

MÁRIO PUIATTI

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA
NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE N_2 PELO NO_3^- EM
PLANTAS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill
cv. Santa Rosa) CULTIVADAS EM HIDROPONIA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Mário Puiatti</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

07/08/97

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek *L*

Campinas - SP

1997

971115

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP
V.	EX.
TÍTULO	BC/ 31669
PREÇO	284/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	78,11,00
DATA	17/09/97
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00100450-4

P964m Puiatti, Mário
Mecanismos envolvidos na inibição da nodulação e fixação de N₂ pelo NO₃⁻ em plantas de soja (*Glycine max* (L) Merril cv. Santa Rosa) cultivadas em hidroponia
Mário Puiatti. -- Campinas, SP :[s.n.], 1997.

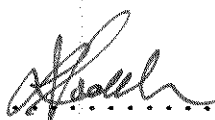




Orientador: Ladaslav Sodek.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia.

1. Soja. 2. Nitrogênio - Fixação. 3. Aminoácidos.
4. Oxigênio. 5. Etileno. 6. Hidroponia. I. Sodek, Ladaslav.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 07 de agosto de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. LADASLAV SODEK (ORIENTADOR) 
Dr. ELI SIDNEY LOPES 
Dr. JOSÉ RONALDO DE MAGALHÃES 
Profª. Dra. MARLENE APARECIDA SCHIAVINATO 
Prof. Dr. PAULO MAZZAFERA 

SUPLENTE:

Prof. Dr. ANTÔNIO CELSO NOVAES DE MAGALHÃES
Prof. Dr. LUIZ GONZAGA SANTORO

À

Janice,

Guilherme e

Gustavo,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ladaslav Sodek, meu especial agradecimento pela orientação segura, ensinamentos valiosos, confiança, estímulo e dedicação sempre presentes durante período de convivência tão agradável.

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos, atenção, apoio e amizade, que foram uma constante durante esses anos.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade concedida, liberando-me para a realização do curso.

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade concedida, aceitando-me para a realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida para a realização do curso.

Ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC), nas pessoas da Dra. Maria Luiza C. O. Lombardi e Dr. Eli S. Lopes, pelo fornecimento inicial da estirpe de *Rhizobium*, além das informações prestadas quando solicitados.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, pela colaboração, amizade e, principalmente, pelo carinho e agradável convivência.

Aos colegas de curso, minha gratidão pela amizade sincera, relacionamento agradável e companheirismo demonstrados durante todos os momentos pelos quais estivemos juntos. Em especial, meu agradecimento à Kátia V. Gonçalves e Eliana

Chagas pelas informações e auxílio nas dosagens de asparaginase.

À minha esposa Janice, e aos nossos filhos Guilherme e Gustavo, minha gratidão pela compreensão nos momentos que os privei da minha presença durante a realização desse trabalho.

Finalmente agradeço a todos que, de modo direto ou indireto, contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade.

ÍNDICE

Banca examinadora.....	i
Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice.....	v
Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
Summary.....	xiii
1.Introdução.....	1
1.1. Importância de N na associação rizóbio-leguminosa.....	1
1.2. Efeito de fitohormônios no processo da nodulação.....	4
1.3. Efeito de NO_3^- na nodulação e na fixação de N_2	14
1.4. Efeito de outros fatores de estresse na fixação de N_2	33
1.5. Solutos nitrogenados no xilema de plantas fixando N_2	37
2.Objetivos.....	38
3.Materiais e Métodos.....	39
3.1. Material vegetal e condições de crescimento.....	39
3.2. Inóculo: origem, manutenção, multiplicação e inoculação das plantas.....	40
3.3. Soluções.....	42
3.3.1.Solução nutritiva.....	42
3.3.2.Soluções de Co, AVG e AIA.....	44
3.4. Variação diurna na composição dos exsudatos do xilema.....	44
3.5. Nodulação e crescimento de plantas.....	45
3.6. Nodulação, crescimento de plantas e fixação de N_2	45
3.7. Fixação de N_2 por nódulos de plantas adultas.....	46

3.8. Transferência de plantas adultas e noduladas para hidroponia.....	46
3.9. Características avaliadas.....	47
3.10. Coleta de exsudatos do xilema.....	47
3.11. Coleta de nódulos.....	48
3.12. Análises bioquímicas de exsudatos do xilema.....	49
3.12.1. Dosagem de ureídeos totais.....	49
3.12.2. Dosagem de aminoácidos livres totais.....	49
3.12.3. Dosagem de aminoácidos livres por HPLC.....	49
3.12.4. Dosagem de N-NO_3^-	50
3.13. Análises bioquímicas de nódulos.....	51
3.13.1. Dosagens de Lb e de proteína total dos nódulos.....	51
3.13.2. Dosagens da atividade de asparaginase e do teor de proteína total dos nódulos.....	52
3.14. Análise estatística.....	53
4. Resultados.....	54
4.1. Variação diurna na composição de exsudatos do xilema...	54
4.2. Nodulação e crescimento de plantas.....	59
4.2.1. Concentrações de NO_3^- em hidroponia.....	59
4.2.2. Concentrações de NO_3^- e de Co em vermiculita.....	66
4.2.3. Concentrações de NO_3^- e de Co em hidroponia.....	70
4.2.4. Concentrações de NO_3^- e de AIA em hidroponia.....	75
4.3. Nodulação, crescimento de plantas e fixação de N_2	80
4.3.1. Concentrações de NO_3^- e de Co em hidroponia.....	80
4.3.2. Concentrações de NO_3^- e de AVG em hidroponia.....	86

4.3.3. Concentrações de NO_3^- e de AIA em hidroponia.....	93
4.4. Fixação de N_2 por nódulos de plantas adultas.....	99
4.4.1. Mantidas em vermiculita e submetidas a NO_3^- e Co..	99
4.4.2. Mantidas em hidroponia e submetidas a NO_3^- e Co..	104
4.4.3. Mantidas em hidroponia e submetidas a NO_3^- e AVG.	108
4.4.4. Mantidas em hidroponia e submetidas a NO_3^- e AIA.	112
4.5. Transferência de plantas adultas e noduladas para hidroponia.....	117
4.5.1. Hidroponia com aeração e com ou sem NO_3^-	117
4.5.2. Hidroponia com ou sem aeração e com ou sem NO_3^- ...	132
4.5.3. Hidroponia com ou sem NO_3^- e com borbulhamento com ar, com N_2 ou anoxia.....	143
5. Discussão.....	151
5.1. Variação diurna na composição de solutos nitrogenados no xilema de plantas adultas e noduladas.....	151
5.2. Nodulação, crescimento de plantas e fixação de N_2	154
5.3. Estresse por NO_3^- , hipoxia ou anoxia em plantas adultas noduladas.....	174
6. Resultados Principais e Conclusões.....	194
7. Literatura Citada.....	198

ABREVIATURAS

ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
AIA	Ácido indolil-3-acético
ARA	Atividade de redução de acetileno
AVG	Aminoethoxivinilglicina ou ácido L- α -amino- γ -(2'-aminoethoxi)- β -butenóico
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
GOGAT	Glutamato sintase ou glutamato-oxoglutarato aminotransferase
GS	Glutamina sintetase
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
Lb	Leghemoglobina
Lb ²⁺	Lb ferrosa
Lb ³⁺	Lb férrica
N ₂ ase	Nitrogenase
NiR	Redutase de NO ₂ ⁻
NiRA	Atividade de redutase de NO ₂ ⁻
NR	Redutase de NO ₃ ⁻
NRA	Atividade de redutase de NO ₃ ⁻
nts	Simbiose tolerante ao nitrato
O ₂ ⁻	Radical superóxido
·OH	Radical hidroxil
O _i	Concentração de O ₂ em célula infectada
PBM	Membrana peribacteróide
PBU _s	Unidades peribacteróides
pCO ₂	Pressão parcial de CO ₂
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
pO ₂	Pressão parcial de O ₂
SAM	S-adenosil-L-metionina

RESUMO

Nitrogênio combinado, especialmente NO_3^- , exerce dois efeitos inibitórios fundamentais na associação simbiótica *Bradyrhizobium*-soja. Um deles é exercido no processo de nodulação, interferindo, possivelmente, desde as primeiras trocas de comunicação rizobia-planta, através da interferência nos sinais moleculares envolvidos nessa comunicação, até a síntese da N_2 ase do bacteróide e a sua entrada em funcionamento ativo. Em nódulos já formados, com a N_2 ase fixando ativamente N_2 , NO_3^- atua inibindo a atividade da N_2 ase, e por conseguinte, a redução de N_2 a NH_4^+ .

Embora esses dois efeitos sejam conhecidos há cerca de um século, e durante esse tempo várias hipóteses terem sido formuladas, persistem, ainda hoje, dúvidas quanto ao(s) mecanismo(s) envolvido(s). Em razão de pesquisas recentes terem associado a possibilidade do envolvimento de etileno com o efeito inibitório de NO_3^- na nodulação, e do envolvimento de NO_3^- limitando O_2 para a atividade fixadora de N_2 de nódulos já formados, realizamos esse trabalho, o qual, além de investigar alguns aspectos gerais do mecanismo de inibição da nodulação e da fixação de N_2 pelo NO_3^- em nódulos de soja, teve como objetivos específicos: a) verificar o envolvimento de etileno na inibição da nodulação e da fixação de N_2 pelo NO_3^- ; b) verificar o envolvimento de uma possível limitação de O_2 na inibição da fixação de N_2 pelo NO_3^- .

Para verificar o possível envolvimento de etileno na inibição da nodulação e fixação de N_2 pelo NO_3^- , foram realizados dez experimentos (dois em vermiculita e oito em hidroponia). Para verificar a possível limitação de O_2 na atividade de fixação de N_2 do nódulo já formado, foram conduzidos cinco experimentos, submetendo plantas adultas, noduladas, inoculadas e cultivadas em vermiculita até a frutificação, fixando ativamente N_2 , a tratamentos de hidroponia e/ou NO_3^- por períodos variáveis de até nove dias.

