presence of nitrate is an unknown fact for soybean roots. Nitrate also affected the expression of AS in roots of nodulated plants grown without any mineral source of nitrogen, since its expression increased tremendously when such plants were supplied with nitrate.

The data concerning the behaviour of the enzymes studied here indicate that alterations in xylem amino acids of soybean plants subjected to nitrogen deficiency are related to the assimilatory processes of the root system, and that AS appears to be mainly responsible for the changes in ASP/ASN ratios.

1. INTRODUÇÃO

A soja tem grande importância econômica no Brasil. O país é um dos maiores produtores dessa leguminosa no mundo, tendo produzido aproximadamente 53 milhões de toneladas na safra 2004-2005 (Abiove, 2005). O cultivo de soja requer grandes quantidades de nitrogênio: em média são necessários 80 kg de nitrogênio (N) para produzir 1000 kg de grãos (Hungria *et al.*, 2001). No entanto, as leguminosas como a soja geram grande interesse agrônomo e econômico pelo fato de poderem ser cultivadas sem adubação nitrogenada. Isto ocorre em função da associação simbiótica entre bactérias do solo e as leguminosas, que formam estruturas nas raízes chamadas de nódulos. Esta associação permite à planta utilizar, ao invés do N mineral, o N do ar. O processo de fixação de N permite uma alta produtividade de soja sem a aplicação de adubos nitrogenados no solo, resultando na economia brasileira de bilhões de dólares por safra em fertilizantes (Dobereiner, 1997).

O metabolismo de N é um importante processo em plantas. É através dele que o N é assimilado e reduzido até ser incorporado em esqueletos carbônicos, como as proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais da célula. As principais enzimas envolvidas no processo de incorporação do N nas plantas são: redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS), glutamina-2-oxoglutarato amida transferase (GOGAT), asparagina sintetase (AS) e aspartato aminotransferase (AspAT).

A reação de fixação do N caracteriza-se pela redução do N_2 à amônia (NH_3), pela enzima nitrogenase expressa pelo bacterióide do nódulo. A NH_3 em contato com

o substrato aquoso, é convertida rapidamente em íon amônio (NH_4^+) (Vance & Gantt, 1992; Burris & Roberts, 1993).

Na maioria das plantas que não fazem associação simbiótica, a absorção do N do solo é na forma de nitrato (NO_3^-). O NO_3^- é reduzido a nitrito (NO_2^-) pela ação da RN (enzima do citoplasma) e, então, é reduzido a amônio (NH_4^+), pela ação da nitrito redutase (enzima presente nos plastídeos e cloroplastos) (Campbell, 2001; Miller & Cramer, 2004). O nitrato depois de absorvido pode ser reduzido e/ou acumulado no vacúolo das células de raiz ou, então, pode ser transportado via xilema para as folhas, para posterior assimilação na parte aérea (Bloom *et al.*, 1992).

Em plantas, após a redução do N_2 à amônia, através da fixação biológica no caso de leguminosas que realizam associações simbióticas, ou da redução do nitrato pela RN, o íon amônio é assimilado em glutamina (GLN) e glutamato (GLU), através das enzimas GS e GOGAT (Lea & Miflin, 1974). A GLN é utilizada como substrato pela enzima asparagina sintetase (AS) para a biossíntese da asparagina (ASN). A reação ocorre através da transferência do grupo amino da GLN para o aspartato (ASP), produzindo ASN e GLU (Lea *et al.*, 1990; Richards & Schuster, 1992). A GLN e/ou ASN representam os produtos primários da assimilação ou fixação de N em plantas. Nos nódulos, os mecanismos que incorporam a amônia em ASN ainda não foram totalmente esclarecidos (Prell & Poole, 2006).

Um dos principais aminoácidos envolvidos no transporte e no armazenamento de N em muitas plantas superiores é a asparagina (ASN), possivelmente por ter uma razão de N:C de 2:4. Em plantas de soja não-noduladas a ASN é o principal aminoácido transportado via xilema, juntamente com o nitrato. Nas plantas de soja noduladas, ainda que os principais produtos da fixação do N sejam os ureídeos, os aminoácidos ASN e GLN apresentam-se em quantidades expressivas na seiva do

xilema (McClure & Israel, 1979; Puiatti & Sodek, 1999, Amarante *et al.*, 2006). Porém, no passado, o transporte de N na forma de aminoácidos teve pouca atenção em função da importância dos ureídeos e a sua associação com o processo de fixação de N. Estudos recentes mostraram que além dos ureídeos, os aminoácidos sofrem mudanças drásticas no sistema de transporte quando plantas de soja são submetidas a alguns tipos de estresse ou a mudanças nas condições de crescimento (Pate *et al.*, 1980; Lima & Sodek, 2003, Amarante *et al.*, 2006). Lima & Sodek (2003) observaram um aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema de plantas de soja submetidas à deficiência de N e, no caso das plantas noduladas, esse aumento provavelmente está relacionado com a queda na atividade da enzima AS, observada nos nódulos. Porém, nas plantas não noduladas não foi possível chegar à conclusão semelhante, pois não foi possível dosar a atividade dessa enzima nas raízes.

A deficiência do N leva a uma profunda alteração no metabolismo de aminoácidos na planta. Este estresse pode ser causado pelo impedimento da fixação de N₂ ou pela falta de assimilação do nitrato provocada pela ausência do mesmo. Os mecanismos envolvidos nestes fenômenos ainda são pouco conhecidos. As mudanças no transporte de N no xilema refletem as alterações no metabolismo sofridas pela planta em resposta ao estresse (Lima & Sodek, 2003). Identificar mudanças na atividade de enzimas-chave nesse processo seria um passo importante para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos. Duas enzimas podem desempenhar um papel importante: primeiro, a RN por ser a enzima chave do processo de assimilação do nitrato e, em segundo lugar, a AS pois esta enzima está envolvida na formação de ASN, um dos produtos primários da assimilação do nitrato, principalmente em leguminosas como a soja.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi relacionar mudanças no transporte de aminoácidos no xilema de plantas de soja, provocadas pela deficiência de N, com o comportamento de enzimas de assimilação do N encontradas no sistema radicular.

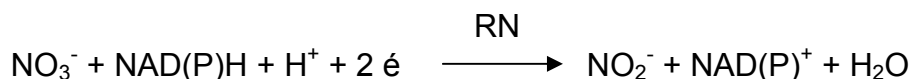
Objetivos específicos:

- Determinar as respostas da enzima nitrato redutase (RN) do sistema radicular de plantas de soja ao estresse de N;
- Determinar as respostas da enzima asparagina sintetase (AS) do sistema radicular de plantas de soja ao estresse de N;
- Relacionar mudanças na expressão gênica de AS nas raízes, provocadas pelo estresse de N, com o transporte de aminoácidos no xilema.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Redutase do Nitrato (RN)

A RN (EC 1.6.6.1) é a primeira enzima da rota de assimilação do N inorgânico. É uma enzima complexa, apresenta-se como um dímero e tem em sua estrutura três grupos prostéticos, pelos quais ocorrem as reações de oxi-redução (Solomonson & Barber, 1990). A RN reduz o nitrato a nitrito utilizando o $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ como substância doadora de elétrons, através da seguinte reação:



A enzima RN é regulada por vários fatores. A regulação pode ser transcricional bem como pós-traducional, através de modificações na proteína. A RN é altamente induzida pelo seu substrato, o NO_3^- . Sua indução ocorre em poucos minutos e na presença de pequenas concentrações de substrato, em quantidades menores que 10 μM (Crawford, 1995; Sueyoshi *et al.*, 1995). Entre os fatores que estimulam a síntese da RN, além do nitrato, está a luz, que pode alterar tanto o fitocromo como a fotossíntese (Appenroth *et al.*, 2000; de la Haba *et al.*, 2001 Allègre *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2006). Os principais inibidores da síntese da RN são os aminoácidos, em especial a glutamina (Dluzniewska *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2006).

A regulação da atividade da RN implica na sua fosforilação-desfosforilação e na associação com uma proteína específica conhecida como 14-3-3 (Weiner & Kaiser, 1999, 2000). A completa inativação ocorre quando a forma fosforilada é associada à proteína 14-3-3. Essa ligação necessita da presença de cátions divalentes, geralmente o Mg^{2+} (Weiner & Kaiser, 2001). A luz e os açúcares

estimulam uma fosfatase que catalisa a desfosforilação da RN, levando à dissociação da proteína 14-3-3 e permitindo a ativação da RN (Huber *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1999; Kaiser & Huber, 2001). Embora existam muitos estudos sobre a regulação da RN, a maioria dos trabalhos é com folhas, existindo poucas informações sobre o que ocorre nas raízes.

A principal forma da RN encontrada em plantas é a forma induzida pelo nitrato (Campbell, 1999), embora já tenham sido detectadas, em algumas espécies, formas constitutivas que não necessitam de nitrato. Em soja, foram encontradas três isoformas da RN, das quais duas são constitutivas (Streit *et al.*, 1985; Li & Gresshoff, 1990). Silveira *et al.* (2001) sugerem a presença de diferentes isoformas da RN em *Phaseolus lunatus*, sendo uma constitutiva, presente em folhas. Em nódulos de *Lotus japonicus*, Kato *et al.* (2003) detectaram expressão de uma RN independente de nitrato.

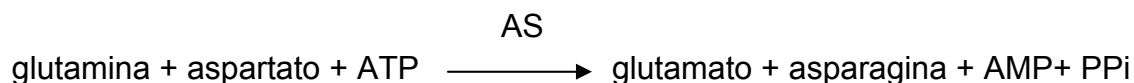
O efeito inibitório do nitrato sobre a nodulação e a atividade da nitrogenase, prejudicando a fixação do N, já foi relatado em muitos trabalhos com leguminosas fixadoras de N₂ (Oghoghorie & Pate, 1971; Streeter, 1988; Arrese-Igor *et al.*, 1997; Chamber-Perez *et al.*, 1997; Puiatti & Sodek, 1999). Embora o mecanismo de inibição ainda não tenha sido totalmente esclarecido, Luciński *et al.* (2002) discutem em uma revisão recente, algumas das hipóteses mais aceitas. Entre elas podem-se destacar: a limitação de carboidratos para a atividade do nódulo; a inibição pelos produtos do metabolismo do nitrato no nódulo; e a limitação de O₂, por reduzir a difusão do gás no nódulo.

Embora tenha sido encontrada atividade da RN em nódulos de muitas leguminosas, alguns trabalhos questionam a função da assimilação do nitrato nos nódulos (Becana *et al.*, 1989; Sprent *et al.*, 1987; Izmailov *et al.*, 2001). Os processos

metabólicos e a função da RN presente nos nódulos ainda não foram totalmente elucidados.

Aspargina Sintetase (AS)

A AS (EC 6.3.5.4) é a enzima que catalisa a biossíntese da ASN. Dois tipos de AS são conhecidos: uma forma dependente de GLN (Hubert & Simoni, 1980) e outra dependente de amônia (Cedar & Schawartz, 1969). Em plantas, a forma mais comum é a dependente da GLN, que promove a transferência do grupo amino da GLN para o aspartato (ASP), com hidrólise simultânea do ATP para AMP, produzindo ASN e GLU (Lea *et al.*, 1990; Richards & Schuster, 1992) através da reação:



A caracterização bioquímica da AS de plantas, envolvendo purificação e atividade enzimática, apresenta várias dificuldades devido à sua instabilidade *in vitro* (Huber & Streeter, 1985; Sieciechowicz *et al.*, 1988), à presença de inibidores (Joy *et al.*, 1983; Romagni & Dayan, 2000) e à contaminação pela atividade da asparaginase nos extratos vegetais (Tsai & Coruzzi, 1990). Devido a essas dificuldades, são poucos os trabalhos envolvendo análises bioquímicas da AS em plantas. Podem-se destacar os com plântulas durante a germinação (Streeter, 1973; Rognes, 1975; Lea & Fowden, 1975), os com raízes de milho (Oaks & Ross, 1984) e os com nódulos de leguminosas (Huber & Streeter, 1984; Shi *et al.*, 1997; Lima & Sodek, 2003).

Para contornar essas dificuldades, os trabalhos com AS podem utilizar técnicas de biologia molecular. A clonagem e identificação de genes para a AS em plantas, mostram que essa enzima é codificada por uma pequena família de genes (de um a

três), na maioria das plantas (Azevedo *et al.*, 2006). São 3 em *arabidopsis* (Lam *et al.*, 1994; 1998) e plantas de girassol (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2002; 2004), 2 em plantas de soja (Hughes *et al.*, 1997), plantas de feijão (Osuna *et al.*, 1999; 2001), *Striga hermotica* (Simier *et al.*, 2005) e 1 em plantas de aspargo (Davies & King, 1993), de arroz (Watanabe *et al.*, 1996) e de alfafa (Shi *et al.*, 1997).

Os cDNAs completos indicam que as AS em plantas são compostas de 579 a 591 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 65 kDa aproximadamente. O alinhamento das seqüências de todas as AS mostra uma alta identidade (70% a 80%) na região N terminal e maiores divergências na região C terminal (Azevedo *et al.*, 2006). As enzimas AS caracterizadas como dependentes de glutamina apresentam um sítio de ligação para glutamina definido por quatro amino ácidos (MET-CYS-GLY-ILE), localizado na região N terminal (van-Heeke & Schuster, 1989).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine Max* (L.) cv. IAC 17) germinadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação, em condições naturais de luz e temperatura.

Para obtenção e cultivo de plantas não-noduladas, plantas em estágio V1 de desenvolvimento (folha primária aberta, Fehr *et al.*, 1971) foram transferidas para vasos plásticos de 3 L contendo vermiculita e cultivadas com solução nutritiva completa (Hoagland & Arnon, 1938).

Para obtenção e cultivo de plantas noduladas, plantas em estágio V1 de desenvolvimento foram inoculadas com a estirpe SMS-463 de *Bradyrhizobium elkanii* por imersão das raízes em uma suspensão contendo a bactéria e, então, transferidas e cultivadas em sistema similar ao das plantas não-noduladas, com exceção da solução nutritiva que foi livre de N (0 mM N-NO₃⁻).

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

4.2. Soluções nutritivas

As soluções nutritivas foram preparadas baseadas em Hoagland & Arnon (1938). A solução +N (com NO₃⁻), 10 vezes concentrada, porém diluída antes do uso, e a solução -N (sem NO₃⁻) tiveram a seguinte composição:

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

Solução -N: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mM); KH_2PO_4 (1 mM); $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mM), K_2SO_4 (2 mM); H_3BO_3 (0,046 mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (9,1 μM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,765 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,32 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

As duas soluções foram preparadas com todos os macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro. O ferro foi adicionado apenas no momento da utilização das soluções. Para isso, acrescentou-se às soluções, +N ou -N, 1 mL/L de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada (Na_2EDTA 33,2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g/L e NaOH 3,65 g/L).

4.3. Tratamentos

Com o objetivo de causar a deficiência de N, plantas não-noduladas em estágio vegetativo V5 e plantas noduladas em estágio reprodutivo R2 e R3 (Fehr *et al.*, 1971) e com nodulação abundante, foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva -N. Para a recuperação do estresse de N, as plantas não-noduladas foram transferidas para solução nutritiva +N e as plantas noduladas foram transplantadas para vasos com vermiculita.

Em todos os experimentos hidropônicos foram utilizados vasos plásticos de 3 L contendo solução nutritiva (+N ou -N) diluída em 1/3. Em cada vaso foram acomodadas três plantas, sendo o sistema radicular lavado cuidadosamente com água para remover o excesso de vermiculita. O sistema foi mantido sob aeração contínua, por meio de tubo flexível ligado à tubulação de um compressor de ar. O

volume inicial da solução no vaso foi restabelecido diariamente, com adição de água destilada. O pH das soluções nutritivas foi monitorado com um pHmetro portátil e ajustado para $6,0 \pm 0,2$, com solução de H_2SO_4 1 N.

4.4. Delineamento experimental

Foi utilizado o experimento inteiramente casualizado. Os dados apresentados representam a média de três repetições, sendo cada repetição um vaso com três plantas.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada entre 11 e 13:00 h conforme McClure & Israel (1979). Com auxílio de lâmina de barbear foi feito um corte transversal, logo abaixo do nó cotiledonar das plantas, separando-se a parte aérea do sistema radicular. Em seguida, a região do corte do sistema radicular foi lavada com água deionizada e enxugada com papel de filtro iniciando-se a coleta da seiva com auxílio de microcapilares de vidro. Os exsudatos foram coletados em tubos do tipo eppendorf, mantidos no gelo. Após a coleta, o material foi armazenado a -20°C até o momento das análises.

4.5.2. Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

A separação e análise de aminoácidos livres foram efetuadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de fase reversa, após

derivação com o-ftaldialdeído (OPA) (Benson & Hare, 1975; Jarret *et al.*, 1986) com modificações (Marur *et al.*, 1994).

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

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes: tampão fosfato pH 7,25 para a bomba A [= "A": Na₂HPO₄.7H₂O 50 mM, CH₃COONa 50 mM, 1,5 mL de CH₃COOH, 20 mL de tetrahidrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol 65% (= "B") para a bomba B. Ambas as soluções foram submetidas à retirada de gases, sendo o tampão "A" filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana PVDF de 0,45 µm.

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se, inicialmente, 50 mg de OPA em 1 mL de metanol específico para HPLC e misturando-se posteriormente a 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (ácido bórico 2,4% p/v em H₂O; pH ajustado com NaOH 2 N), filtrando-se em seguida em filtro Millipore em PVDF de 0,22 µm. No dia de uso, 5 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados a 625 µL desta mistura.

As amostras de seiva do xilema foram centrifugadas a 14.000 *g* por 2 minutos para posterior derivação com o reagente OPA + 2-mercaptoetanol.

Uma alíquota de 20 µL, de amostra ou padrão, foi misturada com 60 µL do reagente OPA + mercaptoetanol em microtubos do tipo eppendorf. Após agitação e dois minutos de reação, tempo suficiente para se formar os derivados aminoácidos-OPA, uma alíquota de 10 µL de padrão/seiva foi injetada na câmara de injeção de amostra do HPLC. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em um gradiente dos dois tampões, crescente de "B" em relação à "A", através da coluna

cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2,5 μm , 250 x 4,6 mm, da SUPELCO INC.) com fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de "B" em relação a "A" da seguinte forma: 25% aos 0 min, 60% aos 35 min, 75% aos 45 min, 95% aos 60 min, 96% aos 65 min e 100% aos 66 min.

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

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparada à dos picos de um padrão Sigma AAS-18, com 15 aminoácidos protéicos (ASP, GLU, SER, HIS, GLY, THR, ARG, ALA, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS), ao qual foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos na concentração de 250 nmol/mL (fig. 1).

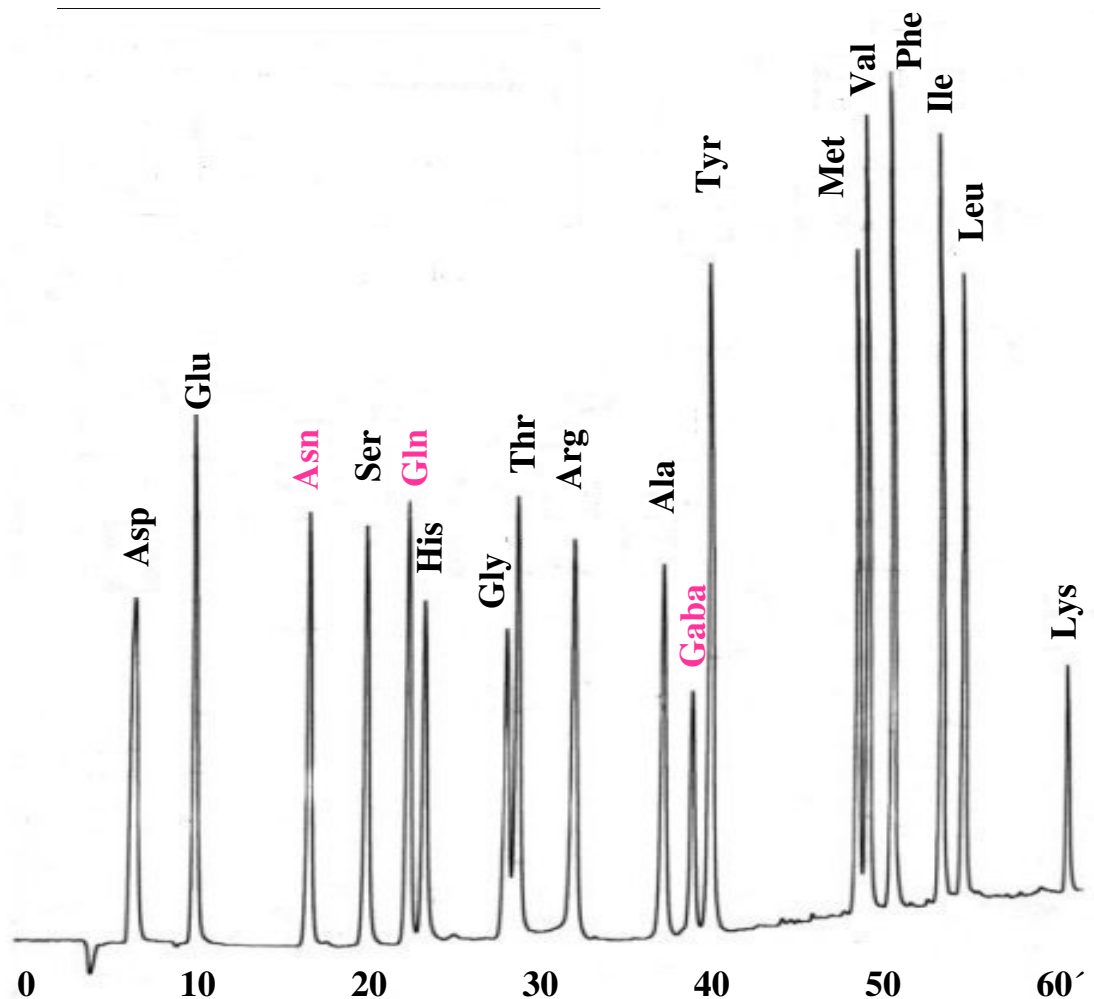


Figura 1. Perfis de eluição de derivados OPA-aminoácidos do padrão Sigma AAS-18, enriquecido com ASN, GLN e GABA, em coluna cromatográfica Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 4,6 mm x 250 mm) por HPLC.

4.5.3. Redutase do nitrato (RN)

4.5.3.1. Extração e dosagem da enzima RN *in vitro*

A extração e dosagem da RN (E.C.1.6.6.1) foi realizada de acordo com o método de Botrel & Kaiser (1997), com pequenas modificações. O material vegetal (raízes e nódulos) foi coletado, lavado com água deionizada, seco em papel absorvente e pesado. Em seguida, foi homogeneizado em nitrogênio líquido, com auxílio de um almofariz. Para cada 1 g de material vegetal adicionou-se 3 mL de tampão de extração: Hepes-KOH 50 mM pH 7,6; $MgCl_2$ 10 mM (determina a forma ativa da enzima, RN ativa) ou EDTA 5 mM (determina a forma total da enzima, RN total); FAD 10 μ M; Caseína 3%; DTT 1 mM. Após maceradas, as amostras foram centrifugadas (16.000 *g*; 10 min; 4°C). O sobrenadante foi conservado em gelo e posteriormente dessalinizado em colunas de PD 10 (Sephadex G-25), equilibradas com tampão de reação Hepes-KOH 50 mM, pH 7,6; $MgCl_2$ 10 mM ou EDTA 5 mM; FAD 10 μ M; DTT 1 mM. Após a dessalinização, as amostras foram conservadas em gelo e montou-se os ensaios em tubos tipo eppendorf, a uma temperatura de 30°C, com volume total de 1 mL, sendo: 300 μ L de extrato + 300 μ L de tampão de reação + 200 μ L de NADH (0,2 mM) + 200 μ L de KNO_3 (5 mM). A incubação foi de 0, 15 e 30 minutos e após esse tempo, a reação foi paralisada com 125 μ L de acetato de zinco (0,5 M). O material foi então centrifugado (16.000 *g*, 4 min, temperatura ambiente) e usado para dosagem de nitrito, conforme descrito no item 4.5.3.3.

4.5.3.2. Extração e dosagem da enzima RN *in vivo*

A dosagem *in vivo* da RN foi realizada de acordo com o método descrito por Majerowicz *et al.* (2003). O material vegetal (raízes e nódulos) foi coletado, lavado

com água deionizada e seco em papel absorvente. As raízes foram cortadas em segmentos de 2 cm aproximadamente, com o auxílio de uma tesoura e os nódulos inteiros (0,5 g) foram colocados em seringas de volume de 10 mL. Para cada 0,5 g de material vegetal foram adicionados 6 mL de meio de reação (K_2HPO_4 0,05 M pH 7,5, KNO_3 0,05 M + propanol 1%). Após colocar o êmbolo da seringa, fez-se a inversão da mesma para expelir o ar. Fechou-se a saída da seringa com o dedo e puxou-se o êmbolo cinco vezes para fazer vácuo com o material vegetal totalmente submerso no meio. Para a obtenção do tempo zero da reação, foi expelido 1 mL do meio de reação logo após o vácuo, e o volume expelido foi armazenado. As seringas foram cobertas com papel alumínio, conservadas no escuro, e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, a reação foi paralisada retirando-se o meio de reação passando por um filtro de microfibras de vidro (GF/C 24 mm) acoplado à saída da seringa. As amostras foram utilizadas posteriormente para dosagem de nitrito, conforme descrito no item 4.5.3.3.

4.5.3.3. Dosagem de nitrito (NO_2^-)

A determinação de nitrito seguiu o método de Hageman & Reed (1980). Foram misturados a 2 mL de amostra (1 mL de amostra e 1 mL de água milli-Q), branco (2 mL de água milli-Q) ou padrões (0,01 a 0,1 μmol de NO_2^-), 1 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em HCl 1,5 N e 1 mL de N-(naftil)-etilenodiamina 2HCl 0,02% (p/v) em água, obtendo-se um volume final de 4 mL. A reação foi agitada em vortex e os tubos repousaram por 30 minutos em temperatura ambiente. As medidas das densidades óticas foram realizadas a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g MF/h}$.

4.5.4. Asparagina sintetase (AS)

4.5.4.1. Métodos de extração e preparação

A extração e o ensaio da atividade da AS foram realizadas baseando-se nos trabalhos de Huber & Streeter (1985) e Romagni & Dayan (2000). O material vegetal foi coletado, lavado com água deionizada e seco com papel absorvente, pesado e homogeneizado em almofariz previamente resfriado, com tampão Hepes 100 mM, pH 8,5, 0,1 mM de EDTA, 10 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de DTT, 25% de glicerol (v/v) e 67 mM de 2-mercaptoetanol, adicionado no momento do uso do tampão, na proporção de 2,5 mL/g (raízes), 4 mL/g (nódulos) ou 3 mL/g (cotilédones). Os extratos foram centrifugados a 4.000 g por 20 min a 4°C. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 0,5 µL/mL de 2-mercaptoetanol e as proteínas precipitadas com 42% de saturação com $(NH_4)_2SO_4$ por 3 min no gelo. O precipitado foi coletado por centrifugação a 20.000 g por 10 min a 4°C e, solubilizado em 1 a 2,5 mL de tampão de extração. A seguir, foi feita a dessalinização do extrato em coluna PD10 (Sephadex G-25M) equilibrada com tampão de extração a 4°C.

4.5.4.2. Ensaio enzimático

A atividade foi determinada em meio de reação constituído de 10 mM de GLN, 30 mM de ATP, 10 mM de ASP, 10 mM de $MgCl_2$, 2 mM de DTT e 0,1 mM de EDTA, Hepes 50 mM pH 7,75 e 400 µL do extrato dessalinizado, em volume total de 500 µL. A reação foi iniciada com a adição do extrato dessalinizado, seguida de incubação a 30°C por 0,5; 1; 1,5 e 2 h. A reação foi paralisada com 100 µL de ácido sulfossalicílico (200 mg/mL). Em seguida, centrifugou-se a mistura por 3 min a 20.000 g para precipitação das proteínas e filtração do sobrenadante. A análise do

ensaio foi feita em HPLC, após derivação com reagente OPA (Benson & Hare, 1975; Jarret *et al.*, 1986; Marur *et al.*, 1994).

4.5.4.3. Método de quantificação dos produtos

Para separação e quantificação do ASP e da ASN, substrato e produto da reação da AS, a concentração de aminoácidos do ensaio foi ajustada para 0,2 a 1,0 µmol/mL através de diluição com água deionizada e o pH ajustado para 7,0 com NaOH (Joy & Ireland, 1990). As análises em HPLC seguiram a metodologia descrita para a separação e composição dos aminoácidos da seiva do xilema no item 4.5.2.

4.6. Análises moleculares

4.6.1. Soluções

4.6.1.1. Solução de carga para eletroforese (6X)

Azul de bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno cianol FF	0,25% (p/v)
Ficol tipo 400	15% (p/v)

4.6.1.2. Soluções para purificação do DNA plasmidial

Solução I

Glicose	50 mM
Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
EDTA	10 mM

Solução II

NaOH	0,2 N (diluída no momento a partir de uma solução 5 N)
SDS	1% (p/v)

Solução III (para 100 mL)

Acetato de potássio 5 M	60 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
H ₂ O	28,5 mL

4.6.1.3. Solução para hibridização de RNA**Solução Denhardt (100X)**

BSA (Fração V)	1% (p/v)
Ficoll 400	1% (p/v)
PVP 360	1% (p/v)

Filtrado com filtro de 0,45 µm e armazenado em alíquotas a -20°C até o momento da utilização.

DNA de espermatozoides de salmão

O DNA de espermatozoides de salmão foi hidratado em H₂O milli-Q estéril, aquecida a 50°C, em uma concentração de 10 mg/mL. A solução ficou sob agitação até dissolver-se, adquirindo um aspecto gelatinoso. Para reduzir o tamanho dos fragmentos de DNA a solução ficou por 8 min a 30% da potência de um aparelho de ultrassom *Vibra Cell* (Sonic & Materials INC).

4.6.2. Tampões**Tampão ácido maléico 5X**

Ácido maléico	58 g/L
NaCl	34,8 g/L

Ajustado pH 7,5 com NaOH.

Tampão desnaturante para RNA

Formamida 10 mL

Formaldeído 1 mL

MOPS 10X 1 mL

Separado em alíquotas e armazenado a -20°C.

Tampão MOPS (10X)

MOPS 200 mM

Acetado sódico 50 mM

EDTA-Na₂ 1 mM

Ajustado pH 7,0 com NaOH.

Autoclavado a 120°C por 20 min.

Tampão SSC (20X)

NaCl 3 M

Citrato de sódio 0,3 M

Ajustado pH 7,0 com NaOH.

Autoclavado a 120°C por 20 min.

Tampão TAE

Tris 40 mM

EDTA-Na₂ 2 mM

Ajustado pH 8,5 com ácido acético.

Autoclavado a 120°C por 20 min.

Tampão TCM

Tris-HCl 100 mM (pH 7,5)

CaCl₂ 100 mM

MgCl₂ 100 mM

Filtrado com filtro de 0,45 µm.

4.6.3. Meio de cultivo para bactérias

Meio LB (Luria-Bertani)

NaCl 170 mM

Bacto-triptona 10 g/L

Extrato de levedura 5 g/L

Para meio LB sólido foi adicionado ágar 1,5% (p/v).

Autoclavado a 120°C por 20 min.

Ampicilina

A ampicilina foi preparada a uma concentração de 100 mg/mL em água milli-Q, esterilizada por filtração (0,2 µm) e armazenada em alíquotas a -20°C. No momento de uso, foi descongelada e adicionada ao meio quando este encontrava-se em uma temperatura inferior a 55°C, na concentração de 50-100 µg/mL.

4.6.4. Gel de agarose

Gel de agarose para DNA

Agarose 1%

Tampão TAE até completar o volume

Brometo de etídeo (BrEt) 0,5 µg/mL

Gel de agarose desnaturante para RNA

Agarose	1%
Tampão MOPS	1X
Formaldeído	1%
H ₂ O milli-Q	até completar o volume
BrEt	0,5 µg/mL

A agarose foi fundida em água e então mantida a 60°C. O formaldeído e o tampão MOPS também foram mantidos a 60°C. Quando as soluções alcançaram a mesma temperatura, foram misturadas suavemente até total homogeneização. Posteriormente deixou-se a mistura esfriar um pouco, adicionou-se o BrEt e colocou-se em molde, onde foi gelificada por 1 h. A eletroforese foi feita em tampão MOPS 1X.

Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta.

4.6.5. Extração de RNA

Os materiais vegetais foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido, até obter um pó fino. Foi utilizado 0,9 g de raiz e 0,6 g de nódulo para 3 mL de reagente. Os RNAs foram extraídos com o reagente TRI (Sigma), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da utilização.

A quantificação do RNA total foi feita através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, considerando que 1 unidade de DO 260 equivale a 40 µg/mL de RNA. Após quantificar o RNA, foi estimada sua pureza pela razão A_{260}/A_{280} na amostra, que deve estar próximo de 2,0. A confirmação da

quantificação e verificação da integridade do RNA foi feita em gel desnaturante de agarose 1% com tampão MOPS 1X.

4.6.6. Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado RNA total extraído de raízes de plantas soja cultivadas em vermiculita com solução nutritiva +N, seguindo as instruções do kit *MarathonTM cDNA Amplification* (Clontech).

4.6.7. Desenho dos primers

Para o desenho dos primers foi utilizada a opção *PrimerSelect* do programa *Lasergene* (DNASTAR). Para a construção das sondas gene-específicas de SAS1 e SAS2, os primers foram desenhados a partir das seqüências de seus cDNAs, que estão depositadas na base de dados NCBI com o número de acesso U77679 e U77678, respectivamente (Hughes *et al.*, 1997). Para garantir a especificidade das sondas, os primers foram desenhados na região C-terminal, onde são observadas as maiores divergências entre os genes.

Os primers para a sonda do gene SAS3, foram desenhados com base na seqüência de um cDNA incompleto de soja, que apresenta homologia com uma asparagina sintetase de arroz e está depositada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* com o número de acesso BQ627966.

Os primers utilizados para as sondas foram:

SAS1 sense SAS1-2.1:	5' – CTCCAACCACCAAAGAAGCATACC - 3'
antisense SAS1-2.2:	5' – CCCTGGATAACTACAAAGCAACCT - 3'
SAS2 sense SAS2-1.1:	5' – ACCCCAAAAACCAAGGAAGC - 3'
antisense SAS2-1.2:	5' – TTGGGAACTGATAAAGGAAACAC - 3'

SAS3 sense SAS3-1: 5' – TTGTACAGGCAGAAGGAACAAT - 3'
 antisense SAS3-2: 5' – TGCGGCACGACCAGAAG - 3'

4.6.8. Obtenção dos fragmentos de interesse

Os fragmentos foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se cDNAs de primeira fita, descritos no item 4.6.6, e os primers gene-específicos para SAS1, SAS2 e SAS3. A mistura da reação foi composta por:

Tampão de PCR 10X	2,5 µL
Mistura dNTPs 1mM (cada)	0,5 µL
primer <i>sense</i> 10 µM	1,0 µL
primer <i>antisense</i> 10 µM	1,0 µL
DNA molde	25 ng
DNA polymerase	2 U
H ₂ O milli-Q estéril até completar volume final de 25 µL.	

A programação utilizada no termociclador foi: um passo inicial de 3 min a 96°C, seguido de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C (35 ciclos) com 5 min de extensão final a 72°C.

A verificação da amplificação dos fragmentos foi feita por separação em gel de agarose 1% com tampão TAE.

4.6.9. Concentração das amostras de ácidos nucleicos por precipitação

Os ácidos nucleicos foram precipitados por adição de 0,1 volume de NaOAc 3 M (pH 4,8) e 2,5 volumes de etanol 95%. A mistura foi agitada em vortex, mantida a -20°C por no mínimo 2 h e centrifugada a 6.000 *g* a 4°C.

O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) para eliminar os sais. Posteriormente centrifugou-se a 6.000 *g* durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e os ácidos nucleicos foram ressuspensos em H₂O milli-Q estéril.

4.6.10. Inserção dos fragmentos no vetor

Selecionados os fragmentos de interesse, obtidos na PCR, estes foram extraídos do gel de agarose com o kit *Nucleo TrapTM Gel Extration* (BD Biosciences Clontech) ou então precipitados como descrito no item 4.6.9, e posteriormente inseridos em um vetor da Promega (*pGEM[®]-T Easy Vector Systems*).

A ligação do fragmento ao vetor levou em consideração a relação molar de 3:1 (fragmento:vetor). Para calcular essa relação utilizou-se a seguinte fórmula:

$$x = 3 \times \frac{a \times b}{c}$$

Onde:

x = µg do fragmento a ligar

a = tamanho (em pb) do fragmento a ligar

b = µg do vetor

c = tamanho (em pb) do vetor

Para a reação de ligação foram utilizados 5 µL de *Rapid Ligation Buffer* (2X), 1 µL de pGEM-T (50 ng), 1 µL de DNA ligase T4 (3 Weiss/µL), o produto de PCR (mantendo a relação molar 3:1) e H₂O milli-Q estéril até completar 10 µL. A reação foi mantida a 4°C por ± 12h. O produto foi armazenado a -20°C até o momento de utilização.

4.6.11. Condições de crescimento das bactérias

4.6.11.1. Estirpes bacterianas

Para os experimentos de clonagem foram utilizadas bactérias da estirpe DH5αF' de *Escherichia coli*.

4.6.11.2. Cultivos de *E. coli*

Os cultivos líquidos cresceram em meio LB autoclavado, incubados em agitador orbital a 37°C a 200-250 rpm, deixando uma câmara de ar pelo menos cinco vezes maior que o volume do cultivo.

4.6.11.3. Conservação das bactérias

As bactérias foram armazenadas no mesmo meio de cultivo utilizado para seu crescimento, suplementado com glicerol estéril em uma concentração final de 20% (v/v) e a -80°C até sua utilização.

4.6.12. Preparação de células competentes

Placas com meio LB foram inoculadas com células *E. coli* DH5αF' armazenadas em glicerol a -80°C e, então incubadas a 37°C durante toda a noite. Com uma das colônias, inocularam-se 2 mL de meio LB líquido, os quais foram cultivados em um agitador orbital a 37°C a 240 rpm durante toda a noite. Posteriormente, foram inoculados 10 mL de meio LB com 200 µL do cultivo e, então incubados a 37°C a 240 rpm até alcançar uma A_{600} de 0,5. Todos os passos a seguir foram feitos a 4°C e em material previamente frio. O meio foi incubado por 10 min em gelo e centrifugado a 2.000 *g* a 4°C durante 5 min, o precipitado foi ressuspensão cuidadosamente em 5 mL de CaCl₂ estéril a 0,1 M e incubado em gelo por 30 min.

Após esse período foi feita uma nova centrifugação a 2.000 *g* a 4°C por 5 min. O precipitado foi retomado em 1 mL de CaCl₂ estéril a 0,1 M e armazenado a 4°C de 2 a 48 h, sendo sua melhor utilização com 24 h.

4.6.13. Transformação de células de *E. coli*

Em um tubo de 1,5 mL previamente resfriado foram misturados 200 µL de células competentes, 10 µL de DNA (fragmentos de interesse clonados, item 4.6.10) e 100 µL de tampão TCM, incubados em gelo por 30 min. Em seguida incubou-se durante 2 min a 42°C e novamente em gelo por 2 min. Foram adicionados 500 µL de meio LB e incubou-se a 37°C a 250 rpm durante 1 h. Finalmente, foram inoculados entre 50 e 500 µL das células transformadas em placas com meio LB sólido seletivo contendo ampicilina (50 µg/mL), isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosídeo (X-gal) (Sambrook & Russel, 2001). As placas foram incubadas a 37°C de 12 a 14 h. As bactérias transformadas (colônias brancas) foram selecionadas e processadas conforme descrito no item 4.6.14.