Baseado nos resultados obtidos, concluímos que: inibidores da síntese de etileno (Co e AVG), não foram eficientes em prevenir a planta de soja do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação, nem na atividade fixadora de N_2 do nódulo. Por outro lado, AIA ($1,0 \mu M$), apresentou alguns indícios de estar envolvido no processo da nodulação, prevenindo-a, parcialmente, do efeito inibitório de NO_3^- ; todavia, AIA também não foi eficaz em prevenir a atividade fixadora de N_2 dos nódulos do efeito inibitório de NO_3^- . Além disso, AIA ($1,0 \mu M$), alterou as proporções dos aminoácidos livres presentes nos exsudatos do xilema, aumentando grandemente aspartato e diminuindo glutamina e asparagina, além de impedir o aumento de asparagina e a diminuição de aspartato proporcionados pelo NO_3^- ($4,0 mM$).

Hidroponia, mesmo com borbulhamento permanente da solução nutritiva com ar, inibiu a atividade de fixação de N_2 dos nódulos, sugerindo que o sistema limita O_2 para a atividade da N_2 ase do bacteróide. Além disso, hidroponia proporcionou a

diminuição de asparagina e de glutamina nos exsudatos do xilema, e um aumento muito grande de aspartato, embora não tenha sido possível explicar esse aumento de aspartato em termos do catabolismo de asparagina pela ação da asparaginase em nódulos.

NO_3^- inibiu a nodulação e a atividade de fixação de N_2 dos nódulos, sendo a última mais sensível a esse efeito inibitório; além disso, o efeito inibitório foi manifestado com maior intensidade em hidroponia do que em vermiculita, sugerindo que NO_3^- atue limitando ainda mais O_2 para a atividade de fixação de N_2 do nódulo. NO_3^- em aerobiose (vermiculita ou hidroponia com aeração) promoveu aumento de asparagina e diminuição de glutamina nos exsudatos do xilema.

Anaerobiose (anoxia parcial ou total), principalmente associada ao NO_3^- , promoveu diminuição de asparagina, glutamina e aspartato nos exsudatos do xilema, e aumento acentuado de alanina e serina.

A atividade de fixação de N_2 do nódulo foi diretamente proporcional ao teor de ureídeos totais presentes nos exsudatos do xilema e inversamente proporcional ao teor de NO_3^- ; todavia o teor de aminoácidos livres totais demonstrou ser uma característica pouco associada à atividade fixadora de N_2 dos nódulos.

O teor de Lb, dentro de cada tratamento, variou proporcionalmente ao de proteína solúvel total, apresentando menores teores nos tratamentos de estresse de O_2 associado com

NO_3^- (hidroponia + NO_3^- e sem aeração); todavia a resposta da Lb aos tratamentos aplicados não foi muito expressiva, sugerindo que a Lb pode não ser um dos principais fatores limitantes do processo de fixação de N_2 em nódulos de soja.

SUMMARY

Mechanisms involved in inhibition of nodulation and N_2 fixation process by NO_3^- in soybean plants (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa) cultivated by hydroponics technique.

Combined nitrogen, especially NO_3^- , performs two fundamental inhibitory effects in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiotic association. One of them is performed during nodulation, and it interferes from the first communication exchanges rhizobia-plant, by means of the interference in the molecular signals which are involved in this communication exchanges, up to the bacteroid N_2 ase synthesis and its entry into the active functioning. NO_3^- works as an inhibitor of the N_2 ase activity, in the already formed nodules with the N_2 ase actively fixating the N_2 , and consequently inhibits the N_2 a NH_4^+ reduction.

In spite of these two effects being already known for around one century, and that during this time many hypothesis have been formulated, doubts in relation to the mechanism(s) which is(are) involved. Thanks to recent researches having associated the possibility of ethylene having the inhibitory effect over the NO_3^- in nodulation, and to the involvement of NO_3^- , which limits O_2 in the N_2 fixating activity of the already formed nodules, we have as well as making this work - in which, we investigate some general aspects of the nodulation inhibition mechanism and the N_2 fixing by the NO_3^- in soybean

nodules - aimed on specific objectives such as: a) check on the involvement of ethylene in the nodulation inhibition mechanism and the N_2 fixating by the NO_3^- , b) verify the involvement of a possible O_2 limitation in the inhibiting mechanism of the N_2 fixing by NO_3^- .

Ten experiments (two on vermiculite and the other eight on hydroponics) were performed in order to verify the possible involvement of ethylene in NO_3^- nodulation inhibition and N_2 fixation. Five experiments were done in order to check on the possible O_2 limitation in the N_2 fixating activity present in the already formed nodule, by subjecting adult plants, which were nodulated, inoculated and cultivated in vermiculite up to its frutification, which was an activity that actively fixed the N_2 , to the hydroponics treatments and/or NO_3^- for varied periods of up to nine days.

We have concluded, based on the results which were obtained, that: inhibitors of the ethylene synthesis (Co and AVG), were not efficient in protecting the soybean plant from the inhibitory effect of the NO_3^- in the nodulation, neither in the nodule N_2 fixating activity. On the other hand, AIA (1,0 μM), presented some possibilities of it being involved in the nodulation process, which partially prevents the inhibitory effect of the NO_3^- ; however, AIA was also not efficient in preventing the nodule N_2 fixating activity, from the NO_3^- inhibiting effect. However, AIA (1,0 μM), has altered the proportions of the free amino acids which are present in the

xylem exudates, greatly enlarging aspartic acid and decreasing glutamine and asparagine, as well as stopping the asparagine increase and the aspartic acid decrease caused by the NO_3^- (4.0 mM).

Hydroponics, even with a constant bubbling of the nutritive solution with air, has inhibited the nodules N_2 fixating activity, which suggests that the system limits O_2 for the N_2 ase activity of the bacteroid. Also, hydroponics has caused the decrease of asparagine and of glutamine in the xylem exudate, and a great aspartic acid increase; although it was not possible to explain this aspartic acid increase concerning the asparagine catabolism through the action of the asparaginase in the nodules.

NO_3^- has inhibited the nodulation and the nodule N_2 fixating activity, but the latter is more sensitive to this inhibitory effect. Besides, the inhibitory effect has been manifested more intensively in hydroponics than in vermiculite, suggesting that NO_3^- would proceed restricting even more the O_2 for the nodule N_2 fixing activity. NO_3^- in aerobic conditions (vermiculite or hydroponics with aeration) promoted the asparagine increase and the glutamine decrease in the xylem exudate.

Anaerobic conditions (partial or total anoxia), specially when it is associated to NO_3^- , caused the decrease of asparagine, glutamine and aspartic acid in the xylem exudate, and a great increase of alanine and serine.

The nodule N_2 fixating activity, was directly proportional to the total ureides amount present in the xylem exudate, and inversely proportional to the NO_3^- , does, the total amount of free amino acids, has shown to be a kind of characteristic which is not much associated to the nodule N_2 fixating activity.

The Lb amount, in each treatment, varied proportionally to the total amount of soluble protein, presenting lower amounts in O_2 associated to NO_3^- (hydroponics + NO_3^- and without aeration) stress treatment. However the Lb answers to the applied treatments were not too expressive, which suggests that the Lb can not be one of the main limiting factors of the soybean nodule N_2 fixating process.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância de N na associação rizóbio-leguminosa:

A soja é uma espécie vegetal cultivada que, pelo elevado teor protéico dos seus grãos (~40%), apresenta grande demanda de N (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Além do N do solo, proveniente da mineralização da matéria orgânica e das rochas, as outras possíveis fontes de N para as plantas são: fertilizantes nitrogenados; NO_3^- incorporado ao solo proveniente das reações de descargas elétricas com o N_2 (~4% das entradas no balanço de N na Terra), e pela FBN (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Os solos do Brasil, de um modo geral, apresentam teores de N não muito elevados (0,05% a 0,30%). Com a intensificação dos cultivos, as exigências nutricionais de N, bem como a sua remoção dos solos, são ampliadas. A reposição de N por meio da aplicação de fertilizantes nitrogenados, apresenta custo elevado, pois a síntese química desses (processo Haber-Bosch) envolve derivados de petróleo (~6 barris de petróleo/t de amônia produzida), cuja fonte é não renovável (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Para alcançar produtividade de 2500 kg/ha, as plantas de soja absorvem cerca de 200 kg de N/ha, dos quais, cerca de 67% a 75% são alocados para as sementes (HUNGRIA *et al.*, 1994; IMSANDE & TOURAINE, 1994). Devido à baixa eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados (inferior a 50%) em

razão de perdas por lixiviação, nitrificação e denitrificação, são necessários de 300 a 400 kg de N/ha para se obter essa produtividade. Considerando-se a safra de soja 1993/94, com área colhida de 11.350.000 ha, e que a recomendação atual, para essa cultura, é de que se faça apenas inoculação, calcula-se que o Brasil economize cerca de 1 bilhão de dólares por safra somente pela prática da inoculação (HUNGRIA et al., 1994).

O N_2 é abundante na atmosfera (cerca de $4.10^{15}t$), mas nenhum animal ou planta superior é capaz de utilizá-lo (SALSAC et al., 1987; NEVES & FRANCO, 1990; HUNGRIA, et al., 1994), apenas as bactérias diazotróficas (NEVES & FRANCO, 1990). Assim sendo, a associação de algumas plantas superiores com bactérias diazotróficas representa, para a agricultura, uma das mais importantes interações bactéria-planta, pois fornece a um custo zero um dos nutrientes minerais que mais limita o crescimento das culturas em solos tropicais (NEVES & FRANCO, 1990).

Em soja, a fonte de N para o desenvolvimento da plântula está contida nas reservas cotiledonares. À medida em que esta vai se tornando autotrófica, a síntese de compostos nitrogenados passa a depender da absorção e assimilação de N mineral. Essa etapa inicial de vida da plântula em simbiose, é de crucial importância para o sucesso no estabelecimento da relação simbiótica rizóbio-planta, pois, nesse estágio no qual o conteúdo de N das sementes está se exaurindo e a fixação do N_2 ainda não se tornou suficientemente ativa, o N combinado ($N-NO_3^-$ e/ou $N-NH_4^+$) passa a ser imprescindível (OBATON et al.,

1982, citado por DREVON et al., 1988B). Concentração elevada de N mineral nessa fase, especialmente NO_3^- , levará a um fracasso na associação simbiótica (STREETER, 1988; EAGLESHAM, 1989) uma vez que o NO_3^- é a fonte primária de N para as plantas (IMSANDE & TOURAINE, 1994). Por outro lado, a carência de N levará a um aparato fotossintético deficiente, e o malogro na associação ocorrerá, uma vez que o processo da FBN requer alta demanda de energia, ou seja, no mínimo 16 moléculas de ATP por molécula de N_2 reduzida (HOWARD & REES, 1994). Dessa forma, os organismos que fixam N_2 apresentam vigoroso metabolismo energético, em que os nódulos podem consumir até 30% dos fotossintatos produzidos pela planta (SCHUBERT & RYLE, 1980, citato por SCHUBERT, 1986).