4.6.14. Extração e purificação de DNA plasmidial

Para a extração e purificação do DNA plasmidial, inoculou-se 3 mL de meio LB suplementado com ampicilina (50-100 µg/mL) com a colônia bacteriana, e incubou-se durante toda a noite em um agitador orbital a 37°C a 240 rpm. Em um tubo de 1,5 mL centrifugou-se a 12.000 *g* por 1 min, as células precipitadas foram ressuspensas em 200 µL de *Solução I*, agitando-se vigorosamente. Após 5 min em temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de *Solução II*, misturou-se suavemente por inversão e mantave-se por mais 5 min em temperatura ambiente, para promover

a ruptura das células. Foram adicionados 200 µL de *Solução III* agitando-se suavemente e manteve-se por 5 min em gelo. Em seguida, centrifugou-se por 5 min a 12.000 *g* à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 500 µL de isopropanol para precipitar os ácidos nucléicos, agitando-se vigorosamente. Manteve-se 10 min à temperatura ambiente, centrifugou-se a 12.000 *g* por 15 min eliminando o sobrenadante e deixando-se secar o precipitado. O precipitado foi ressuspenso com 20 µL de H₂O milli-Q com RNase A (Sigma) (250 µg/mL), agitado em vortex, brevemente centrifugado e incubado de 30 a 45 min a 37°C, para a atividade da RNase. Seguidamente o DNA foi quantificado em espectrofotômetro e enviado para ser seqüenciado. Para o sequenciamento foi utilizado o método “dye terminator” em um seqüenciador automático ABI *PRISM™* 373 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). O restante do DNA foi armazenado a 4°C e após confirmação da seqüência foi utilizado como molde para sintetizar as sondas.

4.6.15. Marcação das sondas

4.6.15.1. Sonda não radioativa

Para a síntese e marcação das sondas *antisense* de cadeia simples não radioativas, utilizadas para o *Southern Blot*, foi utilizado o kit *PCR DIG Labeling Mix* (Roche), seguindo as instruções do fabricante. A mistura para a PCR foi:

Tampão 10X (mix)	1 µL
Mistura dNTPs+ Dig-dUTP (mix)	2,5 µL
primer <i>antisense</i>	10 µM
DNA molde	100 ng
DNA polymerase	1 U

H₂O mili-Q estéril até completar volume final de 25 µL.

A programação utilizada foi: um passo inicial de 3 min a 96°C, seguido de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C (35 ciclos) com 5 min de extensão final a 72°C.

4.6.15.2. Sonda radioativa

A síntese e marcação das sondas *antisense* de cadeia simples foi feita com fósforo marcado [α -³²P]dCTP 3000 Ci/mmol (Amersham), por PCR. A mistura da reação foi composta por:

Tampão de PCR 10X	5 µL
Mistura dATP, dGTP, dTTP 1 mM (cada)	1 µL
α - ³² P dCTP (10 µCi/µL)	3 µL
primer <i>antisense</i>	20 µM
DNA molde	25 ng
DNA polymerase	2 U

H₂O mili-Q estéril até completar volume final de 50 µL.

A programação utilizada foi a mesma para a sonda não radioativa.

4.6.16. Southern Blot

Amostras de cDNAs na forma de produto de PCR, obtidas como descrito no item 4.6.8, foram separadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE e transferidas, por capilaridade, para membrana de nylon-N+. Antes da transferência o gel passou por um tratamento triplo:

Tratamento depurinizante: 2 lavagens de 15 min com HCl 0,25 N.

Tratamento desnaturante: 2 lavagens de 15 min com uma solução de NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M.

Tratamento neutralizante: 1 lavagem de 15 min com uma solução de NaOAc 3 M (pH 4,8).

A transferência foi feita em uma cuba contendo tampão de transferência SSC (20X) sobre o qual colocou-se uma placa de vidro, formando uma ponte. Sobre a placa colocou-se um papel *Whatmann* 3MM molhado em tampão 20X SSC, de tamanho adequado para que suas extremidades estivessem submersas no tampão. O gel, após a eletroforese, foi colocado no centro desse papel com seus poços posicionados para baixo e sobre ele a membrana de nylon de mesmo tamanho. Em todo o processo evitou-se a formação de bolhas entres as interfaces. Sobre a membrana foram colocados dois pedaços de papel *Whatmann* 3 MM, molhados em 20X SSC. Para evitar a difusão do tampão e assegurar a transferência através do gel, foi colocado filme plástico em toda região onde não havia o gel. Sobre o conjunto colocou-se um bloco de papel toalha, uma placa de vidro e um peso de ± 1 kg. A transferência ocorreu por no mínimo 12 h.

Após a transferência, as membranas foram pré-hibridizadas por no mínimo 2 h e hibridizadas por 18 h com uma solução de 7% SDS, formamida deionizada 50%, 5X SSC, leite em pó 2%, tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e N-Lauril sarcosina 0,1% a 42°C. Para a hibridização foram utilizadas sondas não radioativas (item 4.6.15.1). As sondas foram desnaturadas a 100°C por 5 min e esfriadas em gelo antes de serem adicionadas na solução. Após a hibridização, as membranas foram lavadas 1 vez por 15-20 min em solução 2X SSC e 0,1% SDS, em temperatura ambiente e 1 vez por 20 min em solução 0,1X SSC e 0,1% SDS a 68°C. Após os lavados iniciou-se a revelação das membranas. Em uma bandeja com agitação as membranas foram

mantidas com tampão de ácido maléico 1X e leite em pó 2%, por 40 min a temperatura ambiente. Após eliminada a solução, adicionou-se mais 10 mL da solução anterior contendo o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina (*Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments*, Roche) em diluição adequada. Manteve-se por 30 min à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 2 vezes (10 min cada) com uma solução de ácido maléico 1X e Tween 20 a 0,3% à temperatura ambiente. Após as lavagens as membranas foram enxaguadas com tampão de detecção (Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH 9,5) e em seguida adicionou-se 10 mL de tampão de detecção contendo NBT (0,3 mg/mL) e BCIP (0,15 mg/mL) e, então, mantidas sob agitação suave até o aparecimento do sinal de hibridização.

4.6.17. Northern Blot

Amostras de RNA total (15 µg) foram desnaturadas em tampão desnaturante. O volume de tampão utilizado foi igual ao da amostra. Manteve-se a mistura por 15 min a 65°C. Após esse tempo as amostras foram separadas em gel desnaturante de agarose 1% e transferidas para membranas de nylon-N+, por capilaridade, como descrito para *Southern Blot*.

Após a transferência, as membranas foram pré-hibridizadas por no mínimo 2 h e hibridizadas por 16 h com solução 5X SSC, 5X Denhardt, 1% SDS, DNA de salmão desnaturado 0,1 µg/mL e formamida 50% a 42°C. Para a hibridização, as sondas radioativas (item 4.6.15.2) foram desnaturadas por 5 min a 100°C e esfriadas em gelo antes de serem adicionadas à solução. Após a hibridização, as membranas foram lavadas 2 vezes por 15 minutos em solução 2X SSC e 0,1% SDS em temperatura ambiente e mais 2 vezes por 15 minutos com solução 0,1X SSC e 0,1% SDS a 65°C (Moore, 1987). Após esses enxagues, filmes de raios X foram expostos

às membranas e acondicionados em cassete armazenado a -80°C . O tempo de exposição foi bastante variável, dependendo do sinal presente na membrana. Após esse período, os filmes foram revelados por imersão em solução reveladora (AGFA) por 1-2 min, lavados com água, imersos em solução fixadora (AGFA) por 1-2 min e lavados em água. A revelação foi feita no escuro ou na presença de luz vermelha para evitar que os filmes fossem velados.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da deficiência de nitrogênio (N) sobre a atividade da redutase do nitrato (RN) em plantas de soja

Para os estudos da atividade da RN foram feitas dosagens *in vitro* e, em alguns experimentos, também foram feitas dosagens *in vivo*. As dosagens *in vitro* apresentam-se em duas formas: a forma **RN ativa** (utilizando tampão contendo MgCl_2) e a forma **RN total** (forma ativa + inativa, usando tampão contendo EDTA).

5.1.1. Estudo da atividade da RN em raízes de plantas de soja durante seu desenvolvimento

Inicialmente, foi conduzido um experimento que teve como objetivo verificar o estágio mais adequado de desenvolvimento das plantas de soja, para realizar os estudos envolvendo medidas da atividade da RN. Procurou-se um estágio levando-se em consideração: o tamanho da planta, a atividade da RN e a variação com a idade, visando padronizar da melhor forma possível o material usado nos experimentos. Para este fim, foram utilizadas plantas não-noduladas, cultivadas em dois sistemas distintos, simultaneamente. No primeiro, as plantas foram cultivadas em vermiculita com solução nutritiva +N (V+N) e no segundo em hidroponia com solução nutritiva +N, diluída em 1/3 (5 mM de NO_3^-) (H+N). Simultaneamente foram cultivadas plantas inoculadas com rizóbio, em vermiculita com solução nutritiva sem N mineral (V-N). As análises foram feitas nos estádios V1, V2, V3, V5, R1, R2 e R3 (fig. 2).

As plantas começaram a receber solução nutritiva somente após o estágio V1 (primeira folha unifoliolada totalmente aberta), o que pode explicar a ausência de atividade da RN, nesse estágio (fig. 2).

Os tratamentos com plantas não-noduladas, cultivadas em H+N e em V+N, apresentaram padrões semelhantes de atividade da RN ao longo do crescimento das plantas (fig. 2 A e B). Logo no estágio V2, quando as plantas já receberam o tratamento com nitrato, observa-se um aumento na atividade da RN, que segue aumentando até o estágio V3. A partir de V3 a atividade da RN mostra-se estável, com uma tendência a aumentar. Essa tendência foi mais evidente nas plantas em H+N.

Embora todos os tratamentos tenham apresentado um perfil semelhante, os valores de atividade da RN na forma ativa (MgCl_2) foram inferiores aos das atividades de RN total (EDTA) e de RN *in vivo*, o que sugere uma menor proporção da RN na forma ativa. Comparando-se as atividades das plantas não-noduladas nos sistemas vermiculita e hidroponia, as atividades foram mais altas no tratamento H+N. Essa maior atividade provavelmente deve-se à maior disponibilidade de NO_3^- na solução nutritiva em hidroponia, onde as raízes estão diretamente em contato com os sais. Já, em vermiculita, parte do NO_3^- pode ter ficado retido no substrato, em razão da sua alta CTC (capacidade de troca catiônica) e da carga negativa do NO_3^- . Ainda, parte pode ter sido perdida por lixiviação durante a irrigação.

Na fig. 2 C estão os resultados da atividade da RN nas plantas noduladas cultivadas em V-N. Nas raízes, observou-se uma baixa atividade da RN *in vitro* e *in vivo*, em todos os estágios de desenvolvimento avaliados. Até o estágio V5 as plantas apresentaram uma pequena quantidade de nódulos, dificultando a coleta para os ensaios. Nos nódulos foi medida apenas a atividade da RN total, que foi mais

alta do que a atividade observada nas raízes das plantas noduladas. A atividade da RN nos nódulos foi, em média, superior aos valores obtidos para as raízes das plantas cultivadas com nitrato em vermiculita (V+N) (fig. 2 B).

Para os experimentos seguintes, escolheu-se o estágio V5 para as plantas não-noduladas, tendo em vista a presença de altas atividades com ausência de grandes variações na atividade da RN nesta fase de desenvolvimento. Porém, para as plantas noduladas em V5, embora tenha sido feito o ensaio da RN total como mostra a fig. 2A, a quantidade de nódulos não era suficiente para todos os ensaios *in vivo* e *in vitro*. Dessa maneira, escolheu-se o estágio R2, no qual as plantas apresentaram nodulação abundante e os nódulos provavelmente estavam em plena atividade, pois as plantas estavam bem verdes e não apresentavam sintomas causados pela ausência de N.

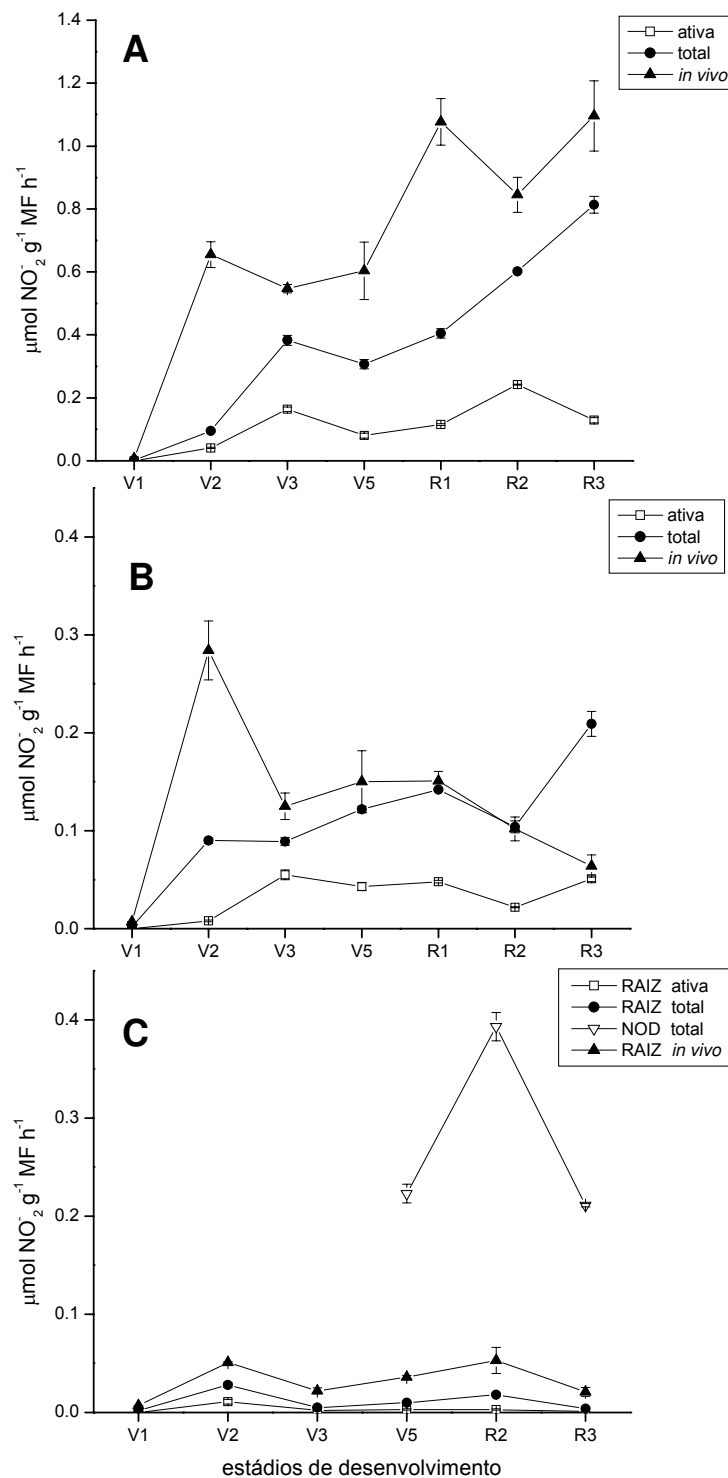


Figura 2. Atividade da RN *in vitro* (total + ativa) e *in vivo* em raízes e nódulos de plantas de soja em diferentes estádios de desenvolvimento. Plantas não-inoculadas cultivadas em hidroponia com nitrato (H+N) (**A**) e em vermiculita com nitrato (V+N) (**B**) e plantas inoculadas cultivadas em vermiculita sem nitrato (V-N) (**C**). Barras = erro padrão, n=3.

5.1.2. Atividade da RN em plantas de soja não-noduladas

Nos experimentos de deficiência de N, com plantas de soja não-noduladas, plantas cultivadas em V+N foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva -N (H-N) por um período de quatro dias. Para a recuperação do estresse de N, as plantas foram transferidas para solução nutritiva +N (H+N) diluída em 1/3 (5 mM de NO_3^-) por mais quatro dias. O sistema hidropônico foi escolhido pela facilidade de aplicar o tratamento sem N, inviável no caso de vermiculita, que poderia reter o NO_3^- e liberá-lo posteriormente.

A fig. 3 mostra a atividade da RN *in vitro* em raízes de plantas de soja não-noduladas durante o estresse de N e sua recuperação. O gráfico mostra a atividade da RN total (EDTA) e da RN na sua forma ativa (MgCl_2). Após a transferência das plantas controle (V+N) para H-N, observou-se uma queda brusca na atividade da RN total, com valores próximos ao zero já no 1º dia. A atividade manteve-se baixa, quase nula, durante os quatro dias de deficiência do N. Um dia após a recuperação do N, a atividade da RN total aumentou. Esse aumento foi gradativo até o 4º dia de recuperação, alcançando um valor um pouco inferior ao valor inicial. Os valores de atividade da RN na forma ativa foram muito baixos, reforçando as observações feitas no experimento com raízes de plantas de soja durante seu desenvolvimento. No entanto, o ensaio realizado na presença de MgCl_2 , aparentemente teve algum problema e não produziu resultados conclusivos.

O experimento foi repetido realizando-se o método *in vivo*, para comparação com o *in vitro*. Neste caso, como no experimento anterior a queda em atividade da RN ocorreu em 24 h, as medidas foram realizadas apenas nos dias 0 e 2. Plantas cultivadas em hidroponia na presença de nitrato mostraram a mesma queda em atividade após 2 dias na ausência de nitrato. Isto pôde ser observado no ensaio *in*

vitro (fig. 4). As atividades de RN foram semelhantes utilizando-se os dois métodos de ensaio. O ensaio *in vivo* confirmou a queda em atividade da RN em raízes de plantas de soja submetidas ao estresse de N, que foi observada também no experimento anterior (fig. 3).

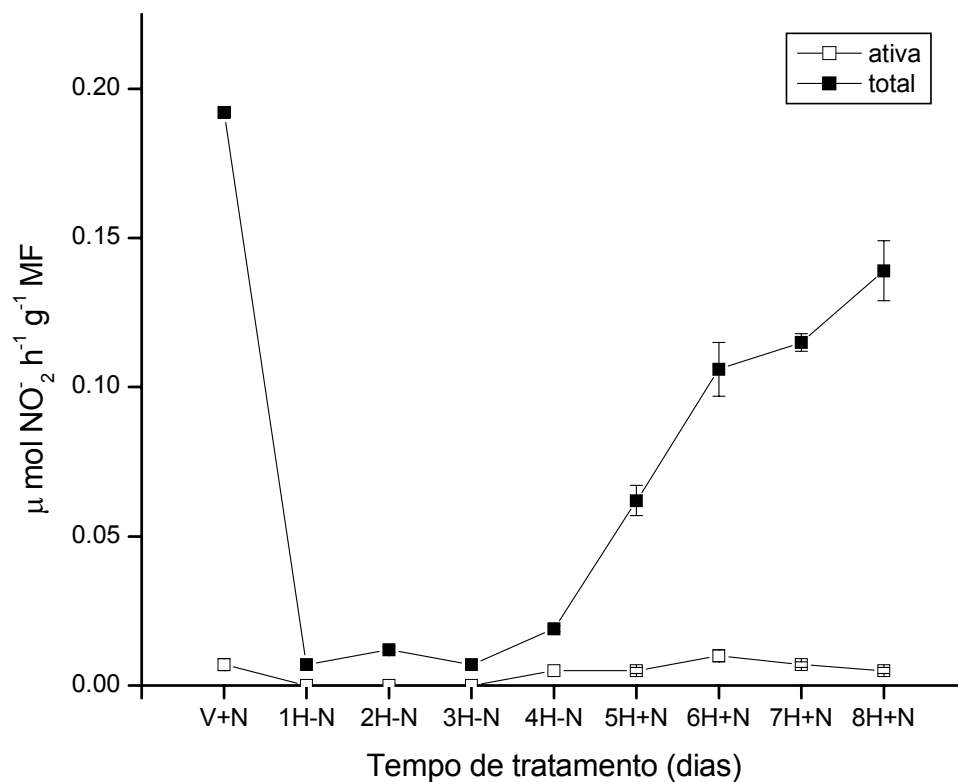


Figura 3. Atividade da RN *in vitro* (total e ativa) em raízes de plantas de soja não-noduladas, após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em vermiculita com NO_3^- (V+N) até o estágio V5, transferidas para hidroponia sem NO_3^- (H-N) por um período de quatro dias e com posterior recuperação do NO_3^- (H+N) por mais quatro dias. Barras=erro padrão, n=3.

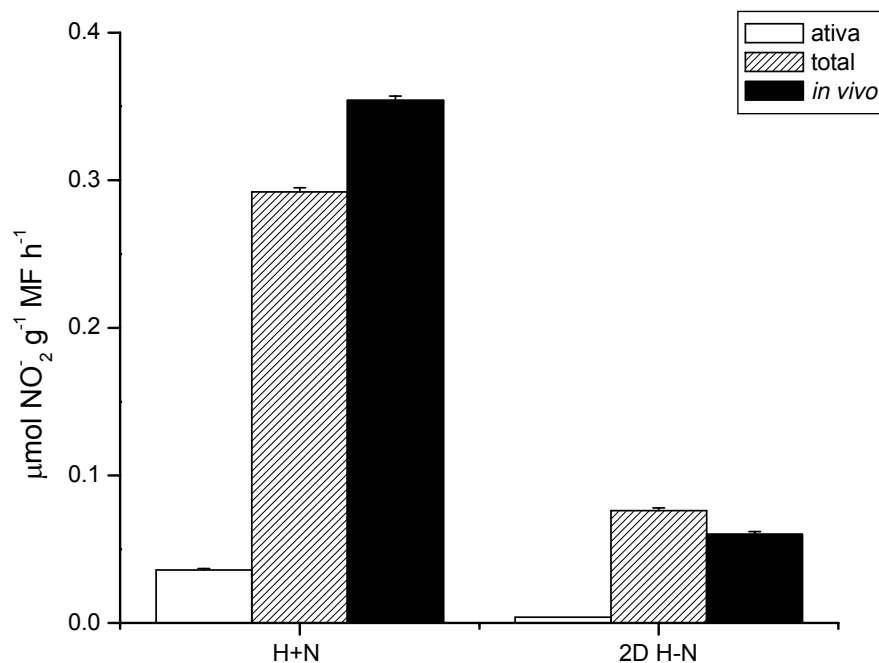


Figura 4. Atividade de RN *in vitro* (total e ativa) e RN *in vivo* em raízes de plantas de soja não-nodulada (V5). Plantas cultivadas em hidroponia mais NO₃⁻ (H+N) até o estágio V5 e, então, transferidas para hidroponia sem NO₃⁻ (H-N) por um período de 2 dias. Barras=erro padrão, n=3.

5.1.3. Atividade da RN em plantas de soja noduladas

Em soja a fixação simbiótica de nitrogênio dispensa o uso de N mineral e, portanto, as plantas noduladas nunca foram expostas ao nitrato. Já é conhecido que a transferência de plantas noduladas para o sistema hidropônico leva à inibição da fixação, provocando uma deficiência de N (Lima & Sodek, 2003).

Plantas de soja noduladas cultivadas em vermiculita com solução nutritiva -N (V-N) foram transferidas para um sistema hidropônico contendo solução nutritiva -N (H-N) por um período de 2 dias. Para a recuperação do estresse de nitrogênio as plantas foram transferidas para solução nutritiva +N (H+N), diluída em 1/3 (5 mM de NO_3^-), por mais quatro dias.

Na fig. 5 A, estão os resultados da atividade da RN *in vivo* e *in vitro* nas raízes. A atividade *in vivo* em raízes de plantas, cultivadas em V-N e no primeiro dia em H-N, foi ausente, provavelmente em função da ausência de NO_3^- , que é o substrato e indutor da RN (ver Discussão). A ausência da RN nesta fase está coerente com os dados da fig. 2, que mostra uma atividade extremamente baixa durante o cultivo da planta nodulada. No segundo dia em condições de H-N, observou-se um certo aumento da atividade da RN, porém, é importante salientar que foi uma baixa atividade quando comparada com os valores obtidos para as raízes de plantas transferidas para solução com NO_3^- (H+N). A transferência das plantas para H+N levou a uma alta indução da atividade da RN *in vivo* nas raízes, que se manteve até o quarto dia após o fornecimento de N. Os resultados das atividades da RN *in vitro* em raízes foram muito baixos, inferiores a $0,017 \mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, valores considerados inexpressivos, sem apresentar o mesmo perfil de atividade visto para o ensaio *in vivo*.

Em nódulos, de forma semelhante ao que foi observado em raízes, a atividade inicial foi praticamente ausente e com a transferência das plantas cultivadas sem nitrato (H-N) para H+N a atividade da RN *in vivo* foi altamente induzida (fig. 5 B). As atividades de RN *in vivo* e *in vitro*, nos nódulos de plantas cultivadas sem NO_3^- (V-N e H-N), embora tenham sido baixas (fig. 5 B), estão de acordo com os valores encontrados nos nódulos de plantas cultivadas em V-N (fig. 2), sugerindo a presença de uma RN constitutiva nesse tecido.

Uma comparação das atividades *in vivo* nas raízes e nódulos pode ser melhor vista na fig. 5 C. O perfil de indução foi semelhante em resposta à adição de nitrato, apesar das atividades serem mais altas no nódulo.

As atividades da RN *in vitro*, tanto nas raízes como nos nódulos, não apresentaram o mesmo perfil observado para a RN *in vivo* (fig. 5 A e B). Estes dados diferem do observado nos outros experimentos realizados com a enzima RN (fig. 2 e 4), onde as atividades *in vivo* apresentaram-se um pouco maiores quando comparadas aos valores *in vitro* e com perfis semelhantes.

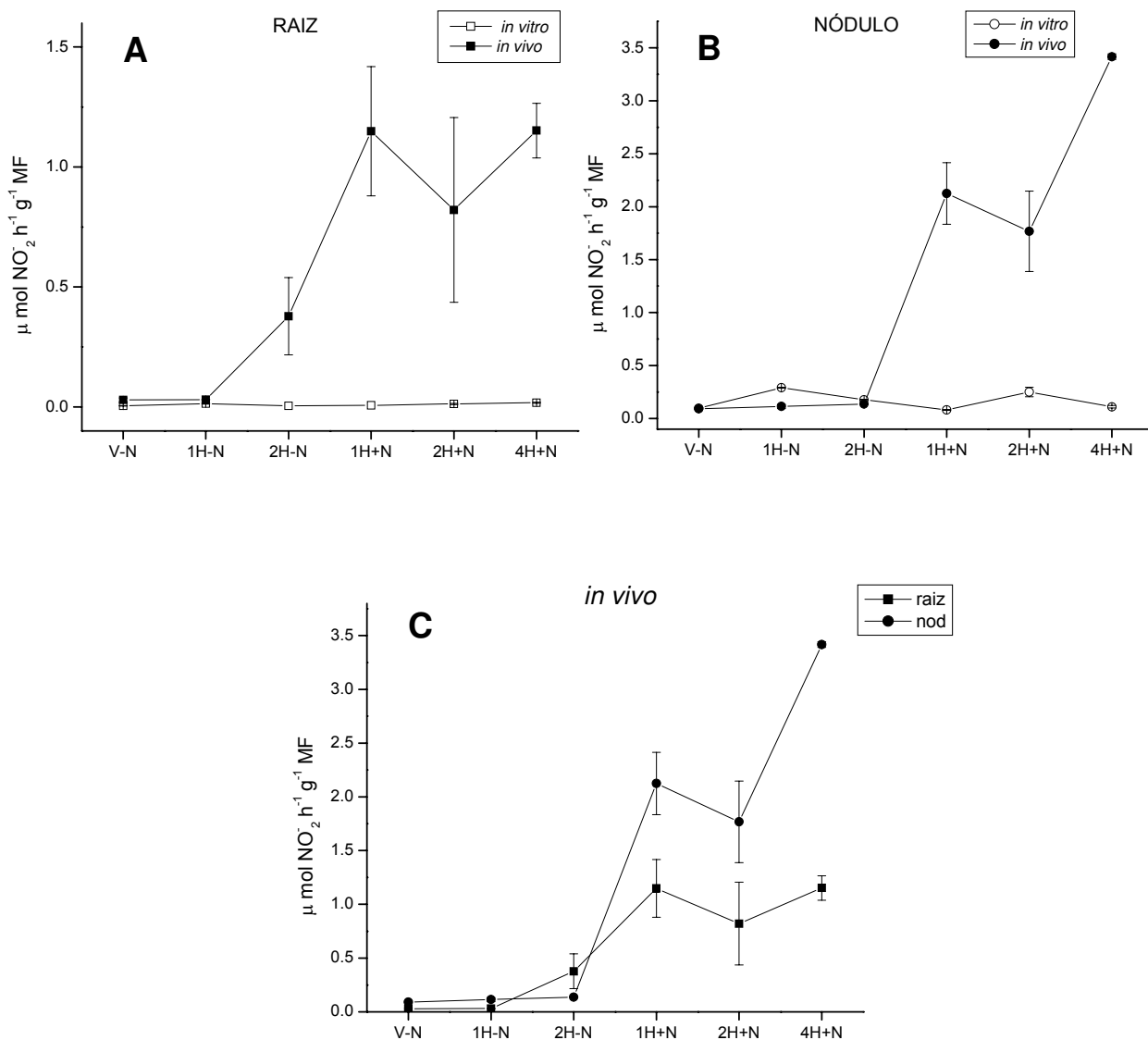


Figura 5. Atividade da RN *in vitro* e *in vivo* em raízes e nódulos de plantas de soja noduladas (R2) transferidas para hidroponia. Plantas cultivadas em vermiculita sem nitrato (V-N), transferidas para hidroponia sem nitrato (H-N) por 2 dias e então transferidas para hidroponia com nitrato (H+N) por mais 4 dias. **A:** raízes. **B:** nódulos. **C:** RN *in vivo* em raízes e nódulos. Barras=erro padrão, n=3.

Os resultados de outro experimento para analisar o efeito do NO_3^- sobre a atividade da RN em raízes e nódulos de plantas de soja cultivadas em V-N, estão expressos na fig. 6. Neste experimento, plantas de soja noduladas e em R2, cultivadas em V-N foram transferidas diretamente para a hidroponia + NO_3^- (H+N), uma vez que a atividade da RN não apresentou alterações em raízes e nódulos quando plantas cultivadas em V-N foram transferidas primeiro para H-N (ver fig. 5). As análises foram feitas com plantas em V-N e com 1, 2, 3, 4 e 6 dias em H+N.

Em raízes de plantas em V-N e com 1 dia em H+N, não houve atividade da RN *in vitro* e nem *in vivo*. A falta de atividade no 1º dia em H+N, talvez seja justificada pela necessidade de um período de adaptação das plantas, pois aqui as plantas tiveram que se adaptar simultaneamente a outro substrato e a outra solução nutritiva. A partir do segundo dia em H+N a RN *in vivo* foi induzida nas raízes. As atividades foram crescentes durante o período em H+N, ainda que tenham mostrado uma queda no dia 4, as atividades mantiveram-se altas quando comparadas às plantas em V-N (fig. 6 A). A discrepância, sem um motivo aparente, entre os valores das atividades *in vitro* e *in vivo* também foi observada para as raízes neste experimento (fig. 6 A).

O tratamento com nitrato (H+N) mostrou a indução da atividade da RN em nódulos de plantas de soja (fig. 6 B). No entanto não foram observadas atividades tão altas como no experimento anterior (fig. 5 B). Os ensaios *in vivo* e *in vitro* apresentaram valores bem próximos e comportamentos semelhantes, ao contrário do experimento anterior. Os nódulos das plantas cultivadas em V-N apresentaram atividade da RN, embora baixa, diferente do observado em raízes, que não apresentaram nenhuma atividade. Nos nódulos, a atividade da RN foi gradualmente crescente durante o período em que as plantas permaneceram em H+N. Uma

comparação das atividades *in vivo* entre raízes e nódulos pode ser vista na fig. 6 C, onde nota-se que a indução da RN nas raízes fica mais clara que nos nódulos. Em termos gerais, a resposta da RN ao nitrato foi semelhante à do experimento anterior, tendo havido indução da enzima e os nódulos de plantas em V-N apresentaram atividade, sugerindo a presença de uma RN constitutiva nesse tecido.

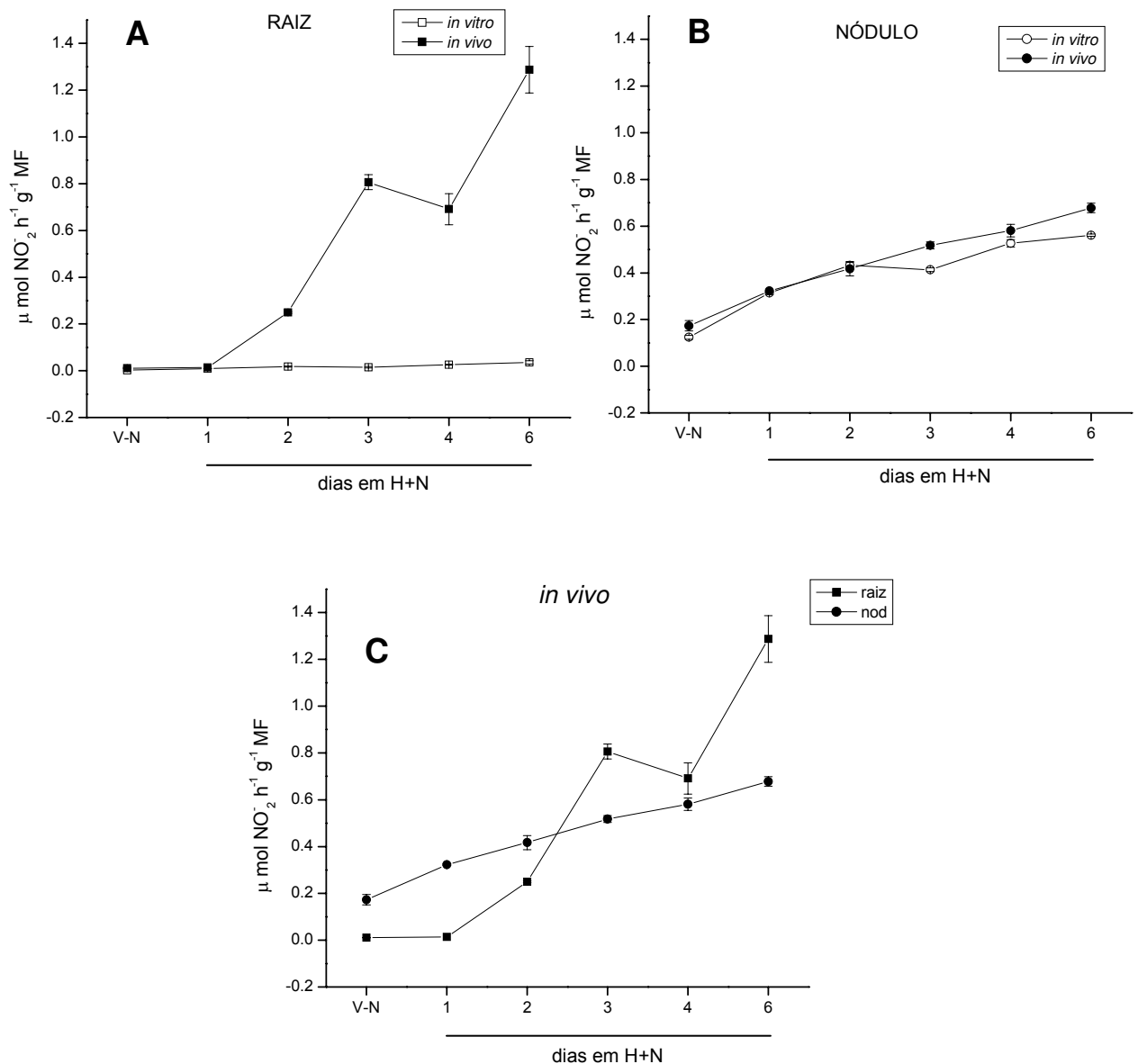


Figura 6. Atividade da RN *in vitro* e *in vivo* em raízes e nódulos de plantas de soja (R2) transferidas para hidroponia com nitrato (H+N). Plantas cultivadas em vermiculita sem nitrato (V-N) até o estágio R2 e, então, transferidas para H+N por 6 dias. **A:** raízes. **B:** nódulos. **C:** RN *in vivo* em raízes e nódulos. Barras=erro padrão, n=3.

5.1.4. Composição dos aminoácidos na seiva do xilema de plantas de soja não-noduladas sob a deficiência de nitrogênio e em plantas de soja noduladas transferidas para hidroponia com nitrato

Plantas não-noduladas

Na tabela 1 está apresentada a composição de aminoácidos na seiva do xilema de plantas não-noduladas durante o estresse de N e sua recuperação. As coletas dos aminoácidos foram feitas simultaneamente às coletas do material vegetal utilizado nos ensaios da atividade da RN em plantas de soja não-noduladas (fig. 3), portanto apresentando as mesmas condições experimentais.

Em plantas cultivadas em V+N a ASN foi o principal aminoácido transportado na seiva do xilema, representando cerca de 85% do total de aminoácidos. Quando as plantas foram transferidas para H-N observou-se um grande aumento na concentração de ASP e redução na concentração de ASN. Ao final de quatro dias em H-N as plantas apresentaram cerca de 30% de ASP contra 1,40% de plantas em V+N e a concentração de ASN caiu para cerca de 35%. Pequenos aumentos nas concentrações de GLU, SER e ALA também foram observados. Durante o tratamento de recuperação do N, após um dia da adição do NO_3^- ocorreu uma alta recuperação da concentração de ASN, aumentando para 67%, chegando a 81% no terceiro dia, enquanto a concentração do ASP decresceu para 5% no primeiro dia de H+N e atingiu 1,5% no terceiro. As concentrações de GLU, SER e ALA recuperaram seus valores em relação aos das plantas em V+N, no segundo dia após a adição do NO_3^- .

Tabela 1. Composição de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de soja não-noduladas (V5), sob deficiência de nitrogênio. Plantas cultivadas em vermiculita com NO_3^- (V+N) e transferidas para hidroponia sem NO_3^- (H-N) por um período de quatro dias e com posterior recuperação do NO_3^- (H+N) por mais quatro dias.

		1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias
	V+N	H-N	H-N	H-N	H-N	H+N	H+N	H+N	H+N
ASP	1.40	5.73	9.22	21.87	29.99	5.34	2.54	1.50	2.11
GLU	0.51	0.94	1.09	1.56	1.79	0.94	0.48	0.31	0.32
ASN	85.73	67.13	66.22	42.11	34.79	67.52	72.33	81.36	85.53
SER	0.39	2.09	1.45	2.35	3.06	2.41	0.44	0.32	0.18
GLN	1.94	3.07	4.02	6.56	5.32	5.80	10.39	5.64	2.83
HIS	1.35	2.04	1.68	1.75	1.27	1.09	1.13	1.28	1.17
GLY	0.52	1.40	1.27	1.93	2.04	1.42	0.99	0.66	0.54
THR	0.52	1.40	1.27	1.93	2.02	1.41	0.99	0.67	0.54
ARG	1.31	1.71	1.86	2.42	2.03	2.28	1.76	1.59	1.27
ALA	0.35	1.70	0.93	0.60	0.97	1.01	0.13	0.10	0.11
TYR	0.24	0.56	0.56	0.86	1.06	0.56	0.44	0.32	0.25
MET	0.11	0.39	0.29	0.58	0.47	0.28	0.31	0.07	0.09
VAL	1.32	2.92	2.79	3.87	3.75	3.43	2.87	2.01	1.72
PHE	0.59	1.10	0.99	2.34	2.53	1.15	1.11	0.70	0.43
ILE	0.65	1.63	1.71	2.19	2.14	1.14	1.04	0.73	0.66
LEU	0.84	1.87	1.52	2.09	2.19	1.18	1.38	1.03	0.77
LYS	1.02	1.78	1.64	3.02	2.34	1.54	1.30	1.41	0.94
GABA	1.20	2.54	1.49	1.97	2.24	1.51	0.38	0.30	0.55

Plantas noduladas

Também foi analisada a composição de aminoácidos da seiva do xilema de plantas noduladas cultivadas em V-N e transferidas para H+N por 6 dias (tabela 2). A coleta da seiva do xilema foi feita nas mesmas plantas utilizadas para os ensaios da atividade da RN (fig. 6).