O efeito inibitório do N mineral, especialmente de NO_3^- , na nodulação e fixação de N_2 em leguminosas, é bem documentado (GIBSON & HARPER, 1985; STREETER, 1988; EAGLESHAM, 1989), e provavelmente seja um dos aspectos da simbiose rizóbio-leguminosa mais estudado (EAGLESHAM, 1989). Apesar de já estabelecido há décadas que o NO_3^- do solo inibe o processo da infecção radicular, o desenvolvimento do nódulo e a atividade da nitrogenase (GIBSON & HARPER, 1985; STREETER, 1988; EAGLESHAM, 1989), além de acelerar o colapso dos tecidos do nódulo (GIBSON & HARPER, 1985), as bases fisiológicas e bioquímicas para o entendimento desses efeitos permanecem desconhecidos (GIBSON & HARPER, 1985; STREETER, 1988; EAGLESHAM, 1989), e não existe, até o momento, nenhuma evidência convincente para explicar o(s) mecanismo(s) para

qualquer um desses efeitos. Portanto o NO_3^- tem papel chave na determinação da extensão da fixação de N_2 pela simbiose rizóbio-leguminosa (STREETER, 1988). Elucidar o mecanismo de inibição da nodulação pelo NO_3^- se torna de importância fundamental, pois, aumentará os conhecimentos sobre a biologia do nódulo e contribuirá para o melhoramento ou engenharia genética da simbiose rizóbio-leguminosa, permitindo a fixação de N_2 na presença de altas concentrações de N no solo (DREVON *et al.*, 1988B).

1.2. Efeito de fitohormônios no processo da nodulação:

Desde que Thimann (1936) propôs que a auxina exerce algum papel no desenvolvimento do nódulo, consideráveis esforços têm sido realizados para demonstrar se os fitohormônios estão envolvidos na nodulação (HIRSCH & FANG, 1994; SAGANUMA *et al.*, 1995).

Uma vez que os hormônios de planta estão envolvidos em outros tipos de organogênese, parece provável que eles tenham um papel no desenvolvimento do nódulo (HIRSCH & FANG, 1994). Entretanto, pouco é conhecido acerca das alterações dos níveis endógenos desses hormônios na planta hospedeira nos estádios iniciais da nodulação (SAGANUMA *et al.*, 1995), e permanece ainda a questão de quais hormônios tomariam parte na formação do nódulo e como estariam envolvidos (HIRSCH & FANG, 1994).

Envolvimento de fitohormônios e/ou de fatores reguladores na nodulação:

A formação de nódulos de raiz fixando N_2 é consequência de uma série de interações entre planta hospedeira e microssimbionte (LIGERO et al., 1991; SPAINK, 1992; HUNGRIA, 1994; DÉNARIÉ et al., 1992, 1996). O processo é regulado por fatores internos da planta, denominados de fatores autoreguladores (CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOFF, 1990), e fatores do meio ambiente, dentre esses o NO_3^- , que é o principal componente da inibição da nodulação e fixação de N_2 (STREETER, 1988).

Há pelo menos duas hipóteses para a conexão entre o fator Nod (sinal externo à planta gerado por algum agente químico, físico e/ou biológico que induz a modificações radiculares no hospedeiro no estágio de pré-infecção - DÉNARIÉ et al., 1992, 1996; SPAINK, 1992; HUNGRIA, 1994) e a organogênese do nódulo (resposta interna da planta). Uma hipótese é que o fator Nod atua como um hormônio ativando divisões das células e formação do primórdio do nódulo. Uma segunda hipótese, mais conservadora, estaria ligada a mudanças no balanço endógeno de hormônios, ocasionadas por um fator Nod induzido por um determinado tratamento. Essa mudança poderia ser ou por alteração efetiva nas concentrações dos fitohormônios endógenos ou por alterações na sensibilidade ao hormônio, por intermédio da expressão de diferentes classes de receptores de hormônios ou de proteínas ligantes (HIRSCH & FANG, 1994).

As duas hipóteses não são mutuamente exclusivas ou seja: a nodulação espontânea em genótipos de alfafa, sem a presença de rizóbio ou qualquer fator externo aparente, é uma evidência de que uma perturbação no balanço hormonal pode por abaixo a percepção de um fator *Nod*. Por outro lado, a formação de pseudonódulos em linhagem de alfafa não nodulante tratada com inibidores do transporte de auxina, como ácido 2,3,5-triidobenzóico (TIBA) e ácido N-(1-nafitil)-fitotalâmico (NPA), indica que a divisão celular pode ser disparada pela percepção de um fator *Nod* (HIRSCH & FANG, 1994).

A autoregulação da nodulação é um possível papel inibitório dos hormônios de planta (CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOFF, 1991). Mutantes supernodulantes de leguminosas apresentam copiosa nodulação em razão de não apresentarem controle autoregulador (HIRSCH & FANG, 1994). O fator autoregulador da nodulação é derivado da parte aérea, o qual é elicitado por uma espécie de mensageiro sistêmico produzido pela raiz (CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOFF, 1991). O sítio de síntese do sinal translocável, controlando a autoregulação da nodulação, são as folhas e não o ápice caulinar (FRANCISCO Jr. & HARPER, 1995). Embora tenham-se especulado que seria o ABA, o fator autoregulador permanece indefinido (HIRSCH & FANG, 1994).

Têm-se especulado, inclusive, do envolvimento de poliaminas no processo regulador da nodulação. Em nódulos de plantas de soja, putrescina e espermidina foram as que se acumularam em quantidades suficientes para inibir o crescimento

de bacteróides de *B. japonicum*, e poderiam funcionar na autoregulação do controle da senescência em nódulos maduros (OZAWA & TSUJI, 1993).

Os próprios fatores *Nod* (lipo-quitinooligossacarídeos), sintetizados pelos rizobia e utilizados como sinalizadores moleculares, são capazes de fazer disparar, na planta, várias respostas, apresentando claramente atividade reguladora de crescimento em leguminosas (DÉNARIÉ et al., 1996). Como exemplo, pode ser citado o lipo-oligossacarídeo isolado de *B. elkanii* e inoculado em raiz de soja (*G. soja*), que induziu a formação de uma estrutura morfológicamente completa de nódulo determinado, semelhante a nódulos induzidos pelos rizobia (STOKKERMANS & PETERS, 1994). Também a co-inoculação de raízes de soja com *B. japonicum* e o fungo micorrízico *Glomus mosseae*, em que aumentou consideravelmente a colonização pelo fungo, é um outro exemplo sugerindo que flavonóides mediam fatores *Nod*, que induzem, de alguma forma, a colonização das raízes pelo fungo micorrízico (XIE et al., 1995).

Há algumas evidências da participação de auxina na nodulação em raízes. Em *Vigna radiata* há uma relação entre efeito inibitório do NO_3^- , absorção de H_2 pela estirpe de rizobia e reversão da inibição pelo AIA, sugerindo que o NO_3^- afeta o processo da nodulação, afetando a síntese ou o requerimento de AIA para ocorrer a infecção do pêlo radicular (SING & LODHA, 1989).

B. elkanii difere de *B. japonicum* pela capacidade de sintetizar e excretar AIA no meio de cultura (MINAMISWA & FUKAI, 1991). Além disso, somente *B. elkanii* é capaz de elicitar o fenótipo OCS (outer cortical swelling), uma "tumefação" em raízes de soja, sugerindo que AIA e seus compostos correlatos podem estar envolvidos na elicitação desse fenótipo por raízes de soja (YUHASHI et al., 1995).

Em mutante de soja não nodulante, o tratamento com auxina sintética (2,4-Diclorofenoxiacetato) elicitou a formação de nódulos (AKAO et al., 1991). Foi também observado que mutantes de *B. elkanii* deficientes em AIA, tiveram restaurada, a nível original de seu parental, a capacidade de nodular soja pela aplicação exógena de AIA, sugerindo fortemente que o AIA produzido por *B. alkanii* está envolvido na formação do nódulo em soja. Além disso, a produção de AIA por *B. elkanii* pode manter a atividade meristemática, a qual poderia ser uma forma de aumentar a nodulação em soja (FUKUHARA et al., 1994).

RIGAUD & PUPO (1975) também observaram que bacteróides de nódulos de soja foram hábeis em degradar aerobicamente substanciais quantidades de AIA. Porém, sob baixa pO_2 a oxidação do AIA por bacteróides diminuiu. Todavia, como nódulos provavelmente estão sob baixa pO_2 , a degradação de AIA em bacteróides pode ser limitada.

Em *B. japonicum* a biossíntese de AIA ocorre apenas em estirpes do genótipo II, as quais também produzem rizobitoxina - um potente inibidor da biossíntese de etileno - (MINAMISAWA &

FUKAI, 1991). Entretanto estirpes desse genótipo atualmente estariam classificados como *B. elkanii*, tendo como principal característica a capacidade de sintetizar e excretar AIA no meio (BODDEY & HUNGRIA, 1994).

Auxinas são conhecidas por estimular a produção de etileno em grande variedade de tecidos de planta, levando a vários processos fisiológicos, como por exemplo, epinastia, inibição do crescimento longitudinal e indução de raízes (YU & YANG, 1979). No modelo proposto para a biossíntese de etileno ($\text{Met} \rightarrow \text{SAM} \rightarrow \text{ACC} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$), o AIA e o AVG atuam no passo $\text{SAM} \rightarrow \text{ACC}$, ativando e inibindo, respectivamente, a atividade da enzima ACC sintase, enquanto que Co atua no passo $\text{ACC} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$ inibindo a atividade da EFE (Ethylene Forming Enzyme), ou ACC oxidase (LAU & YANG, 1976; YU & YANG, 1979). Dessa forma, a produção de etileno induzida por auxina, como também por outros fatores, pode ser inibida por AVG ou por Co (YU & YANG, 1979).