Em plantas noduladas (V-N), os aminoácidos encontrados em maior concentração na seiva do xilema foram ASN e GLN, representando em torno de 49% e 29% do total de aminoácidos, respectivamente. Quando as plantas (V-N) foram transferidas para a hidroponia (H+N) observou-se uma diminuição acentuada da concentração de GLN e um aumento de ASN. Também notou-se um ligeiro aumento nas concentrações de SER, ALA e GABA, enquanto que a concentração de ASP diminuiu somente após o 3º dia em H+N (tabela 2). Aos 6 dias após a exposição ao nitrato, a concentração de ASN aumentou para 78%. As concentrações de GLN e ASP abaixaram para 2,78% e 2,95%, respectivamente. Essa proporção de aminoácidos na seiva do xilema é muito próxima daquela vista para plantas não-noduladas cultivadas com nitrato (ver tabela 1).

Tabela 2. Composição de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de soja noduladas (R2), após a transferência para hidroponia. Plantas cultivadas em vermiculita sem NO₃⁻ (V-N) e transferidas para hidroponia com NO₃⁻ (H+N) por um período de seis dias.

	C	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	6 dias
	V-N	H+N	H+N	H+N	H+N	H+N
ASP	7.79	11.63	6.22	5.60	2.27	2.95
GLU	1.01	6.89	3.74	3.61	2.02	0.61
ASN	48.98	52.89	56.96	59.92	57.74	78.28
SER	0.45	3.42	5.20	3.74	5.21	1.60
GLN	29.37	4.21	2.57	2.91	2.30	2.78
HIS	2.08	1.65	1.67	1.68	1.67	1.31
GLY	0.85	0.98	1.45	0.76	1.21	0.41
THR	1.29	1.50	2.22	1.16	1.85	0.63
ARG	1.53	2.67	0.88	0.46	0.35	0.73
ALA	0.30	2.46	3.59	3.26	3.87	0.45
TYR	0.24	0.36	0.56	0.58	0.59	0.34
MET	0.21	0.54	0.56	0.63	0.72	0.53
VAL	1.07	1.89	5.22	5.12	6.81	2.26
PHE	0.25	0.49	0.62	0.64	0.92	0.81
ILE	0.45	0.85	2.73	2.69	3.96	1.18
LEU	0.40	0.71	2.26	2.16	2.82	0.72
LYS	2.15	1.70	0.75	1.05	0.56	0.52
GABA	1.59	5.18	2.78	4.02	5.13	3.89

5.2. Efeito da deficiência do N sobre a expressão gênica da asparagina sintetase (AS) em plantas de soja.

A fig. 7 mostra a atividade da AS em extratos de raízes e nódulos de plantas de soja (em R2) cultivadas em vermiculita -N e em extrato de cotilédones de plantas de soja com cinco dias de germinação. Nas raízes, a atividade da AS foi muito baixa em comparação com as atividades obtidas nos nódulos e cotilédones, o que impossibilita os estudos da atividade dessa enzima nesse tecido. As maiores atividades obtidas nos nódulos e cotilédones comprovam que a baixa atividade nas raízes não pode ser atribuída a problemas do ensaio enzimático.

Para contornar as dificuldades com a dosagem de AS nas raízes de plantas de soja utilizamos a técnica de *Northern Blot*, uma das técnicas de biologia molecular, que permiti estudar a expressão do gene que codifica a enzima.

Nos experimentos de expressão gênica da AS no sistema radicular de plantas de soja, foram estudados três genes homólogos que codificam a enzima AS em soja, SAS1, SAS2 e SAS3. As seqüências dos cDNAs e a posição dos primers utilizados para a construção das sondas de SAS1, SAS2 e SAS3 estão apresentadas nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

Para comprovar a especificidade das sondas, foram utilizados cDNAs de clones de SAS1, SAS2 e SAS3 em análises de *Southern Blot* (fig. 11). Os cDNAs dos três genes foram amplificados em reação de PCR e então transferidos para membranas de nylon-N+ (ver item 4.6.16 em Material e Métodos). Cada membrana continha os três clones SAS1, SAS2 e SAS3, indicados por 1, 2 e 3, respectivamente, na fig. 11. Cada membrana foi hibridizada com uma sonda gene-específica. A membrana **A** foi hibridizada com a sonda de SAS1, a **B** com a sonda

para SAS2 e a **C** com a sonda de SAS3. A especificidade foi confirmada, uma vez que cada sonda reconheceu apenas uma banda, como mostra a fig. 11.

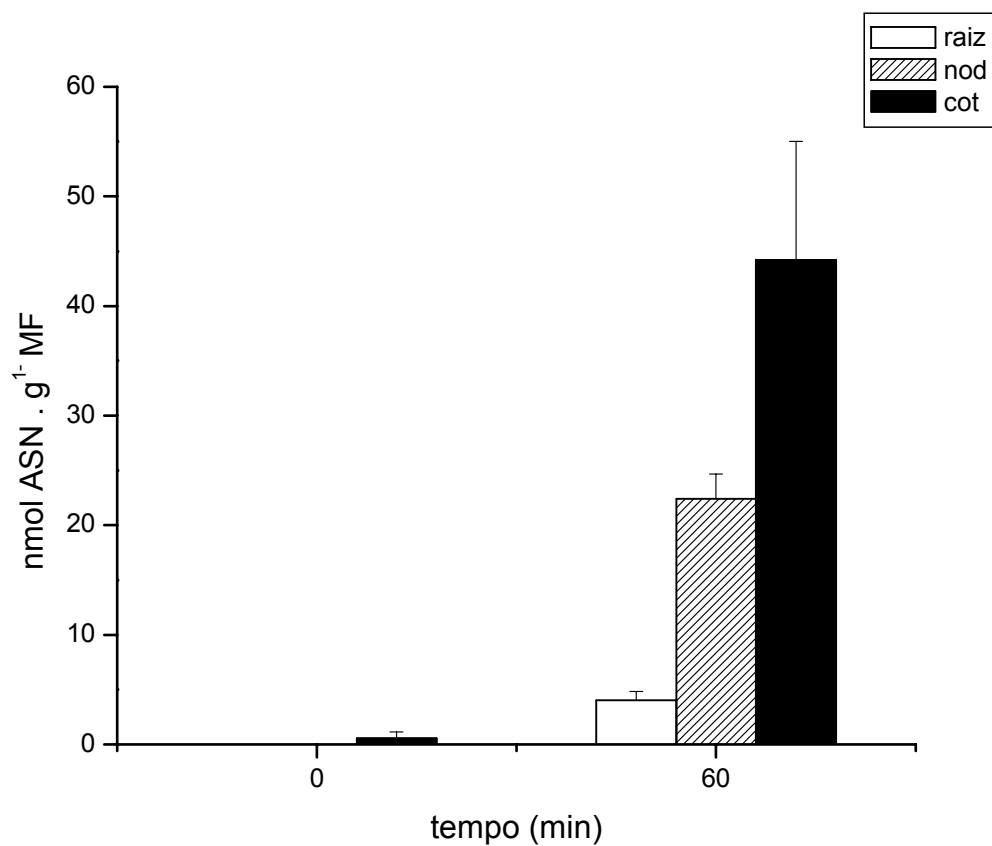


Figura 7. Atividade da AS em extratos de raízes e nódulos de plantas de soja (R2) cultivadas em vermiculita -N e em extrato de cotilédones de plantas de soja com cinco dias de germinação. Barras=erro padrão, n=3.

```

0001 ggggcattgg attctcacca acgtttgcgt tactcaagcc gacattctcg cttccgttgg
0061 aaccgttctt cgtgttctcc attccctctc tcaactcctc atctacttca catattatat
0121 catcacatat catagtata tcatatcaca atgtgtggca tacttgctgt gcttgggtgc
0181 tctgattcat ctcaagccaa aagggtccgc gtccttgagc tttctcgagc attgaagcac
0241 cgtggtcctg actggagtgg gctccaccaa tatgggtgata actatttggc tcatcaacgg
0301 ttagccatag ttgatccagc ttctggtgat caaccctct tcaatgaaga caaaactgtt
0361 gttgttacgg tgaatggaga gatctacaat catgaagaac tcaggaaaca attgcctaatt
0421 cacaccttcc gtacaggaag tgattgtgat gttattgctc acctgtatga ggagcacgga
0481 gaaaacttta tggacatgct tgatggtata tcttcatttg ttctgctgga tactcgtgac
0541 aacagtttta tagtggcgcg ggatgcaatt ggggtcactt ccttgtagat tgggtggggg
0601 ttagatggct ctgtctggat ttcctctgaa ttgaaggggt tgaatgatga ttgcgaacat
0661 tttgagtctt ttccacctgg tcaattgtat tctagcaaag agagagcgtt ccgcagatgg
0721 tacaatcctc catggttgct tctggctatt ccatctgccc cttatgatcc tcttgctttg
0781 agacatgctt ttgagaagct gtggataaaa aggttgatga ctgatgtgcc ctttgggtgtt
0841 ttgctctctg gaggtttgga ctcttcattg gttgcagccg tcacggctcg ctacctggca
0901 ggcacaaaag ctgcgaagca atggggaact aaattacact ctttctgtgt aggccttgag
0961 ggtgcacccg acctaaaggc tacaaggaa gtagcagagt acataggaac tgtccatcat
1021 gaatttcaact aactgttca ggatggcata gatgccatcg aagatgtgat ctatcacatt
1081 gagacatatg atgtgacaac aattagagca agcattccca tgtttcttat gtctcggaag
1141 atcaagtcat tgggagtcaa atgggttatc tctggagaag gatctgatgt tttttttgga
1201 gggatatctat atttccacaa ggcacccaac aaagaagagt tccaccaaga aacatgccgc
1261 acaattattg tactccacag gtatgattgc tcgcgagcca ataaatcgac ctttgtctgg
1321 ggtctagaag ccagagtacc atttttggac aaagagttha tcagagttgc aatgaacatt
1381 gatcctgagt gtaaaatgat aaaaaaggaa gaagggcgaa ttgagaaatg ggcaactgag
1441 agggcctttg atgatgaaga acatccttat ctgccaaagc acattttata taggcagaaa
1501 gaacaattca gtgatggagt tggctatggt tggattgatg gccttaaagc tcatgctgag
1561 aaacatgtga ctgacagaat gatgctcaat gctgccaaca ttttcccctt caacactcca
1621 accaccaaag aagcatacca SAS1-2.1 ctatagaatg atatttgaga ggttcttccc tcagaactca
1681 tgcaggetca ctgttctctg aggaacaagt gttgcatgta gcacagcaaa agctgttgag
1741 tgggatgctg cttgggtctaa caaccttgat ccatcaggta gagcagcact tggagtgcatt
1801 gcatcagctt atggaaacca ggtcaaagct gtagaaccag agaagatcat acccaagatg
1861 gaagtttctc cactaggagt tgccatatag agctagtatg agccatagca aggactagta
1921 gttgccctag aaccagcata tattattatt atactaatca tcaaatcatg SAS1-2.2 aaacatcagg
1981 ttgctttgta gttatccagg gaatggtata taaatagata aggatctcta tctatctggc
2041 tctctttctg ggccaccag atctagcctc aacttgcttt cgatgtcacc tgatgcacaa
2101 tcataaag