O etileno tem estado implicado em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta, como resposta ao estresse e senescência (LEE & LARUE, 1992). Como regulador natural do crescimento, pode afetar muitos aspectos do desenvolvimento de raiz e formação do nódulo (LIGERO et al., 1991), podendo funcionar como um potente inibidor da nodulação (GROBBELAAR et al., 1971; GOODLASS & SMITH, 1979; HIRSCH & FANG, 1994). Porém, a resposta ao etileno depende de vários fatores, como espécie, tipo de tecido e estágio de desenvolvimento (LEE & LARUE, 1992).

Aumento na liberação de etileno, em resposta à inoculação, foi observado em plantas de alfafa (*Medicago sativa*) inoculadas com *R. meliloti* (LIGERO et al., 1986), em plantas de *Vicia sativa* ssp. *nigra*, inoculadas com *R. leguminosarum* (VAN WORKUM et al., 1995), e em plantas de soja inoculadas com *B. japonicum* (HUNTER, 1993; SAGANUMA et al., 1995). Além disso, etileno exógeno reduziu o número de nódulos em raízes excisadas de feijão (*P. vulgaris*) (GROBBELAAR et al., 1971), em plantas de ervilha (*P. sativum*) intactas e em trevo (*Trifolium repens*) (GOODLASS & SMITH, 1979), em ervilha (*P. sativum* cv. Sparkle), em trevo doce (*Melilotus alba*) e mutante de ervilha hipernodulante (LEE & LARUE, 1992), e em *V. sativa* ssp. *nigra* (ZAAT et al., 1989).

De acordo com LEE & LARUE (1992), o etileno exógeno não inibe o número de infecções na raiz, pois seu efeito na nodulação não ocorre nos estádios iniciais da nodulação tais como colonização dos rizobia sobre o pêlo radicular ou início da formação e crescimento do cordão de infecção. O seu efeito é bloquear o cordão de infecção, ou na parte basal das células epidérmicas ou fora do córtex, já que poucos cordões penetram no córtex. A penetração do cordão de infecção a partir da epiderme até a parte externa do córtex, parece ser o estágio mais sensível ao etileno exógeno.

Em algumas espécies e situações, o emprego de inibidores da síntese (AVG e Co) e da ação (Ag) de etileno, têm sido eficientes na restauração total ou parcial da nodulação. Assim,

a adição de AVG em cultura de *V. sativa* ssp. *nigra* suprimiu o desenvolvimento do fenótipo Tsr (thick and short roots) em raízes e restaurou a nodulação (ZAAT et al., 1989). A inibição da nodulação provocada pelo etileno exógeno em *P. sativum* cv. Sparkle também foi controlada com a aplicação de Ag (LEE & LARUE, 1992). Em alfafa (*M. sativa*) inoculada com *R. meliloti*, o AVG aumentou a nodulação, mesmo quando aplicado até 3 dias após a inoculação (PETERS & CRIST-ESTES, 1989), provavelmente em razão do etileno não atuar nos estádios iniciais da nodulação, conforme observado por LEE & LARUE, 1992). Mutante sym 5 de *P. sativum* cv. Sparkle, que normalmente apresenta pobre nodulação ou tem o desenvolvimento do nódulo bloqueado no estágio de primórdio, também aumentou a nodulação ou teve restituído o seu desenvolvimento normal se tratado com AVG, Co ou Ag (FERAN & LARUE, 1991; GUINEL & LARUE, 1992). Mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, deficientes em exopolissacarídeos, somente nodulam *V. sativa* ssp. *nigra* quando a produção de etileno pelas raízes do hospedeiro, resultantes da inoculação rizobiana, é minimizada com uso de AVG (VAN WORKUM et al., 1995). Também, o efeito inibitório de NO_3^- na nodulação em alfafa (*M. sativa*) foi controlado pela aplicação de AVG, o que suporta a hipótese de que o efeito de NO_3^- inibindo a nodulação em alfafa é mediado pelo etileno (LIGERO et al., 1991).

Apesar da nodulação em ervilha e trevo ter sido inibida pelo etileno exógeno, em soja esta não foi significativamente alterada (LEE & LARUE, 1992). Isso demonstra que a soja é menos

sensível ao etileno do que outras leguminosas como ervilha e trevo doce, e que a resposta ao etileno é provavelmente mediada mais pela planta do que pelo rizobia (LEE & LARUE, 1992).

Raízes de soja noduladas produzem mais etileno e contêm mais ACC do que raízes não inoculadas (HUNTER, 1993). Também, a produção de etileno por raízes de soja foi estimulada pela inoculação com *B. japonicum*, a qual foi, de certo modo, relacionada com a infecção rizobiana (SAGANUMA et al., 1995). Todavia, não é claro se o etileno exerce algum efeito direto no processo da nodulação em soja, visto que o aumento na produção de etileno por raízes de soja inoculadas ocorreu transientemente, poucos dias após a inoculação e antes dos nódulos tornarem-se visíveis, e o número de nódulos formados nas raízes não foi afetado pelo tratamento com AVG (10 μ M) (SAGANUMA et al., 1995).

O NO_3^- estimulou a produção de etileno e inibiu a nodulação em alfafa, porém o AVG reduziu a produção de etileno e restaurou a capacidade de nodulação. Isso sugere que o NO_3^- estaria ligado a um fator autoregulador. Esse fator poderia acelerar a maturação dos tecidos da raiz e assim encurtar o período transiente da susceptibilidade das células à infecção, resultando em decréscimo na probabilidade da célula ser infectada ou que poucas infecções possam se desenvolver em nódulo. O etileno endógeno, induzido em resposta à infecção e/ou ao NO_3^- , poderia ser um candidato a esse fator (LIGERO et al., 1991).

Todavia, de acordo com LEE & LARUE (1992), não há evidência direta de que o etileno endógeno está envolvido regulando a nodulação. Se o etileno regula o número de nódulos esse pode atuar mais num estágio de desenvolvimento do nódulo, que seria na passagem do cordão de infecção, à partir da célula epidérmica, para dentro do córtex e na iniciação do primórdio do nódulo. Assim sendo, a utilização de estirpes de *B. japonicum* que produzem rizobitoxina poderia ser útil para estudar o envolvimento do etileno na nodulação de soja (SAGANUMA *et al.*, 1995).

Resultados observados sugerem que os hormônios de planta estão envolvidos na organogênese de nódulos como sinal secundário (HIRSCH, 1992). No caso de mutante deficiente em exopolissacarídeos, a formação de etileno precede a infecção da raiz, tendo como resultado uma nodulação deficiente. Isso sugere que sinais *Nod* rizobiano, ou a própria ausência desses, poderiam atuar induzindo a formação de etileno nas raízes da planta hospedeira. Influenciando o crescimento das células da raiz, o etileno promoveria inibição no local exato da infecção pelo rizobia (VAN WORKUM *et al.*, 1995).

Baseado nos resultados levantados da literatura, faltam evidências do envolvimento direto de fitohormônios no processo da nodulação. Auxina e etileno parecem ser os dois fitohormônios que estariam atuando mais prontamente no processo; auxina, talvez, atuando até como indutora da síntese de etileno. Evidências levam a supor que esses fitohormônios

estariam sendo produzidos em resposta a um fator *Nod* rizobiano e/ou tratamento, como o NO_3^- por exemplo, ou mesmo em resposta a falta de um fator *Nod* rizobiano, como a deficiência de exopolissacarídeos.

1.3. Efeito de NO_3^- na nodulação e na fixação de N_2 :

O NO_3^- pode inibir a relação simbiótica rizóbio-planta de duas formas: a) no processo inicial de infecção e formação do nódulo (nodulação); b) na simbiose já pré-estabelecida, inibindo a atividade fixadora de N_2 da N_2 ase.

a) Efeito de NO_3^- na nodulação:

Embora a inibição da formação do nódulo pelo NO_3^- seja conhecida há mais de 100 anos, pouco é conhecido acerca do (s) mecanismo(s) envolvido(s), e há relativamente pequeno esforço no sentido de elucidá-lo(s) (STREETER, 1988). Há basicamente três razões para isso: a nível de campo a infecção é inibida somente em concentrações de NO_3^- relativamente elevadas, e assim, seu efeito pode não ser importante na produção de culturas; podem existir grandes diferenças entre estirpes de rizóbio com relação ao efeito de NO_3^- no processo de infecção, complicando ainda mais as tentativas para elucidar o(s) mecanismo(s); e talvez a mais importante, é o fato do processo de infecção, além de complexo, ainda não ser bem entendido, dificultando seu estudo a nível molecular (STREETER, 1988).

A implicação da produção de AIA por *Rhizobium* infectando pêlos radiculares (KEFFORD et al., 1960, citado por EAGLESHAM, 1989), levou à teoria de que o efeito de NO_3^- inibindo a nodulação era consequência da destruição catalítica de AIA, na rizosfera, produzida pelo NO_2^- formado a partir da redução rizobiana de NO_3^- (TANNER & ANDERSON, 1964, citado por EAGLESHAM, 1989). Entretanto, essa explicação perdeu suporte quando mutantes de *Rhizobium* deficientes em NR tiveram a capacidade de nodulação inibida pela aplicação de NO_3^- (GIBSOM & PAGAN, 1977; GIBSOM & HARPER, 1985).

O NO_3^- inibe a nodulação por reduzir a deformação do pêlo radicular (TRUCHET & DAZZO, 1982), inibir a iniciação da infecção e a divisão das células corticais (MALIK et al., 1987), a formação do cordão de infecção (MUNNS, 1968; MALIK et al., 1987), e aumentar o número de infecções abortadas (MUNNS, 1977, citado por STREETER, 1988). Dessa forma, o NO_3^- parece bloquear a iniciação da infecção por impedir a formação do cordão de infecção e a divisão inicial de células do córtex da raiz (MALIK et al., 1987).