```

Figura 8. Sequência de nucleotídeos do clone de cDNA de SAS1. Os primers estão em vermelho e sinalizados com setas. Os códons de iniciação e terminação estão sublinhados.

```

0001 ggcacgagct tcaacttcac ccattcatac gtggtgttgt tactgctgct cttttctctt
0061 ttctttttctc ttttagttctc tcttccctt tctttttctt tttcttcttc ttctgagctt
0121 gtttaagctt tccttccatt aacatattat cacaatgtgt ggtattcttg ctgttcttgg
0181 ttgttctgat gactctcgag ccaaaagggg ccgcgtgctt gagctctctc gcagattgaa
0241 gcaccgtggc cctgactgga gtgggctcca tcaacatggg gactgctttt tggcacatca
0301 acggttagcc atagttgatc ctgcttcttg ggatcaacct ctctttaacg aggacaaatc
0361 cgtcattggt acggtaaatg gagagattta caacatgaa gagctcagga aacagctgcc
0421 taatcacaac ttccgaactg gaagtgattg tgatgttatt gcacacctgt acgaggaaca
0481 tggagaagac tttgtggaca tgctggatgg tatcttctca tttgttctac tggacacccg
0541 tgacaacagt tttatagtgg ctcgggatgc tattgggggc acttccttgt acattggatg
0601 gggggttagat ggctctgttt ggatttcac agaaatgaaa ggctgaatg atgattgtga
0661 acacttttag tgttttcac ctggtcactt gtactctagc aaagaaagag ggttccgcag
0721 atggtacaat cctccttggg tctctgaggg tattccatct gcccttatg atcctcttgt
0781 tttaagacac gcctttgagc aggcagtcac aaaaagggtg atgactgatg tgccttttgg
0841 tgttctactc tctggagggt tggactcttc tttggttgca tccatcactt ctcgttactt
0901 ggccaacaca aaggctgctg agcagtgggg atcaaagtta cattcattct gtgtaggcct
0961 tgagggctca ccagatttga aggctgcaaa agagggtgct gactatctag gcaactgtcca
1021 ccatgagttt accttactg ttcaggatgg aatagattcc attgaagatg ttatctacca
1081 tattgaaaca tatgatgtga ctacaattag agcaagcaca cctatgtttc tcatgtctcg
1141 gaagattaaa tcacttgggt tcaaagggg tatctcagga gaaggatctg atgagatctt
1201 tggagggtat ttgtacttcc acaaggcacc caacaaggag gagttccaca gagaaacatg
1261 ccgcaagatc aaagcacttc accaatatga ttgcttgcca gccataaat caacatttgc
1321 ttgggggtcta gaagcccgtg taccattttt ggacaaggcg tttatcaatg ctgcaatgag
1381 tattgacctt gagtggaaga tgataaaaag agatgaagga cgaattgaga agtggattct
1441 gaggagagcc tttgatgatg aagagcatcc ttatctgcca aagcacattt tatacaggca
1501 gaaagaacaa ttcagtgatg gagttggcta tagttggatt gatgccctta aggcccatcc
1561 tccaaaacat gtgactgaaa aaatgatgct taatgctggg aacattttacc cccacaacac
1621 cccaaaaacc aaggaagcat SAS2-1.1 attactacag aatgatcttt gagaggttct tccctcagaa
1681 ctgagctagg ctactgttc ctggaggagc aagtgtgca tgtagcacag ccaaagctgt
1741 tgagtgggat gctgcttggg ctaacaacct tgatccctct ggtagagcag cacttggagt
1801 gcacatttca gcctatgaaa accagaacaa caagggtgta gaaattgaga agataatacc
1861 tatggatgct gctccccttg gtgttgccat ccagggttaa tacaaagatg tgacaaagaa
1921 tttgggcgac aatgaagata actaagctaa aggtgaatga aaaatttgcc tgcagtgtaa
1981 tttcatctgg gcaaagcttt tatagtttat agttataagg ctttctcaaa aagtgttgcg
2041 tattgtatta tcttgaatgc tgtgatttga agtcttaata SAS2-1.2 aaagtgtttc ctttatcagt
2101 tcccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

Figura 9. Sequência de nucleotídeos do clone de cDNA de SAS2. Os primers estão em vermelho e sinalizados com setas. Os códons de iniciação e terminação estão sublinhados.

gagaagtggg attacgcaat gcatttgatg acgataagaa tccatattta ccaaagcaca
 tattgtacag gcagaaggaa caattcaagt atgggggttg ttacagctgg attgatgggc
 ttgaaggatc acgcaaaca acaagtcaca gatgcgacga tgatggctgc caattttatt
 taccctgaaa acttcctacc tcaaagaagg atacctctac aggacaattt ttgagaagtt
 ctttccaaag aatgcagcaa aggcaacagt gccaggaggt cctagtgtgg catgcagtac
 tgcaaaagct gtggaatggg atgcagcatg gtcaaaaaat cttgatcctt ctggtcgtgc
cgcacttggt attcatgatg ctgcatatga tgcagtggat accaaaattg ac

Figura 10. Sequência incompleta de nucleotídeos de um cDNA de SAS3. A sequência dos primers está em vermelho e sinalizada com setas.

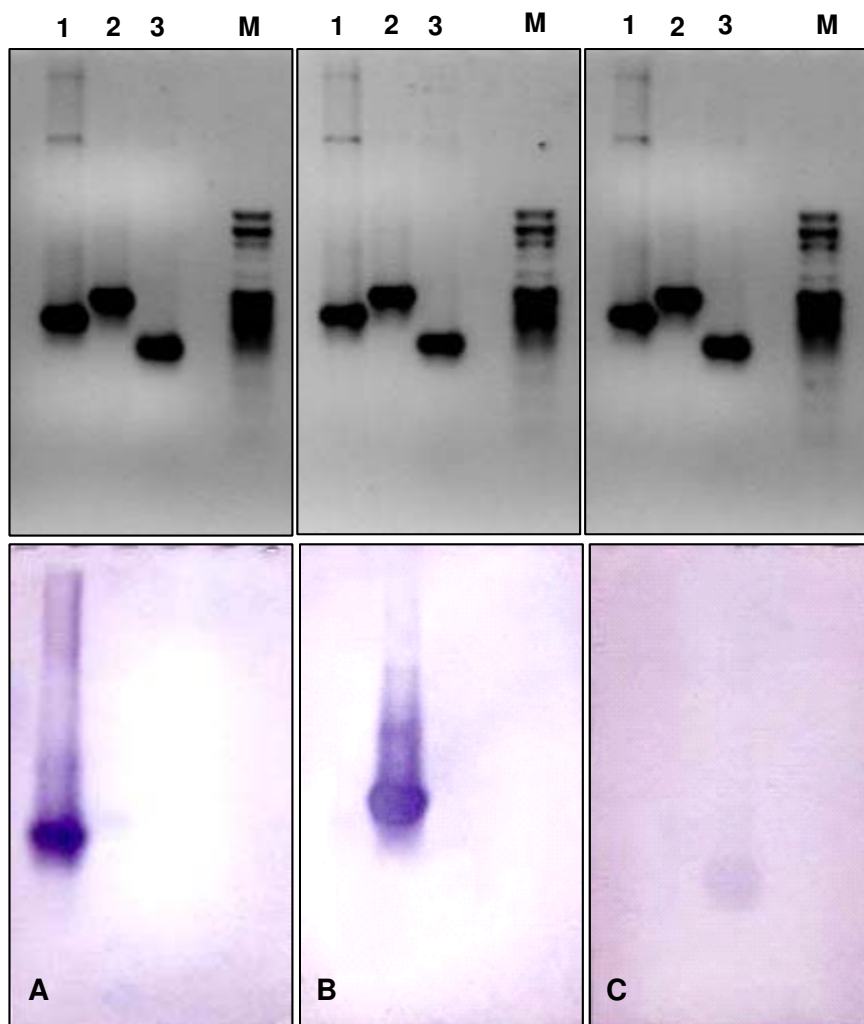


Figura 11. Análises de *Southern Blot* para comprovar a especificidade das sondas. cDNAs dos clones dos genes SAS1, SAS2 e SAS3, indicados por 1, 2 e 3, foram hibridizados com suas respectivas sondas gene-específicas. **A:** SAS1; **B:** SAS2; **C:** SAS3. **M:** marcador molecular 100 bp *ladder* (Biotoools).

5.2.1. Efeito da deficiência do N sobre a expressão gênica da AS e a composição da seiva do xilema de plantas de soja não-noduladas.

A fig. 12 mostra a expressão dos três genes analisados, SAS1, SAS2 e SAS3, em raízes de plantas de soja não-noduladas durante o estresse de N e sua recuperação. As condições experimentais deste ensaio foram as mesmas descritas para o ensaio com a RN (item 5.1.2).

Quando as plantas cultivadas em V+N foram transferidas para H-N observou-se uma queda na expressão dos três genes. As expressões de SAS1 e SAS3 foram gradualmente diminuindo até ao ultimo dia do tratamento sem nitrato (H-N). Para o gene SAS2 não foi possível detectar expressão durante a deficiência do N, possivelmente por apresentar um nível bem inferior aos de SAS1 e SAS3. Um dia após a recuperação do N, a expressão dos três genes aumentou, apresentando níveis muito semelhantes aos das plantas em V+N. Estes níveis mantiveram-se até o terceiro dia, mostrando um ligeiro aumento no 4º dia. O mesmo comportamento de expressão foi observado para os três genes avaliados, ainda que os níveis de expressão tenham sido diferentes, o gene SAS1 apresentou a maior expressão e o menor nível foi observado para SAS2.

Além da variação na expressão dos genes é importante destacar o alto grau de expressão nas raízes do controle (antes do tratamento), pois indica claramente a presença da enzima neste tecido apesar da sua atividade ser muito baixa neste tecido (ver fig. 7).

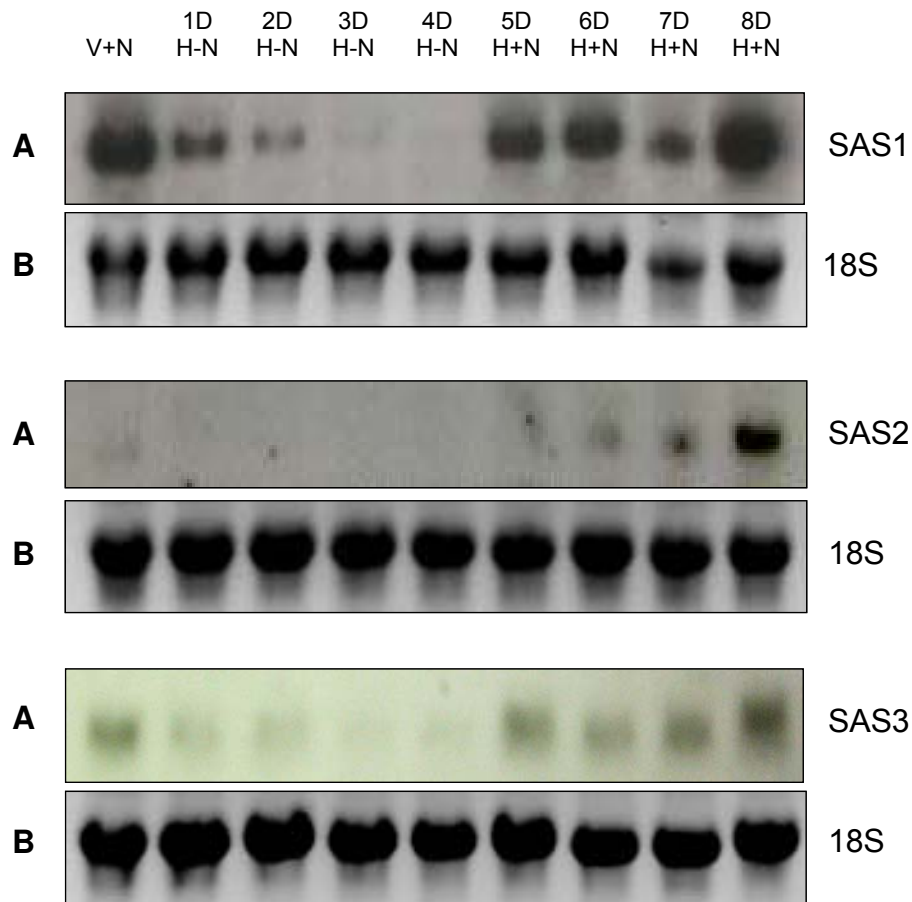


Figura 12. Análise mediante *Northern Blot* da expressão gênica de SAS1, SAS2 e SAS3 em raízes de plantas de soja não noduladas (V5), sob deficiência e recuperação do N. RNA total (15 µg) foi extraído de raízes de plantas de soja cultivadas em V+N, e transferidas para hidroponia sem NO_3^- (H-N) por um período de quatro dias e com posterior recuperação do NO_3^- (H+N) por mais quatro dias. **(A)** Sondas específicas, foram utilizadas para detectar os mRNAs. **(B)** Migração do rRNA 18S em gel de agarose.

Na tabela 3 estão as análises da composição de aminoácidos na seiva do xilema das plantas de soja sob a deficiência do N, utilizadas para os estudos de expressão gênica da AS.

Nas plantas de soja não-noduladas cultivadas em V+N a ASN foi o aminoácido encontrado em maior concentração, cerca de 75%. Observa-se novamente que quando as plantas são submetidas à deficiência do N (transferidas para H-N), ocorre um aumento da concentração de ASP e redução da concentração de ASN. O aumento da razão ASP/ASN ocorreu logo no primeiro dia de tratamento, sendo crescente até ao quarto dia, onde a concentração de ASP apresentou-se com 53,86% contra 3,23% das plantas em V+N, e a concentração de ASN caiu de 75,17% para 4,55%.

Já no primeiro dia de recuperação do nitrato, a concentração de ASN aumentou para 74,98%, retomando o valor encontrado nas plantas cultivadas em V+N. O ASP chegou a uma concentração de 7,10%, que foi diminuindo ligeiramente durante a recuperação do N, atingindo 3,30% no quarto dia.

No quarto dia de recuperação do N, a ASN apresentou a maior concentração 77,94%, até mesmo superando o valor encontrado nas plantas em V+N. Este dado está de acordo com o observado para a expressão gênica da AS que no mesmo dia de tratamento mostra-se ligeiramente maior.

Os dados desse experimento confirmam as observações anteriores, sobre as alterações na composição da seiva do xilema, especialmente um grande aumento na razão ASP/ASN, quando plantas de soja não-noduladas são submetidas à deficiência de N.

Tabela 3. Composição de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de soja não-noduladas (V5), sob deficiência e recuperação do N. Plantas cultivadas em vermiculita com NO_3^- (V+N) e transferidas para hidroponia sem NO_3^- (H-N) por um período de quatro dias e com posterior recuperação do NO_3^- (H+N) por mais quatro dias.

		1dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias	8 dias
	V+N	H-N	H-N	H-N	H-N	H+N	H+N	H+N	H+N
ASP	3.23	30.17	36.87	53.20	53.86	7.10	5.11	5.83	3.30
GLU	2.04	0.84	2.61	5.98	5.56	0.78	1.22	1.15	1.56
ASN	75.17	41.44	17.32	2.70	4.55	74.98	64.31	70.33	77.94
SER	1.10	1.15	4.45	5.19	4.70	2.42	2.75	0.92	1.71
GLN	2.92	2.16	1.81	0.74	0.62	0.98	2.94	2.16	2.50
HIS	2.45	3.09	2.49	0.55	0.35	1.21	2.31	2.45	0.93
GLY	1.82	2.55	4.70	3.10	2.34	1.83	2.02	1.84	1.05
THR	1.91	2.66	4.90	3.24	2.49	1.92	2.12	1.92	1.10
ARG	1.00	1.64	2.35	2.19	2.31	1.63	1.93	1.44	4.45
ALA	0.64	0.47	2.64	3.71	3.00	0.44	0.54	0.52	0.52
TYR	0.36	0.62	0.78	0.79	0.69	0.26	0.79	0.37	0.10
MET	0.11	0.25	0.28	0.06	0.10	0.06	0.17	0.08	0.02
VAL	2.33	3.79	3.56	2.07	3.31	1.98	4.45	3.59	1.19
PHE	1.04	1.33	1.88	1.19	0.90	1.12	1.96	1.17	0.78
ILE	0.85	1.70	1.57	1.14	2.00	0.67	1.53	1.11	0.50
LEU	1.04	1.94	2.26	2.98	2.45	0.87	2.42	1.41	0.47
LYS	1.40	3.36	3.63	2.79	2.46	1.04	1.98	2.06	0.35
GABA	0.58	0.83	5.89	8.38	8.31	0.72	1.47	1.67	1.53

5.2.2. Efeito da deficiência do N sobre a expressão gênica da AS e a composição da seiva do xilema de plantas de soja noduladas.

Plantas de soja noduladas quando transferidas para hidroponia reduzem sua capacidade de fixação do N₂. Lima & Sodek (2003) mostraram que plantas de soja noduladas em hidroponia recuperaram sua capacidade de fixação quando transplantadas para a vermiculita. Ou seja, em plantas noduladas existe uma situação análoga àquela de plantas não-noduladas estudadas no experimento anterior, quando sofrem impedimento e posterior recuperação do sistema assimilatório de nitrogênio.

Portanto, no experimento apresentado na fig. 13, a expressão dos genes SAS1, SAS2 e SAS3, foi analisada em raízes e nódulos de plantas de soja (R2) cultivadas em V-N, transferidas para H-N por um período de quatro dias e, então, transplantadas para vermiculita (R-N) por mais sete dias. Ao longo do experimento foram feitas 3 coletas de plantas em V-N: uma no início do tratamento, a segunda com quatro dias e a terceira no último dia, junto com as plantas com sete dias de transplântio.

Nas raízes, a expressão do gene SAS1 foi muito baixa, apresentando sinais bem tênues em todos os dias de tratamento. Apenas no segundo dia em H-N foi possível detectar níveis expressivos de SAS1.

Os níveis de expressão do gene SAS2 foram maiores que os do gene SAS3 nas raízes, ainda que tenham apresentado o mesmo perfil.

Levando em consideração a relação da expressão do gene com a quantidade de RNA total presente na membrana, apenas no segundo dia de H-N, a expressão gênica de SAS1, SAS2 e SAS3 nas raízes parece ser maior quando comparada aos outros dias do tratamento.

Nas raízes de plantas de soja noduladas foi detectada a expressão gênica dos três homólogos codificadores de AS.

Em nódulos, os níveis de expressão não diferiram entre os três genes avaliados, apresentando-se ligeiramente maiores para o gene SAS2.

A transferência das plantas em V-N para a H-N afetou apenas a expressão do gene SAS1, nos nódulos. Logo no primeiro dia em H-N a expressão de SAS1 diminuiu em relação às plantas em V-N. Durante os 4 dias em H-N a expressão manteve-se baixa. Quando as plantas foram transplantadas de volta para a vermiculita (R-N), os níveis de SAS1 não aumentaram, continuaram baixos como os observados nos nódulos das plantas em H-N.

A expressão gênica de SAS2 e SAS3 nos nódulos não foi afetada pelo tratamento. Os níveis mantiveram-se os mesmos tanto para as plantas em V-N, como para as transferidas para H-N e as transplantadas em vermiculita (R-N).

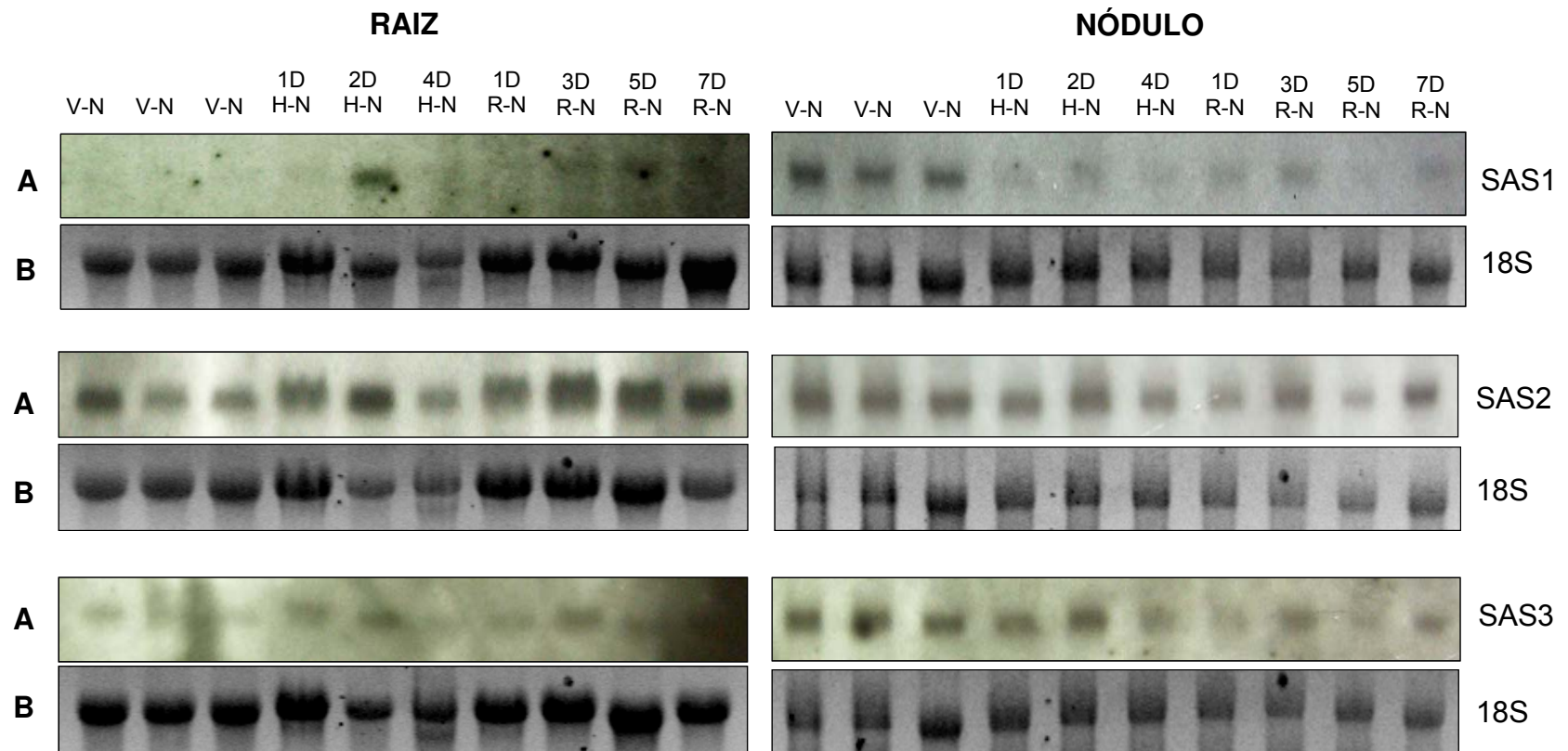


Figura 13. Análise mediante *Northern Blot* da expressão gênica de SAS1, SAS2 e SAS3 em raízes e nódulos de plantas de soja noduladas (R2), cultivadas em V-N e transferida para H-N, por quatro dias e posterior transplante para vermiculita sem nitrogênio (R-N). RNA total (15 µg) foi extraído de raízes e de nódulos. (A) Sondas específicas, foram utilizadas para detectar os mRNAs. (B) Migração do rRNA 18S em gel de agarose.

A tabela 4 mostra a composição dos aminoácidos na seiva do xilema das plantas de soja noduladas, utilizadas para as análises da expressão gênica da AS.

Os aminoácidos encontrados em maior concentração na seiva do xilema das plantas noduladas cultivadas em V-N, foram ASP, ASN e GLN. As concentrações de ASP foram sempre mais altas que as da ASN nos três controles (1 C, 2 C e 3 C). No primeiro e segundo controles, a ASN foi o segundo aminoácido mais encontrado representando cerca de 32% e 23% do total, respectivamente, e a GLN apareceu com aproximadamente 15% nos dois controles. No terceiro controle, as concentrações de ASP, ASN e GLN não diferiram muito entre si, porém a GLN foi o aminoácido mais transportado via xilema com 29% do total, ASP com 27% e ASN 20%.

Quando as plantas (V-N) foram transferidas para a hidroponia sem nitrato (H-N) a concentração da GLN diminuiu em todos os dias do tratamento, sugerindo a redução da fixação do N_2 . Durante o tratamento em H-N, o ASP foi o aminoácido mais transportado via xilema. No primeiro dia em H-N, a porcentagem de ASN reduziu bruscamente atingindo cerca de 3% dos aminoácidos e o ASP teve um grande aumento, 78%. No 2° e 4° dias em H-N, não foi possível observar grandes alterações nas concentrações de ASN e ASP, quando comparadas às concentrações observadas no primeiro e segundo controles (1 C e 2 C).

Após quatro dias em H-N, as plantas foram transplantadas para vermiculita por sete dias, na tentativa de recuperar a fixação do N_2 . Contudo, parece que este tratamento não foi eficiente. A GLN não recuperou sua concentração em nenhum dos dias analisados. Apenas no quinto dia apresentou um valor mais alto, cerca de 9%, sendo esta porém uma concentração baixa se comparada aos valores das plantas em V-N (1C, 2C e 3C). As concentrações de ASP e ASN foram muito variáveis

durante os dias de transplântio, independente das variações, o ASP continuou sendo o aminoácido mais abundante na seiva do xilema. No primeiro e sétimo dias, o ASP teve concentrações elevadas, cerca de 70% e 62%, respectivamente, já a ASN apresentou valores bem reduzidos, cerca de 8% no 1º dia e 14% no 7º. Nos dias 3 e 5, as concentrações de ASN e ASP foram muito próximas às observadas nas plantas em V-N (1 C e 2 C), ainda que no 5º dia a concentração de ASP tenha apresentado um valor um pouco maior, cerca de 50% contra 42% do 2 C.

A tentativa de recuperar a atividade no nódulo, transplantando as plantas para vermiculita por sete dias, parece não ter sido eficiente. As concentrações de GLN na seiva do xilema não aumentaram e a expressão do gene SAS1 também não igualou-se aos níveis observados nas plantas em V-N.

Tabela 4. Composição de aminoácidos (mol%) na seiva do xilema de plantas de soja noduladas, cultivadas inicialmente em vermiculita sem nitrato (V-N) e transferidas para hidroponia sem nitrato (H-N) por quatro dias, e posterior transplântio para vermiculita (R-N) por sete dias.

	1C	2C	3C	1 dia	2 dias	4 dias	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias
	V-N	V-N	V-N	H-N	H-N	H-N	R-N	R-N	R-N	R-N
ASP	36.31	42.09	27.46	78.40	43.61	30.72	70.47	40.05	50.61	62.02
GLU	0.42	1.14	1.41	6.82	3.97	1.78	1.89	1.32	0.56	4.94
ASN	32.03	23.55	20.80	3.36	22.80	28.79	8.58	33.30	21.71	14.99
SER	0.47	0.94	1.17	0.66	3.57	2.63	1.20	1.02	1.01	2.06
GLN	14.32	15.28	29.27	2.43	6.24	7.72	3.41	6.51	9.69	2.95
HIS	2.27	1.72	2.89	0.48	1.57	1.93	0.84	2.03	1.86	1.38
GLY	1.08	1.19	0.91	0.31	1.14	1.24	0.84	0.92	1.25	1.06
THR	1.74	1.73	2.23	0.41	2.47	2.66	0.93	1.36	1.69	1.35
ARG	1.89	2.56	3.76	0.68	2.19	1.82	0.82	1.08	1.26	1.54
ALA	0.22	0.95	1.06	0.62	2.08	1.32	0.90	0.69	0.39	1.00
TYR	0.53	0.30	0.30	0.15	0.51	1.04	0.26	0.54	0.48	0.36
MET	0.17	0.12	0.09	0.05	0.18	0.50	0.13	0.22	0.15	0.09
VAL	1.85	1.72	1.35	0.58	2.17	4.99	2.81	3.93	3.27	1.59
PHE	0.48	0.40	0.31	0.19	0.54	1.16	0.43	0.84	0.44	0.39
ILE	0.99	0.86	0.65	0.24	1.13	3.74	2.17	2.46	1.89	0.70
LEU	0.70	0.49	0.48	0.27	0.80	3.81	1.17	1.15	0.86	0.52
LYS	3.62	3.32	4.71	1.29	2.20	1.71	0.91	1.35	2.04	1.56
GABA	0.92	1.64	1.15	3.05	2.82	2.45	2.23	1.22	0.83	1.47

5.2.3. Efeito do nitrato na expressão gênica da AS em plantas de soja noduladas

Foi avaliado o efeito do NO_3^- na expressão gênica da AS em raízes e nódulos de plantas de soja, pois no experimento com plantas não-noduladas (item 5.2.1 / fig 12) o nitrato teve um efeito claro sobre a expressão dos genes que codificam a AS. Neste experimento, plantas de soja noduladas (R2), cultivadas em V-N foram irrigadas com solução nutritiva +N. Os materiais vegetais (raízes e nódulos) foram coletados 1 e 2 dias após o tratamento com nitrato.

Na fig. 14 estão as análises de *Northern Blot* da expressão dos genes SAS1, SAS2 e SAS3. Os três genes apresentaram uma expressão muito baixa nas raízes das plantas noduladas cultivadas em V-N. Um dia após receberem solução com nitrato, a expressão dos três genes aumentou. No segundo dia de tratamento, os níveis de expressão foram elevados, porém com uma intensidade ligeiramente menor quando comparados aos do primeiro dia de tratamento.

Nos nódulos das plantas cultivadas em V-N, detectou-se a expressão dos três genes. Quando as plantas receberam solução com nitrato (V+N), os níveis de expressão nos nódulos mantiveram-se semelhantes aos encontrados nas plantas em V-N. A expressão dos genes para AS em nódulos de plantas de soja parece não ser afetada pelo tratamento com nitrato.

A baixa expressão gênica da AS nas raízes antes do tratamento com nitrato não parece estar de acordo com os dados do experimento anterior (fig. 12) onde a expressão de SAS2 e SAS3 não foi tão baixa nas raízes do controle.

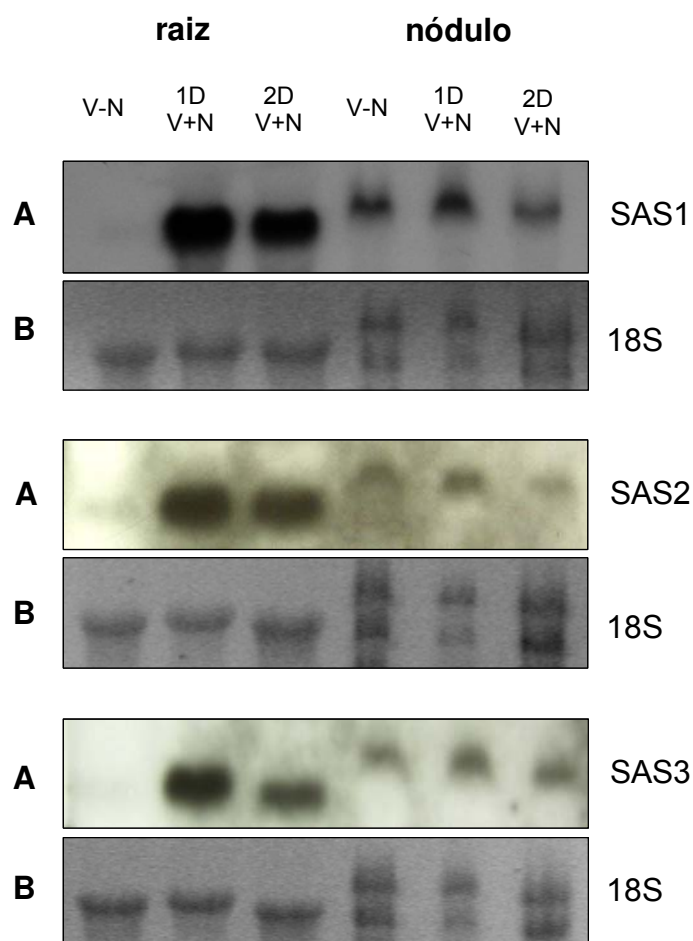