As primeiras divisões de células do córtex de raiz de soja induzidas pelos rizobíia são completadas dentro de 12 horas após a inoculação (MALIK et al., 1987), e continuam durante o desenvolvimento da infecção (CALVERT et al., 1984; MALIK et al., 1987), enquanto que o cordão de infecção não se torna evidente até cerca de 24 horas após a inoculação (TURGEON & BAUER, 1985). Porém plântulas expostas ao NO_3^- 18 horas após a

inoculação, apresentaram menor inibição da nodulação pelo NO_3^- . Assim sendo, a maioria dos eventos relacionados com a infecção, e que são sensíveis ao NO_3^- , estariam funcionalmente completos em tempo inferior a 18 horas (MALIK et al., 1987). TRUCHET & DAZZO (1982) também observaram a formação de alguns nódulos funcionais em plantas de lucerne expostas ao NO_3^- (18 mM) cinco dias após a inoculação. Por outro lado, plantas de soja expostas ao NO_3^- (15 mM) por até 24 horas após a inoculação, seguido de transferência e condução livre de NO_3^- , não apresentaram inibição substancial do número de nódulos, indicando que o efeito inibitório do NO_3^- sobre a iniciação da infecção pode ser reversível (MALIK et al., 1987).

Embora as divisões de células do córtex e formação do cordão de infecção tenham sido bloqueadas pela exposição ao NO_3^- (15 mM), é possível que esses processos sejam insensíveis ao NO_3^- e que a sua inibição seja em consequência da sua iniciação ser dependente de outros eventos iniciais que são sensíveis ao NO_3^- (MALIK et al., 1987). Identificar esses eventos iniciais do processo da nodulação sensíveis ao NO_3^- não é fácil. Em soja, esses eventos têm início poucas horas após a inoculação, os quais podem estar funcionalmente completos dentro de 18 horas, incluindo o contato com exsudatos da bactéria e raiz, e ligação da bactéria (VIGUE et al., 1977; VESPER & BAUER, 1985), emergência e indução da deformação do pêlo radicular (TURGEON & BAUER, 1985), e indução inicial da divisão de células do córtex

(CALVERT et al., 1984). A exposição ao NO_3^- pode afetar um ou mais desses passos (MALIK et al., 1987).

Outro fator que tem sido relacionado com a nodulação são as lectinas - proteínas ou glicoproteínas que se ligam aos polissacarídeos de origem da bactéria e mediam a ligação do rizobia ao pêlo radicular - (CAETANO-ANOLLÉS & GRESSHOFF, 1991). Inicialmente atribuiu-se o efeito inibitório do NO_3^- na nodulação por impedir a síntese de lectinas, e por essa forma bloquear o reconhecimento e adesão dos rizobia ao pêlo radicular (DAZZO & BRILL, 1978). Posteriormente foi mostrado que o NO_3^- não inibe diretamente a ligação do *Rhizobium* ao pêlo radicular (DAZZO & HRABACK, 1982), nem reprime a síntese de lectinas, porém o NO_3^- reduz o número de sítios de ligação, afetando a distribuição e a atividade das lectinas recém-sintetizadas (SHERWOOD et al., 1984).

Especialmente nos estádios iniciais da nodulação não existe evidência clara se o efeito inibitório é devido a presença externa do NO_3^- (efeito direto ou também denominado de efeito "raiz-localizado") ou de eventos que se seguem à sua absorção e metabolismo (efeito "planta-toda"), ou também se a inibição é primariamente devida à planta hospedeira ou à estirpe de bactéria (GIBSON & HARPER, 1985).

Usando o sistema de particionamento de raiz (HINSON 1975) e sistema de enraizamento duplo por meio da obtenção de raízes adventícias pelo processo de mergulhia (EAGLESHAM 1989), os autores concluíram que o efeito inibitório de NO_3^- é

predominantemente mediado via mecanismo "raiz-localizado" do que via mecanismo ligado ao status de N na "planta-toda". Além disso, GIBSON & HARPER (1985), observaram que a concentração de NO_3^- circundando a raiz parece ter mais importância na iniciação da nodulação, enquanto que a taxa de absorção e metabolismo de NO_3^- parece exercer maior efeito sobre o desenvolvimento do nódulo e atividade da N_2 ase. Porém, MALIK et al., (1987) observaram maior efeito inibitório de NO_3^- na nodulação quando adicionado abaixo da porção da raiz inoculada, do que quando aplicado na porção superior da raiz (juntamente com a porção inoculada), demonstrando que a concentração externa de NO_3^- em contato com as células da raiz suportando a infecção não é crucial na determinação da inibição. Uma vez que não encontraram correlação entre a inibição da nodulação e as concentrações interna e externa de NO_3^- , concluíram que: o NO_3^- , por si só, não pode ser o causador da inibição da infecção; parece ser pouco provável que o NO_3^- seja o indutor ativo de uma resposta inibitória, por parte do hospedeiro, à infecção.

b) Efeito de NO_3^- na fixação de N_2 :

Existem basicamente três hipóteses para tentar explicar o(s) mecanismo(s) da inibição da fixação de N_2 pelo NO_3^- em simbiose pré-estabelecida: a primeira hipótese baseia-se numa suposta limitação de carboidratos (fonte de poder redutor e energia) para o funcionamento do nódulo, em consequência do consumo desses na redução de NO_3^- e assimilação do produto da

sua redução (NH_4^+) pela planta; a segunda hipótese baseia-se num efeito tóxico gerado pelo metabolismo de NO_3^- no nódulo; uma terceira hipótese, mais recente, baseia-se na limitação de O_2 para a atividade do bacteróide, proporcionada por uma suposta barreira à difusão de O_2 no córtex do nódulo, intensificada pela presença de NO_3^- .

Limitação de carboidratos:

A limitação de carboidratos privando os bacteróides de poder redutor e de energia para a fixação de N_2 , é atribuída ao consumo dessas fontes no processo de redução de NO_3^- , o qual pode ocorrer na parte aérea, na raiz e/ou no nódulo (DREVON et al., 1988B).

Em razão da redução de NO_3^- ser um processo com alto consumo de energia (cerca de 15-16 ATP/mol de NO_3^- reduzido - SALSAC et al., 1987), foi inicialmente sugerido que o consumo de equivalentes redutores para o metabolismo de NO_3^- , na parte aérea e/ou raiz de leguminosas noduladas, poderia privar os nódulos do suprimento de carboidratos e causar decréscimo na atividade da N_2 ase (SMALL & LEONARD, 1969; OGHOGHORIE & PATE, 1971; GIBSON & HURPER, 1985; DREVON et al., 1988B; EAGLESHAM, 1989). Argumentos que suportam essa hipótese são: a) a translocação de ^{14}C fotossintatos foi menor para nódulos expostos ao NO_3^- (SMALL & LEONARD, 1969; OGHOGHORIE & PATE, 1971); b) a adição de açúcares marcados no meio radicular aliviou, em parte, o efeito adverso de NO_3^- sobre a N_2 ase

(CARROL & GRESSHOFF, 1983, citado por BECANA & SPRENT, 1987); e c) a inibição da N_2 ase foi estritamente relacionada com o decréscimo na importação e conteúdo de carboidratos nos nódulos (WASFI & PRIOUL, 1986, citado por BECANA & SPRENT, 1987).

Contra essa hipótese pode ser argumentado que: a) o decréscimo na translocação de fotossintatos para nódulos expostos ao NO_3^- pode ser uma consequência e não a causa do decréscimo da atividade da N_2 ase, se assumirmos que a inibição da atividade da enzima foi causada diretamente pelo NO_3^- , provocando uma posterior diminuição na atividade dreno do nódulo por fotossintatos (GIBSON & PAGAN, 1977; DREVON *et al.*, 1988B); b) em espécies tais como soja, o conteúdo de carboidratos do nódulo não se altera, mesmo sob concentrações de NO_3^- suficientes para reduzir a atividade da N_2 ase (STREETER, 1981, 1985B); c) em outras espécies, tais como trevo branco, o conteúdo de carboidratos do nódulo decresce após a atividade da N_2 ase (MINCHIN *et al.*, 1986); d) aumento da concentração de CO_2 na atmosfera nodular, não preveniu os efeitos adversos de NO_3^- sobre a N_2 ase em ervilha (CHEN & PHILLIPS, 1977); e) a liberação parcial da inibição da N_2 ase pela adição de sacarose pode ser mediada por decréscimos na absorção de NO_3^- pelas raízes e no acúmulo de NO_2^- em nódulos (STEPHENS & NEYRA, 1983); f) aumento da fotossíntese líquida, aumentando a concentração de CO_2 do ar circundando as folhas, não aumentou, a curto prazo, a atividade da nitrogenase (WILLIAMS *et al.*, 1982); a longo prazo, o aumento da atividade da nitrogenase, sob alta concentração de

CO₂, poderia ser atribuído ao incremento da massa nodular e do número de nódulos suportado pela planta (DREVON et al., 1988B). Além disso, o consumo de equivalentes redutores e ATP para a redução de NO₃⁻ em folhas, é insignificante comparado ao suprimento de fotossintatos. Por conseguinte, a redução foliar de NO₃⁻ pode afetar significativamente o suprimento de carboidratos para os nódulos somente quando a capacidade fotossintética das plantas estiver limitada por condições deficientes de crescimento (DREVON et al., 1988B).

Outra explicação para a hipótese de limitação de carboidratos para o funcionamento do bacteróide, e consequentemente inibição da fixação de N₂, é a redução de NO₃⁻ dentro do nódulo, a qual pode ocorrer no citossol da célula da planta e/ou no bacteróide, gerando competição por energia entre os dois processos dentro do próprio nódulo (DREVON et al., 1988B). A redução de NO₃⁻ a NH₄⁺ requer uma oxidação de NADH e NADPH, as quais somam o equivalente energeticamente a hidrólise de 15-16 ATP por NH₄⁺ sintetizado (SALSAC et al., 1984, citado por DREVON et al., 1988B). A incorporação de NH₄⁺ no esqueleto carbônico, catalizada pela GS-GOGAT dentro do nódulo, consome um oxalacetato, um NADPH e um ATP. O consumo de substratos de C e de poder redutor no metabolismo de NO₃⁻ pode, portanto, competir com o suprimento de energia para os bacteróides (DREVON et al., 1988B). Argumentos suportando essa proposição são: a) NH₄⁺ inibe a fixação de N₂, contudo, menos drasticamente que o NO₃⁻, em concentração similar (KIMOU et al., 1985, citado

por DREVON et al., 1988B); b) a inibição pelo NH_4^+ é aliviada pela presença de metionina sulfoximina, a qual é inibidor da glutamina sintetase (HOUWAAORD, 1979, citado por DREVON et al., 1988B); c) a respiração ligada à N_2 ase, e a atividade da N_2 ase são menos estimuladas pelo O_2 externo em presença de NO_3^- (MINCHIN et al., 1986; HECHMANN & DREVON, 1987); d) o suprimento externo de malato (suposto substrato de bacteróides em plantas), alivia a inibição pelo NO_3^- (HECHMANN & DREVON, 1987; DREVON et al., 1988B).