Figura 14. Análise mediante *Northern Blot* da expressão gênica de SAS1, SAS2 e SAS3 em raízes e nódulos de plantas de soja (R2) cultivadas em V-N e 1 e 2 dias após a adição de solução nutritiva +N (1D V+N) e (2D V+N), respectivamente. RNA total (15 µg) foi extraído de raízes e de nódulos. (A) Sondas específicas, foram utilizadas para detectar os mRNAs. (B) Migração do rRNA 18S em gel de agarose.

6. DISCUSSÃO

O sistema radicular de plantas de soja é um importante sítio da assimilação do N, seja pela assimilação do nitrato nas raízes, seja pela fixação simbiótica de N atmosférico nos nódulos. Os principais produtos dessa assimilação do N inorgânico, os aminoácidos asparagina e glutamina, os ureídeos, a alantoína e o ácido alantóico, são usados no transporte de N para a parte aérea. Assim, esses produtos representam uma fonte de N reduzido tanto para os sítios de consumo, quanto para a formação de outros aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e os demais compostos nitrogenados sintetizados na célula. O transporte do N assimilado no sistema radicular para a parte aérea é realizado exclusivamente via xilema. Muitos trabalhos mostram que as análises dos compostos nitrogenados na seiva do xilema podem ser utilizadas para inferir sobre os processos assimilatórios do N pelo sistema radicular, tanto em condições normais, quanto em condições de estresses diversos (Pate, 1973; Pate *et al.*, 1975; Atkins *et al.*, 1979; Puiatti & Sodek, 1999; Lima & Sodek, 2003; Thomas & Sodek, 2006; Amarante *et al.*, 2006). Portanto, as análises da seiva do xilema realizadas neste estudo visaram detectar alterações nos processos assimilatórios durante um estresse de deficiência de N, mediante mudanças no perfil de aminoácidos translocados.

O estresse de N estudado nesta tese promoveu alterações acentuadas no transporte de aminoácidos via xilema, tanto em plantas não-noduladas quanto em plantas noduladas. Plantas de soja não-noduladas submetidas à deficiência de N, apresentaram um aumento na razão ASP/ASN nos dois experimentos realizados (tabelas 1 e 3). Durante o tratamento de recuperação do N, a composição de

aminoácidos da seiva recuperou-se rapidamente, após um dia em solução com NO_3^- , e atingiu valores próximos aos das plantas cultivadas em V+N (controle sem estresse). O aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema de plantas submetidas ao estresse de N também foi observado por outros autores (Pate *et al.*, 1984; Lima & Sodek, 2003; Amarante *et al.*, 2006). Amarante *et al.* (2006) avaliaram a composição de aminoácidos na seiva do xilema de leguminosas ureídicas e exportadoras de amidas e também de mais três espécies não leguminosas. Em todas as plantas avaliadas foi observado aumento da razão ASP/ASN quando as plantas foram submetidas à deficiência de N. O fato do estresse do N causar sempre o mesmo tipo de alteração em diferentes plantas, leva a crer que o processo afetado seja comum a todas as plantas, como no caso do processo de assimilação de N.

O fenômeno do aumento na razão ASP/ASN também foi observado quando plantas noduladas foram transferidas para um sistema hidropônico livre de N mineral. Porém essa alteração foi acentuada apenas no primeiro dia do tratamento (tabela 4). Mantendo o sistema radicular e os nódulos submersos em meio hidropônico, conforme discutido mais adiante, a fixação de N sofre limitações e provoca um estresse pela falta de uma fonte alternativa de N. Quando há fonte alternativa de N, por exemplo na transferência de plantas noduladas para o sistema hidropônico com nitrato presente no meio, praticamente não se observa aumento na razão ASP/ASN no xilema (tabela 2). Outros dados encontrados na literatura também estão de acordo com a associação dessa alteração na razão ASP/ASN com o estresse de N. Foi demonstrado (Lima & Sodek, 2003) que esta razão também aumenta durante a fase de “fome de N”, quando plantas de soja inoculadas cultivadas sem o N mineral, para promover a formação de nódulos, apresentam um amarelecimento transiente das folhas em função do esgotamento das reservas de N nos cotilédones e uma vez

que a fixação de N₂ pelos nódulos ainda é insuficiente para suprir a planta. Nesta fase, o teor de ASP no xilema atingiu cerca de 70% dos aminoácidos. É evidente portanto, a associação do aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema com o estresse de N, pois o fenômeno se manifesta quando o estresse é provocado em situações bastante distintas e envolve ambos os processos assimilatórios.

A relação inversa verificada entre ASP e ASN na seiva do xilema, ou seja, quando a concentração de ASP aumenta e a de ASN cai e *vice-versa*, sugere o envolvimento das enzimas asparaginase (ASNase) e asparagina sintetase (AS), responsáveis pela interconversão desses dois aminoácidos. A primeira catalisa a transformação de ASN em ASP e a segunda a síntese de ASN a partir de ASP. Não foi observada nenhuma mudança na atividade de ASNase nos nódulos que pudesse explicar as alterações na razão ASP/ASN (Lima & Sodek, 2003). Por outro lado, Lima & Sodek (2003) puderam relacionar o aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema de plantas de soja noduladas, submetidas ao estresse de N, com a queda na atividade da AS nos nódulos. Outros estudos também sugerem que a biossíntese da ASN está diretamente relacionada com o status de N da planta (Lam *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004). A AS é a enzima que catalisa a biossíntese da ASN, transferindo o grupo amino da GLN para o ASP, produzindo ASN e GLU. A queda no suprimento de N leva a uma diminuição da GLN, produto imediato da assimilação do íon amônio através da enzima GS. Com a redução dos níveis de GLN a atividade da AS também é reduzida, resultando numa menor utilização de ASP. Diante dessas evidências, a atividade da AS, parece ser a principal responsável pelas alterações de ASN e ASP na seiva do xilema.

No caso de plantas de soja não-noduladas submetidas ao estresse de N, tentativas de obter evidências diretas para esta hipótese mediante a dosagem da atividade da AS nas raízes, não obtiveram êxito (fig. 7). A atividade da AS nas raízes foi muita baixa, impossibilitando os estudos de atividade neste tecido, apesar do ensaio usado permitir a medida da atividade de AS nos nódulos e nos cotilédones. O problema já é citado na literatura e tem sido atribuído à presença de inibidores (Joy *et al.*, 1983; Romagni & Dayan, 2000) e à contaminação pela atividade da asparaginase (Tsai & Coruzzi, 1990). Por outro lado, o uso das técnicas de biologia molecular pôde auxiliar na solução deste impasse. Utilizando a técnica de *Northern Blot*, observou-se a redução dos níveis de expressão gênica da AS (fig. 12) nas raízes das plantas de soja em condições de estresse de N e um aumento, durante a recuperação do N. Estas observações corroboram a proposta de que a AS seja a enzima que está diretamente envolvida no aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema de plantas sob deficiência de N.

É uma característica de plantas de soja (Puiatti & Sodek, 1999) e outras leguminosas (Amarante *et al.*, 2006) que plantas não-simbióticas cultivadas com nitrato transportam, via xilema, uma proporção maior de N na forma de ASN do que as plantas simbióticas. Portanto, o aumento na concentração de ASN na seiva do xilema de plantas em V-N, dependentes apenas da fixação do N_2 , após serem transferidas para H+N, está provavelmente relacionado à queda na fixação do N_2 e ao aumento da assimilação do nitrato pelo sistema radicular, quando exposto ao NO_3^- . A indução da enzima RN nas raízes (fig. 6) e o aparecimento do nitrato na seiva do xilema (Puiatti & Sodek, 1999) após transferência de plantas simbióticas para H+N, corroboram esta hipótese. Após seis dias em H+N a composição da seiva

do xilema de plantas noduladas (tabela 2) apresentou concentrações muito semelhantes à composição de plantas não-noduladas cultivadas em V+N (tabela 1), sugerindo que essas plantas passaram a assimilar o N de maneira semelhante ao das plantas não-noduladas, isto é, na forma de nitrato.

A participação da enzima RN é fundamental quando a assimilação do nitrato no sistema radicular é ativada pela presença do nitrato, em função do seu papel no processo. A forte influência do nitrato na atividade da RN foi evidenciada tanto em plantas noduladas (fig. 5 e 6) como em não-noduladas (fig. 3). A atividade da enzima foi alta em raízes de plantas não-noduladas cultivadas com nitrato, mas reduziu-se em 24 horas após transferência para um meio sem nitrogênio mineral (fig. 3). O retorno dessas plantas para um meio com nitrato resultou numa rápida recuperação da atividade da RN. Plantas noduladas cultivadas na ausência do nitrato apresentaram atividades muito baixas da RN nas raízes e nódulos, sendo que em nódulos a atividade sempre foi ligeiramente maior que nas raízes (fig. 2 C, 5 C e 6 C). Contudo, em ambos, a atividade aumentou bastante após o fornecimento de nitrato (fig. 5 e 6). É conhecido na literatura que a RN é induzida pelo nitrato (Campbell, 1999; Tischner 2000). Entretanto, já foram encontradas isoformas constitutivas em algumas leguminosas (Streit *et al.*, 1985; Andrews *et al.*, 1990; Li & Gresshoff, 1990; Silveira *et al.*, 2001; Kato *et al.* 2003). A baixa atividade encontrada em raízes e nódulos de soja pode ser devida à presença da forma constitutiva, pois as plantas foram cultivadas sem a adição do nitrato durante o ciclo todo. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade da presença de traços de nitrato na água usada para regar as plantas e isto ter sido suficiente para induzir a baixa atividade encontrada. Se por um lado, podem existir dúvidas quanto à enzima constitutiva, a

presença da enzima induzida parece bastante clara. A forte dependência da RN na presença do nitrato é um dado inédito para raízes de soja.

A queda na fixação de N e a sua substituição pela assimilação do nitrato quando plantas simbióticas são expostas ao nitrato envolve, de um lado, a indução da RN pelo nitrato discutida acima, e do outro, a inibição da fixação de N. O nitrato é conhecido como potente inibidor da fixação de N (Oghoghorie & Pate, 1971; Streeter, 1988; Arrese-Igor *et al.*, 1997; Chamber-Perez *et al.*, 1997; Puiatti & Sodek, 1999) e a planta, quando submetida à “escolha” entre o N combinado e o N₂ da fixação, “prefere” o primeiro (Wery *et al.*, 1986). Os dados obtidos no nosso estudo estão de acordo com esta afirmação. Sabe-se que a presença de alta concentração de GLN (Amarante & Sodek, 2006) na seiva do xilema de plantas noduladas cultivadas em V-N, indica eficiência da fixação do N. Portanto, a queda de GLN quando as plantas noduladas foram transferidas para a condição de H+N (Tab. 2) ou para a de H-N (Tab. 4), indica a diminuição na fixação do N₂. A redução da fixação do N nas plantas em H+N pode estar associada a dois fatores: presença de NO₃⁻ e transferência para hidroponia. Para as plantas em H-N pode-se considerar apenas o último. O efeito inibitório do nitrato sobre a fixação do N é conhecido, embora o mecanismo de inibição ainda não tenha sido totalmente esclarecido (Luciński *et al.*, 2002). Outros trabalhos mostraram que a transferência de plantas noduladas para a hidroponia leva a uma redução da fixação do N₂ (Puiatti & Sodek, 1999; Lima & Sodek, 2003). Uma provável explicação é a menor disponibilidade de O₂ no sistema hidropônico. Apesar do sistema hidropônico ser mantido sob aeração contínua, deve-se considerar que os nódulos estão envoltos por um grande volume de água, no qual a taxa de difusão de oxigênio é 10⁴ vezes menor do que no ar (Armstrong *et al.*, 1994), somado à

limitação de O₂ que os nódulos naturalmente sofrem devido à barreira de difusão ao O₂ (Hunt *et al.*, 1989; Layzell *et al.*, 1990).

A associação entre a deficiência de N, seja pelo impedimento da assimilação do nitrato ou da fixação de N, e o aumento na razão ASP/ASN na seiva do xilema, é bastante clara. Conforme já mencionado, esta alteração parece estar relacionada com a atividade da asparagina sintetase (AS), embora tenha sido necessário recorrer às técnicas de biologia molecular para demonstrar isto nas raízes.

Nos experimentos de expressão da AS através da análise de resultados de *Northern Blot*, foram avaliados três genes que codificam a enzima AS em plantas de soja: SAS1, SAS2 e SAS3. Os genes SAS1 e SAS2 já foram descritos (Hughes *et al.*, 1997), mas não o SAS3. Embora os estudos de caracterização do gene SAS3 estejam em fase de conclusão, sua seqüência completa já foi descrita e está depositada no *GenBank* (acesso AM158274). A enzima AS parece ser codificada por uma pequena família de genes (um a três) na maioria das plantas (Azevedo *et al.*, 2006). Já foram clonados e identificados **3** genes em *arabidopsis* (Lam *et al.*, 1994; 1998) e plantas de girassol (Herrera-Rodríguez *et al.*, 2002; 2004), **2** em plantas de soja (Hughes *et al.*, 1997), feijoeiro (Osuna *et al.*, 1999 e 2001), *Striga hermotica* (Simier *et al.*, 2005) e *Lotus japonicus* (Waterhouse *et al.*, 1996), e **1** em plantas de aspargo (Davies & King, 1993), arroz (Watanabe *et al.*, 1996), alfafa (Shi *et al.*, 1997) e *Vicia faba* (Küster *et al.*, 1997).

Embora os fatores que regulam a expressão gênica da AS em plantas sejam distintos, é sabido que o aumento no suprimento de fontes de N (via NH₄⁺ ou amoníacos) leva à indução da expressão dos genes da AS. Isto foi observado em plântulas de arroz (*Oryza sativa*) onde a AS só é expressa quando a plântula passa a receber uma fonte de nitrogênio, como NH₄⁺ ou glutamina (Kawachi *et al.*, 2002). Em

raízes de plantas noduladas de *Phaseolus vulgaris* a adição de nitrato levou a aumentos na expressão tanto de *PVAS1*, como de *PVAS2* (Osuna *et al.*, 2001). Nesse caso, a expressão dos dois genes foi menor na ausência do nitrato sugerindo que o nitrato estimula a expressão.

Resultados semelhantes foram observados em raízes de plantas de soja noduladas, em que a expressão gênica das três formas da AS foi baixa na ausência do nitrato e aumentou quando as plantas passaram a receber o nitrato (fig. 14). Isto também ficou evidente no experimento com plantas não-noduladas (fig. 12) após transferência das mesmas para o meio sem nitrato quando, aparentemente, a expressão foi suprimida, e durante o retorno das plantas ao suprimento do nitrato, quando o gene AS foi expresso novamente. Em nódulos também foi detectada a expressão dos 3 genes nas plantas em V-N (fig. 14), porém, neste caso a influência do nitrato foi pequena. O único meio de obtenção de N em plantas noduladas (cultivadas na ausência de N mineral) é através da fixação do N₂ pelos nódulos e isso justifica a presença de AS nos nódulos e uma reduzida expressão dos genes nas raízes (fig. 14). Quando essas plantas foram expostas ao nitrato, que é um inibidor da fixação do N₂, como discutido anteriormente, a expressão gênica da AS nas raízes aumentou. Esse aumento, possivelmente está relacionado com a assimilação do NO₃⁻ pela enzima RN, que teve sua atividade aumentada nas raízes de plantas de soja na presença de nitrato (fig. 5 e 6). A atividade da RN também aumentou nos nódulos, o que provavelmente explica a expressão contínua dos genes da AS nos nódulos de plantas em V-N e nas tratadas com nitrato (fig. 14). Embora a fixação possa ter sido prejudicada, o nódulo possivelmente continua recebendo N, porém na forma de nitrato. A capacidade de assimilação do nitrato pelo

nódulo já foi demonstrada em diversas leguminosas (Arrese-Igor *et al.*, 1998; Kanayama *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2003).

Durante o tratamento de deficiência do N (impedimento da fixação de N por imersão dos nódulos no sistema hidropônico) com as plantas noduladas, foi encontrada expressão dos três genes nas raízes das plantas em V-N, e seus níveis de expressão não foram alterados com o tratamento (fig. 13). Neste experimento a expressão gênica da AS nas raízes das plantas noduladas não parece tão baixa quando comparada à expressão nos nódulos, como observado na fig. 14. No entanto, a comparação não é possível pelo fato das amostras de raízes e nódulos não estarem na mesma membrana. Também foi detectada expressão dos três genes nos nódulos, sendo que SAS2 e SAS3 mantiveram seus níveis de expressão semelhantes aos das plantas em V-N quando transferidas para H-N. Apenas SAS1 mostrou uma queda na expressão. Assim, esta isoforma parece ser a única afetada quando as plantas foram transferidas para H-N.

Embora a queda da expressão do gene SAS1 no nódulo com o impedimento da fixação de N seja coerente com os dados de Lima & Sodek (2003), não obteve-se uma correlação tão clara quanto às alterações na razão ASP/ASN do xilema. Apenas no primeiro dia do tratamento (Tab. 4) observou-se uma queda acentuada na concentração de ASN e um aumento na concentração de ASP. O experimento mostrou outras diferenças em relação aos dados de Lima & Sodek (2003), pois ao contrário desses autores não obtivemos sucesso na recuperação da fixação do N₂, transplantando as plantas noduladas novamente para vermiculita sem nitrato. Os dados obtidos sugerem, que após sete dias de replantio em V-N, as plantas ainda não recuperaram sua capacidade de fixação. A análise da composição da seiva mostrou que a GLN, considerada um indicador da fixação biológica, apresentou

baixas concentrações como as observadas nas plantas em H-N (tabela 4). Nota-se ainda na análise da expressão do gene SAS1, que não houve a recuperação dos níveis detectados nas plantas em V-N, ao contrário da recuperação de atividade da AS, observada no trabalho de Lima & Sodek (2003). Apesar da discrepância, a resposta em termos da expressão do gene SAS1 foi coerente com a falta de recuperação dos teores de ASP e ASN no xilema (tabela 4). Aqui, mais uma vez, podemos relacionar a composição da seiva do xilema com os processos assimilatórios de N pelo sistema radicular, como foi discutido anteriormente.