Portanto parece duvidoso afirmar que a inibição da fixação de N_2 pelo NO_3^- seja devida ao baixo suprimento de fotossintatos pela planta hospedeira para os nódulos como consequência do metabolismo foliar de NO_3^- ; a redução nodular de NO_3^- pode ser a maior causa dessa inibição (DREVON et al., 1988B).

Efeito tóxico do metabolismo de NO_3^- no nódulo:

A capacidade do nódulo de metabolizar NO_3^- tem merecido atenção nos anos recentes em função da possibilidade da geração de, além de NO_2^- , outros produtos tóxicos derivados da redução de NO_3^- dentro do nódulo (STREETER, 1988).

O metabolismo de NO_3^- no nódulo, e seu papel inibindo a N_2 ase, é altamente controvertido, e mais sofisticado do que previamente suposto (MINCHIN et al., 1989). BECANA et al., (1989) sugerem que o efeito de NO_3^- na atividade da N_2 ase é dependente do tempo de exposição e da concentração de NO_3^- . Assim, exposição de curta duração (<3 dias), o NO_3^- não alcança

a região do bacteróide, e por essa razão a NRA do bacteróide é limitada pelo substrato. O NO_2^- produzido pela NR citossólica não é suficiente para interferir na atividade da N_2 ase e/ou no funcionamento da Lb, essa última não sendo degradada (BECANA et al., 1989). Exposição de média duração (~7 dias), em baixa concentração de NO_3^- (≤ 5 mM), o NO_3^- não alcança o bacteróide. O NO_2^- é gerado e acumulado no citossol e pode, em alguns casos, já ser tóxico, mas o conteúdo de Lb continua sem ser afetado (BECANA et al., 1988, 1989). Exposição de média duração (~7 dias), mas em altas concentrações de NO_3^- (10-20 mM), o NO_3^- entra no bacteróide e grandes quantidades de NO_2^- são geradas pela NRs do citossol e do bacteróide. Nódulos senescem rapidamente, com aumento da proteólise de Lb (e de outras proteínas solúveis), destruição do grupo heme e formação de pigmentos parecidos com biliverdina (BECANA et al., 1985A,B, 1988, 1989). Porém, de acordo com observações de SPRENT et al. (1987), GIANNAKIS et al. (1988) e MIZUKOSHI et al. (1995), o NO_3^- é excluído de entrar na zona do bacteróide ficando restrito ao córtex do nódulo, complicando as colocações acima.

MINCHIN et al. (1989) sugerem que os nódulos apresentam dois estádios de resposta ao NO_3^- . Inicialmente o NO_3^- é impedido de entrar na zona do bacteróide (SPRENT et al., 1987; GIANNAKIS et al., 1988; MIZUKOSHI et al., 1995), fica restrito ao córtex do nódulo, causa um incremento reversível na resistência à difusão de O_2 , restringindo o acesso de O_2 aos

bacteróides e reduzindo a atividade da N_2 ase (MINCHIN et al., 1989). Como nessa situação, nem o NO_3^- nem o produto da sua redução alcançam o bacteróide, o NO_3^- deve exercer um efeito detrimental a nível de córtex do nódulo (BECANA et al., 1989). Se esse incremento na resistência à difusão de O_2 é gerado por alterações no particionamento de fotossintatos para os nódulos em resposta ao NO_3^- (VESSEY et al., 1988B), é uma questão a ser respondida (MINCHIN et al., 1989). Porém, não havendo destruição da N_2 ase, se o NO_3^- for removido, a re-introdução da fixação de N_2 pode ocorrer com um pequeno custo para a planta hospedeira (MINCHIN et al., 1989). No segundo estágio, com a continuidade da exposição ao NO_3^- por vários dias e/ou alta concentração, esse pode entrar na zona do bacteróide e quantidades tóxicas de NO_2^- podem ser acumuladas, geradas no bacteróide e/ou citossol, pelas NRs que foram induzidas no primeiro estágio; concomitantemente, acontece a ineficiência da NiR do nódulo (BECANA et al., 1989; MINCHIN et al., 1989). Esse NO_2^- pode causar danos irreversíveis, induzindo danos à N_2 ase e/ou à Lb, acelerando o processo de senescência (BECANA & SPRENT, 1987).

De acordo com DREVON et al. (1988B), dentro do nódulo o NO_3^- pode ser metabolizado na fração citossólica ou no rizobia; entretanto, uma vez que a ausência de NR bacteriana não modifica significativamente a inibição da N_2 ase pelo NO_3^- , esse fenômeno pode ser muito mais relacionado com o metabolismo citossólico do NO_3^- . Dessa forma a redução nodular de NO_3^- pode

inibir a atividade da N_2 ase bacteriana via NO_2^- gerado e/ou por competição por poder redutor.

O NO_2^- é encontrado à concentração de cerca de 0,5 mM no citossol de nódulos com alta NRA (STREETER, 1982; BECANA et al., 1985A). Durante o enchimento e maturação das vagens, a concentração pode aumentar para 1mM, enquanto que o conteúdo de NO_2^- no citossol das raízes permanece a nível muito baixo (HECKMAN & DREVON, 1987). Esse acúmulo de NO_2^- pode inibir a fixação de N_2 , visto que o NO_2^- é um potente inibidor, não somente da N_2 ase (KENNEDY et al., 1975; RIGAUD & PUPPO, 1977), mas também da Lb (TRINCHANT & RIGAUD, 1982). O NO_2^- pode trazer como consequência decréscimo no suprimento de O_2 para o bacteróide, e afetar a fixação de N_2 , uma vez que a concentração de O_2 do ar parece ser limitante à atividade da N_2 ase no nódulo (CRISWELL et al., 1977; RALSTON & IMSAND, 1982; DREVON et al., 1987). Entretanto, parece duvidoso que o acúmulo de NO_2^- dentro do nódulo possa sozinho explicar a inibição da fixação de N_2 pela presença de NO_3^- , uma vez que, na ausência de NR bacteriana (mutantes NR^-) decresce consistentemente a concentração de NO_2^- sem minorar significativamente a inibição da N_2 ase (STREETER, 1985B; DREVON et al., 1988B).

Os principais argumentos suportando a hipótese de que o NO_2^- é o metabólito inibitório da atividade da N_2 ase são: a) NO_2^- inibe fortemente a atividade da N_2 ase purificada (TRINCHANT & RIGAUD, 1980, 1982), a atividade fixadora de N_2 em extrato bruto de bacteróides (KENNEDY et al., 1975), em bacteróides

isolados (RIGAUD et al., 1973) e em nódulos intactos (KAMBERGER, 1977, citado por BECANA & SPRENT, 1987). Isso é explicado pela capacidade do NO_2^- de se ligar reversivelmente ao componente MoFe da N_2 ase e, dessa forma, inibir competitivamente a N_2 ase (TRINCHANT & RIGAUD, 1980). Entretanto, o NO_2^- poderia continuar o processo de redução (O'HARA & DANIEL, 1985, citado por BECANA & SPRENT, 1987) e novos produtos da denitrificação (NO e N_2O), que também inibem a N_2 ase (TRINCHANT & RIGAUD, 1982), serem produzidos. A possibilidade desses compostos mediar o efeito tóxico de NO_2^- pode ser considerada (BECANA & SPRENT, 1987). Na verdade, a denitrificação de NO_3^- a N_2O (e provavelmente a N_2) por nódulos intactos de soja tem sido observada (SMITH & SMITH, 1986); b) NO_2^- combina-se reversivelmente com Lb^{2+} e a oxida a Lb^{3+} , uma forma inapta para transportar O_2 (RIGAUD & PUPPO, 1977); c) NO_2^- acumula-se em nódulos de algumas espécies com NR de bacteróide ativa em quantidade suficiente para inibir a N_2 ase ou oxidar a Lb *in vitro* (KENNEDY et al., 1975; RIGAUD & PUPPO, 1977; TRINCHANT & RIGAUD, 1980); d) NO_2^- acumulado em nódulos de soja correlacionou-se negativamente com o crescimento do nódulo (massa de nódulos/planta), tanto em estirpe NR^+ quanto em NR^- (STREETER, 1982); e) NO_2^- acumulado em nódulos de soja, correlacionou-se inversamente com a atividade da N_2 ase (STREETER, 1985B).

As principais objeções a essa hipótese são: a) estirpes de *Rhizobium* NR^+ , NR^- ou com NRA muito baixa, são igualmente

suscetíveis à inibição por NO_3^- (GIBSON & PAGAN, 1977; STREETER, 1985A); b) em nódulos de ervilha e de feijão nos quais os bacteróides não expressam NR, existe pequena quantidade (traços) de NO_2^- que é insuficiente para justificar a inibição observada da N_2 ase (BECANA & SPRENT, 1987); c) quando concentração relativamente baixa de NO_3^- é aplicada a nódulos de plantas inoculadas com rizobio NR^+ , inibição substancial da N_2 ase pode ser observada, sem que se detecte acúmulo de NO_2^- (BECANA & SPRENT, 1987).

Em resumo, a hipótese da toxicidade de NO_2^- , à primeira vista, parece atrativa visto que o NO_2^- é um potente inibidor da N_2 ase (STREETER, 1988). Entretanto pelas objeções acima citadas, parece duvidoso ser o NO_2^- a principal ou a única causa da inibição da N_2 ase pela exposição ao NO_3^- (DREVON, et al., 1988B; STREETER, 1988).