7. CONCLUSÕES

Não foi possível detectar atividade da enzima RN nas raízes de plantas de soja que nunca tiveram contato com alguma fonte de nitrogênio mineral. Contudo, em nódulos, foi observada uma baixa atividade, sugerindo a presença de uma RN constitutiva neste tecido. A atividade da RN foi induzida nas raízes e nódulos das plantas de soja, durante a exposição do sistema radicular ao nitrato.

A soja contém três formas de AS: SAS1, SAS2 e SAS3, encontradas tanto em raízes como em nódulos, sendo que a SAS3 ainda não havia sido descrita.

A expressão gênica da AS em raízes de plantas de soja não-noduladas e noduladas mostrou forte dependência da presença do nitrato, ao contrário do observado nos nódulos.

Em raízes de plantas de soja noduladas, a expressão dos três genes da AS avaliados parece ser constitutiva.

A redução no processo de fixação do N_2 , causada pela transferência das plantas noduladas (V-N) para H-N, afeta de forma negativa apenas o gene SAS1 nos nódulos.

O aumento da razão ASP/ASN na seiva do xilema de plantas de soja não noduladas e noduladas submetidas à deficiência de N, provavelmente está relacionado à redução na expressão gênica da AS no sistema radicular. Porém, no caso das plantas noduladas, apenas o gene SAS1 em nódulos respondeu ao tratamento.

Os resultados obtidos sugerem que as alterações na composição de aminoácidos da seiva do xilema de plantas de soja, quando submetidas à deficiência

de N, podem ser usadas para inferir sobre os processos de assimilação do N pelo sistema radicular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Perspectivas de mercado para a soja. Disponível em: <www.abiove.com.br>.
- Allègre A, Silvestre J, Morard P, Kallerhoff J & Pinelli E, 2004. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. **J. Exp. Bot.** **55**(408):2625-2634.
- Amarante L. & Sodek L, 2006. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biol. Plant.** **50**(3): 405-410.
- Amarante L, Lima J.D. & Sodek L., 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. **Environ. Exp. Bot.** **58**(1-3): 123-129.
- Andrews M, Defaria SM, Mcinroy SG & Sprent JI, 1990. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. **Phytochemistry** **29**: 49-54.
- Appenroth K-J, Meco R, Jourdan V & Lillo C, 2000. Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Sci.** **159**(1): 51-56.
- Armstrong W, Brändle R & Jackson MB, 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Bot. Neerl** **43**: 307-358.
- Arrese-Igor C, Minchin FR, Gordon AJ & Nath AK, 1997. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. **J. Exp. Bot.** **48**(309): 905-913.
- Arrese-Igor C, Gordon AJ, Minchin FR & Denison RF, 1998. Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. **J. Exp. Bot.** **49**(318): 41-48.

- Atkins CA, Pate JS & Layzell DB, 1979. Assimilation and transport of nitrogen in non-nodulated (NO_3^- grown) *Lupinus albus* L.. ***Plant Physiol.* 64**: 1078-1082.
- Azevedo RA, Lancien M & Lea PJ, 2006. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. ***Amino Acids* 30**: 143-162.
- Becana M, Minchin FR & Sprent JI, 1989. Short-Term Inhibition of Legume N_2 Fixation by Nitrate. I. Nitrate Effects on Nitrate Reductase Activity of Bacteroids and Nodule Cytosol. ***Planta* 180(1)**: 40–45.
- Benson JR & Hare PE, 1975. Ortho-phthalaldehyde-fluorogenic detection of primary amines in picomole range – Comparison with fluorescamine and ninhydrin. ***Proc. Nac. Acad. Sci. U.S.A.* 72(2)**: 619-622.
- Bloom AJ, Sikrapanna SS & Werner RL, 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. ***Plant Physiol.* 99**:1294-1301.
- Botrel A & Kaiser WM, 1997. Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. ***Planta* 201(4)**:496-501.
- Burris RH & Roberts GP, 1993. Biological nitrogen fixation. ***Ann. Rev. Nutr.* 13**: 317-335.
- Campbell WH, 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. ***Ann. Rev. Plant Biol.* 50**: 277-303.
- Campbell WH, 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. ***Cell Mol. Life Sci.* 58**:194–204.
- Cedar H & Schwartz JH, 1969. The asparagine synthetase of *Escherichia coli* I. Biosynthetic role of the enzyme, purification, and characterization of the reaction products. ***J. Biol. Chem.* 244**: 4112-4121.

- Chamber-Perez MA, Camacho-Martinez M & Soriano-Niebla JJ, 1997. Nitrate-reductase activities of Bradyrhizobium spp. in tropical legumes: Effects of nitrate on O₂ diffusion in nodules and carbon costs of N₂ fixation. **J. Plant Physiol.** **150**(1-2): 92-96.
- Chung HL, Sehnke PC & Ferl RJ, 1999. The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. **Plant Sci.** **4**:367–371.
- Crawford NM, 1995. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **Plant Cell** **7**: 859-868.
- Davies KM & King GA, 1993. Isolation and characterization of a cDNA clone for a harvest-induced asparagine synthetase from *Asparagus officinalis* L. **Plant Physiol.** **102**(4): 1337-1340.
- de la Haba P, Agüera E, Benítez L & Maldonado JM, 2001. Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. **Plant Sci.** **161**: 231–237.
- Dluzniewska P, Gessler A, Kopriva S, Strnad M, Novák OE, Dietrich H & Rennenberg H, 2006. Exogenous supply of glutamine and active cytokinin to the roots reduces NO₃⁻ uptake rates in poplar. **Plant Cell Environ.** **29**: 1284-1297.
- Dobereiner J, 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biol. Biochem.** **29**: 771-774.
- Fan X, Gordon-Weeks R, Shen Q & Miller AJ, 2006. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. **J. Exp. Bot.** **57**(6): 1333–1340.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT & Pennington JS, 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. **Crop Sci.** **11**: 929-931.

- Hageman RH & Reed AJ, 1980. Nitrate reductase from higher plants. ***Methods in Enzymol.* 69:** 270-280.
- Herrera-Rodriguez MB, Carrasco-Ballesteros S, Maldonado JM, Pineda M, Aguilar M & Perez-Vicente R, 2002. Three genes showing distinct regulatory patterns encode the asparagine synthetase of sunflower (*Helianthus annuus*). ***New Phytol.* 155:** 33-45.
- Herrera-Rodriguez MB, Maldonado JM & Perez-Vicente R, 2004. Light and metabolic regulation of *HAS1*, *HAS1.1* and *HAS2*, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. ***Plant Physiol. Biochem.* 42:** 511-518.
- Hoagland DR & Arnon DI, 1938. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California-Agricultural Experiment Station, 39 p (Circular 347).
- Huber TA & Streeter JG, 1984. Asparagine biosynthesis in soybean nodules. ***Plant Physiol.* 74:** 605-610.
- Huber TA & Streeter JG, 1985. Purification and properties of asparagine synthetase from soybean root nodules. ***Plant Sci.* 42:** 9-17.
- Huber SC, Bachmann M & Huber JL, 1996. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. ***Plant Sci.* 1:**432–438.
- Hubert R & Simoni RD, 1980. Genetic and biochemical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. ***J. Bacteriol.* 142:** 212-220.
- Hughes CA, Beard HS & Matthews BF, 1997. Molecular cloning and expression of two cDNAs encoding asparagine synthetase in soybean. ***Plant Mol. Biol.* 33:** 301-311.

- Hungria M, Chueire LMDO, Coca RG & Megias M, 2001. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. ***Soil Biol. Biochem.*** **33**(10): 1349-1361.
- Hunt S, King BJ & Layzell DB, 1989. Effects of gradual increases in O₂ concentration on nodule activity in soybean. ***Plant Physiol.*** **91**: 315-321.
- Izmailov SF, Bruskova RK, Chechetka SA, Kirnos SV, Nikiforova TA & Satskaya MV, 2003. Nitrate assimilation function of yellow lupine root nodules? ***Biol. Bull.*** **30**(2): 140-147.
- Jarret HW, Cooksy KD, Ellis B & Anderson JM, 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of aminoacids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. ***Anal. Biochem.*** **153**: 189-198.
- Joy KW & Ireland RJ, 1990. Enzymes of asparagine metabolism. IN: Methods in Plant Biochemistry: Enzymes of Primary metabolism (Dey, P.M and Harbourne, J.B., eds) Academic Press, London, Vol. 3, pp.287-296.
- Joy KW, Ireland RJ & Lea PJ, 1983. Asparagine biosynthesis in pea leaves and the occurrence of an asparagine synthetase inhibitor. ***Plant Physiol.*** **73**: 165-168.
- Kaiser WM & Huber SC, 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. ***J. Exp. Bot.*** **52**: 1981–1989.
- Kanayama Y, Kimura K, Nakamura Y & Ike T, 1999. Purification and characterization of nitrate reductase from nodule cytosol of soybean plants. ***Physiol. Plant.*** **105**(3): 396-401.
- Kato K, Okamura Y, Kanahama K & Kanayama Y, 2003. Nitrate-independent expression of plant nitrate reductase in *Lotus japonicus* root nodules. ***J. Exp. Bot.*** **54**(388): 1685-1690.

- Kawachi T, Sueyoshi K, Nakajima A, Yamagata H, Sugimoto T & Oji Y, 2002. Expression of asparagine synthetase in rice (*Oryza sativa*) roots in response to nitrogen. ***Physiol. Plant.* 114**(1): 41-46.
- Küster H, Albus U, Frühling M, Tchetkova SA, Tikhonovitch IA, Pühler A & Perlick AM, 1997. The asparagine synthetase gene VfAS1 is strongly expressed in the nitrogen-fixing zone of broad bean (*Vicia faba* L.) root nodules. ***Plant Sci.* 124**(1): 89-95.
- Lam H-M, Peng SS & Coruzzi GM, 1994. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. ***Plant Physiol.* 106**: 1347–1357.
- Lam H-M, Hsieh MH & Coruzzi GM, 1998. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. ***Plant J.* 16**: 345-353.
- Lam H-M, Wong P, Chan H-K, Yam K-M, Chen L, Chow C-M & Coruzzi GM, 2003. Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. ***Plant Physiol.* 132**(2): 926-935.
- Layzell DB, Hunt S & Palmer GR, 1990. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules: Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂. ***Plant Physiol.* 92**(4): 1101-1107.
- Lea PJ & Fowden L, 1975. The purification and properties of glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from *Lupinus albus*. ***Proc. Royal Soc. London* 192**: 13-26.
- Lea PJ & Mifflin BJ, 1974. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. ***Nature* 251**: 680–685.

- Lea PJ, Robinson SA & Stewart GR, 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. IN: The Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism. (Mifflin, BJ e Lea, PJ, eds.) Vol 16, Academic Press, New York, pp. 147-152.
- Lea US, Leydecker M-T, Quilleré I, Meyer C & Lillo C, 2006. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiol.* **140**(3): 1085-1094.
- Li ZZ & Gresshoff PM, 1990. Developmental and biochemical regulation of constitutive nitrate reductase activity in leaves of nodulating soybean. *J. Exp. Bot.* **41**: 1231-1238.
- Lima JD & Sodek L, 2003. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. *Plant Sci.* **165**: 649-656.
- Luciński R, Polcyn W & Ratajczak L, 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-Legumes. *Acta Biochim. Polon.* **49**(2): 537-546.
- Majerowicz N, França MGC, Peres LEP, Médici LO & Figueiredo SA, 2003. Fisiologia Vegetal - Curso Prático, Âmbito Cultural Edições Ltda., RJ.
- Marur CJ, Sodek L. & Magalhães AC, 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **6**(2):103-108.
- McClure PR & Israel DW, 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* **64**: 411-416.
- Miller AJ & Cramer MD, 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* **274**: 1–36.

- Moore D, 1987. Section IV: Analysis of DNA Sequences by Blotting and Hibridization. In: Ausubel, Frederick M. *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc., 3v. v. 1, Unit 2-9A.
- Oaks A & Ross DW, 1984. Asparagine synthetase in *Zea mays*. ***Can. J. Bot.* 62**: 68–73.
- Oghoghorie CGO & Pate JS, 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). Techniques for measurement and evaluation in physiological terms. ***Plant Soil Special Vol.***: 185-202.
- Osuna D, Galv  z-Valdivieso G, Pineda M & Aguilar M, 1999. RT-PCR cloning, characterization and mRNA expression analysis of a cDNA encoding a type II asparagine synthetase in common bean. ***Biochim. Biophys. Acta* 1445**: 75-85.
- Osuna D, Galv  z-Valdivieso G, Piedras P, Pineda M & Aguilar M, 2001. Cloning, characterization and mRNA expression analysis of *PVAS1*, a type I asparagine synthetase gene from *Phaseolus vulgaris*. ***Planta* 213**: 402-410.
- Pate JS, 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. ***Soil Biol. Biochem.* 5**: 109-119.
- Pate JS, Sharkey PJ, Lewis OAM, 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. ***Planta* 122**: 11-26.
- Pate JS, Atkins CA, White ST, Rainbird RM & Woo KC, 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport in ureide-producing grain legumes. ***Plant Physiol.* 65**: 961-965.
- Pate JS, Atkins CA, Layzell DB & Shelp BJ, 1984. Effect of N₂ deficiency on transport and partitioning of C and N in a nodulated legume. ***Plant Physiol.* 76**: 59-64.
- Prell J & Poole P, 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. ***Trends Microbiol.* 14**: 161-168

- Puiatti M & Sodek L, 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. ***Plant Physiol. Biochem.* 37(10): 767-773.**
- Richards NGJ & Schuster SM, 1992. An alternative mechanism for the nitrogen transfer reaction in asparagine synthetase. ***FEBS Lett.* 313: 98-102**
- Rognes SE, 1975. Glutamine-dependent asparagine synthetase from *Lupinus luteus*. ***Phytochemistry* 14: 1975-1982.**
- Romagni JG & Dayan FE, 2000. Measuring asparagine synthetase activity in crude plant extracts. ***J. Agric. Food Chem.* 48: 1692-1696.**
- Sambrook F, Fritsch EF & Maniatis T, 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shi L, Twary SN, Yoshioka H, Gregerson RG, Miller SS, Samac DA, Grantt JS, Unkefer PJ & Vance CP, 1997. Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. ***Plant Cell* 9: 1339-1356.**
- Sieciechowicz KA, Joy KW & Ireland RJ, 1988. The metabolism of asparagine in plants. ***Phytochemistry* 27: 663-671.**
- Silveira JAG, Matos JCS, Cecatto VM, Viegas RA & Oliveira JTA, 2001. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp.. ***Environ. Exp. Bot.* 46(1): 37-46.**
- Simier P, Delavault P, Demarsy E, Pouvreau J-B, Pageau K, Le Bizec B, Fer A, (...), Thalouarn P, 2005. Characterization of an unusually regulated gene encoding asparagine synthetase in the parasitic plant *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae). ***Physiol. Plant.* 123(1): 9-20.**

- Solomonson LP & Barber MJ, 1990. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. ***Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41(1): 225-253.**
- Sprent J, Giannakis G & Wallace W, 1987. Transport of Nitrate and Calcium into Legume Root Nodules. ***J. Exp. Bot.* 38(192): 1121–1128.**
- Streeter JG, 1973. *In vivo* and *in vitro* studies on asparagine biosynthesis in soybean seedlings. ***Arch. Biochem. Biophys.* 157: 613-624.**
- Streeter JG, 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. ***Crit. Rev. Plant Sci.* 7: 1-23.**
- Streit L, Nelson RS & Harper JE, 1985. Nitrate reductases from wild-type and nr1-mutant soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) leaves. ***Plant Physiol.* 78: 80-84.**
- Sueyoshi K, Kleinhofs A, Warner RL, 1995. Expression of NADH-specific and NAD(P)H-bispecific nitrate reductase genes in response to nitrate in barley. ***Plant Physiol.* 107(4): 1303-1311.**
- Thomas AL & Sodek L, 2006. Amino acid and ureide transport in the xylem of symbiotic soybean plants during short-term flooding of the root system in the presence of different sources of nitrogen. ***Braz. J. Plant Physiol.* 18(2): 333-339.**
- Tischner R, 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. ***Plant Cell Environ.* 23: 1005-1024.**
- Tsai FY & Coruzzi GM, 1990. Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. ***EMBO J.* 9: 323-332.**
- Vance CP & Gantt JS, 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. ***Physiol. Plant.* 85: 266-274.**

- van-Heeke G & Schuster SM, 1989. The N-terminal cysteine of human asparagine synthetase is essential for glutamine-dependent activity. **J. Biol. Chem.** **264**(33): 19475-19477.
- Watanabe K, Higuchi T, Sakai T & Yamaya T, 1996. Nucleotide sequence of cDNA encoding asparagine synthetase (Accession n° D83378) from rice callus (PGR96-020). **Plant Physiol.** **111**: 347.
- Waterhouse RN, Smyth A, Massonneau A, Presser LM & Clarkson DT, 1996. Molecular cloning and characterization of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: Dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. **Plant Mol. Biol.** **30**(5): 883-897.
- Weiner H & Kaiser WM, 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. **FEBS Letters** **455**: 75–78.
- Weiner H & Kaiser WM, 2000. Binding to 14-3-3 protein is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. **FEBS Letters** **480**: 217–220.
- Weiner H & Kaiser WM, 2001. Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine-543 and its binding to 14-3-3 proteins. **J. Exp. Bot.** **52**(359): 1165-1172.
- Wery J, Turc O & Salsac L, 1986. Relationship between growth, nitrogen fixation and assimilation in a legume (*Medicago sativa* L.). **Plant Soil** **96**: 17-29.
- Wong H-K, Chan H-K, Coruzzi GM & Lam H-M, 2004. Correlation of *ASN2* gene expression in ammonium metabolism in Arabidopsis. **Plant Physiol.** **134**: 332-338.