Recentemente tem sido levantada a possibilidade de um efeito direto de NO_3^- a nível de PBM de PBUs, afetando as trocas metabólicas entre bacteróide e planta. A PBM possui ATPase (BLUMWALD et al., 1985), o que pode gerar um potencial elétrico de membrana (interior positivo) em PBUs intactos (UDVARDI & DAY, 1989). A presença de ânions, tais como NO_3^- , pode reduzir a magnitude da diferença de potencial elétrico da PBM, e assim, inibir qualquer processo do transporte dependente de energização da PBM (UDVARDI & DAY, 1989). Um rápido movimento de NO_3^- através da PBM de PBUs pode desacoplar as trocas metabólicas entre o bacteróide e o hospedeiro, com isso,

inibindo a fixação de N_2 (UDVANDI & DAY, 1989). Queda no transporte de ácidos dicarboxílicos (malato e succinato) através da PBM de PBUs, pela presença de NO_3^- foi evidenciada por VASSILEVA & IGNATOV (1996). Concomitantemente o NO_3^- proporcionou acúmulo de PHB (VASSILEVA & IGNATOV, 1996), o qual atua competitivamente com a atividade da N_2 ase (BERGERSEN & TURNEER, 1993, citado por VASSILEVA & IGNATOV, 1996). Altos níveis de NO_3^- levariam a um decréscimo na atividade da malato desidrogenase (menor produção de oxalacetato), o que, com a atuação da enzima málica, levaria a um acúmulo de PHB. Acúmulo de PHB, juntamente com a redução da absorção de malato, levaria à inibição da fixação de N_2 (VASSILEVA & IGNATOV, 1996).

Redução à difusão de O_2 dentro do nódulo:

Evidências mais recentes levam à hipótese de que a inibição da fixação de N_2 pelo NO_3^- envolve o decréscimo do suprimento de O_2 para a respiração na zona central do nódulo (LAYZELL et al., 1990; VESSEY & WATERER, 1992; HUNT & LAYZELL, 1993; DENISON & HARTER, 1995), e dessa forma, alterando a capacidade respiratória dos bacteróides (TRINCHANT & RIGAUD, 1982; HUNT & LAYZELL, 1993). Decréscimo na permeabilidade do nódulo ao O_2 , têm sido observado nas leguminosas em resposta a várias formas de estresse, inclusive ao NO_3^- (HUNT & LAYZELL, 1993). O decréscimo na atividade da N_2 ase em bacteróides de nódulos previamente tratados por 24 horas com 7 mM de NO_3^- , pode ser parcialmente aliviado pela adição de oxyLb à suspensão de

bacteróides (BECANA & SPRENT, 1987) ou elevando-se a pO_2 externa (VESSEY et al., 1988A). Isso sugere que o NO_3^- pode exercer dupla ação na fixação de N_2 : efeito direto sobre a enzima N_2 ase e atraso na respiração do bacteróide (BECANA & SPRENT, 1987).

A barreira à difusão de O_2 no interior do córtex do nódulo é muito variável entre as leguminosas, e talvez seja regulada por uma proporção relativa de água e gás, os quais ocupam os espaços intercelulares nessa camada de tecido (HUNT et al., 1989; LAYZELL et al., 1990). Nódulos de soja apresentam habilidade de se adaptar às concentrações de O_2 do ambiente, a qual envolve o decréscimo dos espaços intercelulares com o aumento da concentração de O_2 (PARSONS & DAY, 1990).

A inibição da atividade da N_2 ase em resposta a tratamentos de limitação do suprimento da seiva do floema aos nódulos (anelamento, desfolhamento, etc), foi inicialmente atribuída à redução na disponibilidade de carboidratos para os nódulos, com consequente redução do tamanho da fonte de poder redutor requerido pela N_2 ase (LAYZELL et al., 1990; HUNT & LAYZELL, 1993). Entretanto, nessa situação, a atividade da N_2 ase pode ser parcialmente ou completamente recuperada pelo aumento da pO_2 na rizosfera (HARTWING et al., 1987; VESSEY et al., 1988A), indicando que a atividade da N_2 ase é limitada mais pelo suprimento de O_2 (por meio da disponibilidade de ATP) do que pela disponibilidade de redutantes (LAYZELL et al., 1990; HUNT & LAYZELL, 1993).

Em muitos tratamentos nos quais a atividade da N_2 ase foi inibida, a resistência à difusão de gás dentro do nódulo também foi aumentada, sugerindo que tratamentos inibitórios do metabolismo do nódulo e da atividade da N_2 ase atuam aumentando a resistência à difusão de O_2 e por conseguinte decrescendo a disponibilidade de O_2 dentro da célula (LAYZELL et al., 1990).

A Lb facilita a difusão de O_2 dentro das células infectadas (APPLEBY, 1984), por isso, alterações na concentração de Lb ou na afinidade dessa pelo O_2 , causada pelo NO_3^- , pode afetar também o suprimento de O_2 (DENISON & HARTER, 1995). A conversão da Lb para a forma nitrosil, forma não funcional, ocorreu em Lb extraída de nódulos de plantas de soja tratadas com NO_3^- (KANAYAMA et al., 1990), o que sugere que a principal causa do decréscimo na fixação de N_2 foi a redução no suprimento de O_2 (DENISON & HARTER, 1995).

Medidas da atividade de redução do C_2H_2 com fluxo contínuo, demonstram que a exposição prolongada do nódulo ao C_2H_2 reduz a atividade da N_2 ase pelo efeito adverso na respiração do nódulo (VANCE & HEICHEL, 1991). Usando esse sistema, a atividade da N_2 ase em nódulos de *Trifolium repens* exposta a ~23 mM de NO_3^- por até 8 dias, decresceu e foi acompanhada pelo aumento na resistência total à difusão de O_2 nos nódulos (MINCHIN et al., 1986). Assim, o efeito adverso do NO_3^- pode ser mediado por um decréscimo na disponibilidade de O_2 para a região do nódulo fixando N_2 (MINCHIN et al., 1986). Evidências adicionais para essa hipótese são das observações de que o aumento da pO_2

aliviou parcialmente ou totalmente a inibição da N_2 ase por tratamentos de estresse (HUNT & LAZZELL, 1993).

SPRENT et al. (1987), obtiveram novos suportes para essa visão analisando concentração de NO_3^- em córtex e tecidos infectados do nódulo após curta exposição (1-3 dias) ao NO_3^- (10 mM), e concluíram que: a) o NO_3^- passa para o nódulo principalmente através da superfície e não via xilema vindo da raiz; b) NO_3^- não entra na região infectada. Esses resultados são argumentos a favor de um efeito do NO_3^- na região externa do nódulo, a nível de uma hipotética barreira à difusão de O_2 , e discrimina a hipótese de que o NO_2^- gerado pela NR do bacteróide seja o metabólito inibidor da N_2 ase (BECANA & SPRENT, 1987). Entretanto, HUNTER & LAZZELL (1993) sugeriram que o NO_2^- poderia ter sido sequestrado pela Lb formando nitrosil-Lb (LbNO) e que alterações na afinidade da Lb pelo O_2 ou na concentração da Lb funcional poderiam levar a mudanças na permeabilidade do nódulo. Porém, o decréscimo na permeabilidade do nódulo ao O_2 precede qualquer alteração na concentração de Lb (DENISON & HARTER, 1995). Decréscimo na permeabilidade ao O_2 resultando numa redução do O_4 , a qual poderia limitar a fixação do N_2 , foi verificado em nódulos de plantas de *Medicago sativa* e de *Lotus corniculatus* submetidas a 10mM de KNO_3 por 24 horas, porém, não foi verificada variação na Lb funcional (DENISON & HARTER, 1995).

Efeito de NO_3^- relacionado com O_2 em nódulo, tem sido examinado principalmente a partir de perspectivas

quantitativas, enquanto que outros aspectos do O_2 , tais como seu metabolismo e toxicidade, não têm sido, muitas vezes, levados em consideração (ESCUDERO et al., 1996). Nódulos de raízes de leguminosas sofrem risco de danos por oxidação por espécies de oxigênio ativado por causa da abundância de proteínas com oxigênio lábil, Lb e Fe ("Fe catalítico"), potencialmente disponível para catalização de produção de radicais livres (BECANA & KLUCAS, 1992; DALTON, 1995, citado por ESCUDERO et al., 1996).

A maioria do O_2 consumido durante a respiração dos bacteróides e mitocôndrias do nódulo é reduzida a água, mas espécies de O_2 ativado, incluindo O_2^- e H_2O_2 , também são formados como subprodutos (ESCUDERO, et al., 1996). Outras reações gerando O_2 ativado são esperadas ocorrer nos nódulos. A autooxidação de Lb oxidada para Lb férrica produz O_2^- , e esta reação é favorecida pelo pH do nódulo (~6.4) (PLADYS et al., 1988; ESCUDERO et al., 1996). O O_2^- também pode ser formado pela oxidação de proteínas-chave de bacteróides, tais como Fd, Hidrogenase e N_2 ase (DALTON, 1995, citado por ESCUDERO et al., 1996). Esse radical pode dismutar para H_2O_2 , o qual, por sua vez, pode prender-se à Lb liberando Fe livre e produzindo o $\cdot OH$, altamente devastador (PUPPO & HALLIWELL, 1988).

Entretanto os nódulos possuem um aparato de enzimas e pequenas moléculas ("antioxidantes") para desfazer-se dos radicais O_2^- e H_2O_2 (GOGORCENA et al., 1995). Por causa do radical $\cdot OH$ ter vida extremamente curta em células (1 ns), não

existe um mecanismo específico para revolvê-lo (desativá-lo). Sua formação é prevenida minimizando as concentrações de O_2^- , H_2O_2 e Fe catalítico, os quais são requeridos para gerar o radical $\cdot OH$ em sistemas biológicos (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989, citado por ESCUDERO et al., 1996).

1.4. Efeito de outros fatores de estresse na fixação de N_2 :

A fixação de N_2 (atividade da N_2 ase) por nódulos de leguminosas é afetada por várias condições ambientais e fisiológicas como restrição do suprimento da seiva do floema aos nódulos, fertilização com NO_3^- e qualquer tipo de estresse, como por exemplo estresse de água (LAYZELL et al., 1990; HUNT & LAYZELL, 1993).

Usando sistema não invasivo dos nódulos, LAYZELL et al. (1990) demonstraram que a inibição da atividade da N_2 ase em nódulos de soja tratados com NO_3^- ou mantidos no escuro ou com anelamento do caule da planta ou submetidos a distúrbios, é causado pela redução do O_1 e limitação da respiração em suporte à atividade da N_2 ase.

Estudos de PANKHURST & SPRENT (1975A,B) e RALSTON & IMSANDE (1982) sobre morfologia e taxas de difusão de O_2 em nódulos, indicaram que a perda da atividade da N_2 ase em nódulos estressados por água (= seca) ou nódulos destacados, pode ser devida a um aumento na resistência à difusão de O_2 causado possivelmente pelo colapso das lenticelas na superfície dos nódulos. Entretanto, aumento da pO_2 na rizosfera estimulou

muito mais a atividade da N_2 ase de plantas de soja decaptadas do que de plantas estressadas por água, sugerindo que o estresse de água difere de outros tipos de estresse, como da decaptação, e que a causa primária da inibição da fixação de N_2 pelo estresse de água não é a permeabilidade do nódulo ao O_2 (DIAZ DEL CASTILLO et al., 1994). Esses autores sugeriram que o estresse de água leva à diminuição do conteúdo de água do nódulo com consequente aumento da concentração salina citoplasmática, levando à inibição da atividade enzimática. Poderia ocorrer proteólise das enzimas do nódulo causando redução na taxa respiratória do nódulo, com consequente aumento da O_1 . Esse excesso da O_1 é que poderia levar a um decréscimo da permeabilidade do nódulo ao O_2 , como forma reguladora para proteger a N_2 ase da inativação pelo O_2 . Redução da atividade de várias enzimas em nódulos de ervilha estressados por água foi verificado por GOGORCENA et al., (1995), porém, encontraram também redução da Lb e de proteína solúvel total.

Alterações na temperatura circundando o nódulo também resulta em alteração na O_1 e mudança no balanço entre consumo e produção de ATP dentro dos tecidos do nódulo (KUZMA et al., 1995), levando a alterações na permeabilidade do nódulo como forma de controle da demanda respiratória e da concentração de O_2 nas células infectadas (KUZMA & LAYZELL, 1994).

A concentração de açúcares solúveis em nódulos estressados por água é semelhante ou até maior que no controle. Isso indica que carboidratos não limitam a atividade da N_2 ase em nódulos

estressados por água, e que a sacarose não atua como regulador osmótico na barreira de difusão de O_2 (HUNT & LAYZELL, 1993). Por outro lado, a prolina, a qual também acumula-se em grande quantidade em nódulos estressados por água (HUNT & LAYZELL, 1993; GIROUSSE et al., 1996; MILLER & WOOD, 1996), ou por sais (MILLER & WOOD, 1996), pode tender a atrair água dos espaços intercelulares e, por esse meio, aumentar a permeabilidade do nódulo (HUNT & LAYZELL, 1993). Entretanto, em razão do nível de aminoácidos livres na célula ser estimado abaixo de 1 mM, e da prolina livre representar somente 12% do total de aminoácidos em bacteróides estressados por sais, a prolina não parece contribuir substancialmente para a pressão osmótica intracelular no bacteróide (MILLER & WOOD, 1996).

A concentração de Lb também declina em nódulos estressados por água, restringindo a facilidade de difusão de O_2 para o bacteróide, podendo ser uma hipótese alternativa para o mecanismo de limitação de O_2 para a N_2 ase nessas condições (HUNT & LAYZELL, 1993). O declínio da Lb pode ser devido ao aumento na atividade de proteases associado com uma destruição geral de proteínas citossólicas (HUNT & LAYZELL, 1993), como proposto por KANAYAMA et al. (1990) para explicar o mecanismo da inibição pelo NO_3^- da atividade do nódulo.

A hidroponia pode ser um sistema estressante em termos de limitação de O_2 para os bacteróides. Assim, avaliando a ARA em plantas de soja em hidroponia variando a pO_2 , DREVON et al. (1988A), demonstraram que em ar contendo apenas 21% de O_2 a

fixação de N_2 é provavelmente limitada pelo O_2 , principalmente em nódulos jovens. HUNT et al. (1989), já haviam verificado aumento da ARA com aumento da pO_2 , sugerindo que sob condições ambientes a atividade da N_2 ase de nódulos de soja é limitada pelo O_2 .

A forte correlação entre a atividade total da N_2 ase e a O_2 suporta a hipótese de que a inibição da atividade da N_2 ase em nódulos de soja sob condições adversas, é causada pela redução da O_2 e consequente limitação da respiração em suporte à atividade da enzima (LAYZELL et al., 1990). Na ausência de O_2 a glicólise na raiz pode ser acelerada pelo efeito Pasteur, levando a um decréscimo no conteúdo de glicose-6-fosfato (G6P) (SARKISSIAN & FOWLER, 1978). A G6P é o substrato da via oxidativa pentose fosfato, a qual é suposta ser a fonte de poder redutor para a redução de NO_2^- em plastídeos de raiz (DRY et al., 1981; OJI et al., 1985). De acordo com DRY et al., (1981), o decréscimo da redução de NO_2^- sob hipoxia pode ser devido a uma diminuição no suprimento de G6P para os plastídeos. Essa hipótese poderia ser aplicada aos nódulos (DREVON et al., 1988A), pois, nesses naturalmente ocorre hipoxia parcial, visto que o processo da fermentação pode ser detectado mesmo em presença de O_2 no ambiente externo (TAJIMA & LARUE, 1982; HECKMANN & DREVON, 1987).

1.5. Solutos nitrogenados no xilema de plantas fixando N₂:

Baseado na composição da seiva do xilema, as plantas fixando N₂ podem ser classificadas em exportadoras de amida (asparagina, glutamina e 4-metilenoglutamina) ou exportadoras de ureídeos (alantoína, ácido alantóico e citrulina) (SCHUBERT, 1986). Espécies tropicais, como a soja, fixando N₂ têm como principal constituinte exportado no xilema os ureídeos ácido alantóico e alantoína (STREETER, 1972, 1979; McCLURE & ISRAEL, 1979; PATE et al., 1979; PATE, 1980; RAINBIRD et al., 1983), seguido da amida asparagina (STREETER, 1979). Os ureídeos podem chegar a 90% do total do N transportado no xilema em soja (McCLURE & ISRAEL, 1979; STREETER, 1979; SCHUBERT, 1986). A presença de N inorgânico no solo decresce a proporção relativa de N orgânico na seiva do xilema, ocorrendo mudança do transporte de ureídeos para amidas (MATSUMOTO et al., 1977; PATE et al., 1979, 1980; PATERSON & LARUE, 1983; McNEIL & LARUE, 1984). Dessa forma, a dosagem dos produtos nitrogenados transportados no xilema é maneira eficaz de avaliar a extensão da atividade de fixação de N₂ em plantas transportadoras de ureídeos (McCLURE & ISRAEL, 1979; McCLURE et al., 1980; PATE, 1980; PATE et al., 1980; HERRIDGE, 1982; RAINBIRD et al., 1983; HERRIDGE & PEOPLES, 1990).

2.OBJETIVOS

Esta tese, além de investigar alguns aspectos gerais da inibição da nodulação e da fixação de N_2 pelo NO_3^- em soja, teve como objetivos específicos:

a) verificar o envolvimento de etileno na inibição da nodulação e da fixação de N_2 pelo NO_3^- ;

b) verificar o envolvimento de uma possível limitação de O_2 na inibição da fixação de N_2 pelo NO_3^- .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal e Condições de Crescimento:

Os experimentos foram realizados com plantas de soja (*Glycine max* Merrill, cv Santa Rosa), obtidas de sementes fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas - IAC - SP.

Em experimentos nos quais foi verificado o processo da nodulação das plantas em hidroponia, as plântulas foram obtidas colocando-se as sementes, previamente desinfestadas, para germinar em rolos de papel de germinação, em câmaras de crescimento, sob luz contínua e temperatura constante de 28°C. Plântulas com cinco a seis dias da semeadura, com cotilédones abertos - estágio Vo - (FEHR et al., 1971), após inoculadas, foram transferidas para vasos plásticos de 3L contendo a solução nutritiva-tratamento, em casa de vegetação, permanecendo sob condições naturais de luz, temperatura e umidade até a frutificação - estágio R4 - (plantas com vagem de 2cm num dos quatro nós mais altos com "folhas abertas"), quando foram realizadas as coletas.

Nos experimentos de nodulação em vermiculita, sementes previamente desinfestadas foram colocadas para germinar, em casa de vegetação, em vasos plásticos de 3L contendo vermiculita exaustivamente lavada em água corrente. Após a emergência, as plântulas foram selecionadas, conduzindo-se três plantas/vaso. No período de outono/inverno, plântulas obtidas por esse método foram mantidas nos dez primeiros dias sob

fotoperíodo longo (18 horas luz/6 horas escuro), posteriormente transferidas para as bancadas e mantidas sob condições naturais de luz, temperatura e umidade até a frutificação, quando foram realizadas as coletas.

A desinfestação das sementes consistiu da imersão em etanol 70% por 10 minutos, seguido da imersão em H_2O_2 a 3% (v/v) por 5 minutos, e da lavagem em H_2O destilada por pelo menos dez vezes a intervalos de 1 minuto, imediatamente antes da semeadura. No sistema de obtenção de plantas em rolo de papel, o papel de germinação, após autoclavado a $121^{\circ}C/20'$, foi embebido em solução de micostatin a 100 $\mu g/mL$, no ato da semeadura.

3.2. Inóculo: Origem, Manutenção, Multiplicação e Inoculação das Plantas:

Foi utilizado inóculo de *Bradyrhizobium japonicum*, estirpe SMS 463 (=SEMIA 5019 =W29 =USDA 76), recentemente enquadrada como *Bradyrhizobium elkanii* (BODDEY & HUNGRIA, 1994; HUNGRIA et al., 1994), fornecido originalmente pelo Instituto Agronômico de Campinas-IAC - SP.

A manutenção (meio inclinado) e a multiplicação (meio líquido), foi realizada em meio de cultura de NORRIS & DATE (1976), pH 6,8-7,0, formulada com os seguintes sais e respectivas concentrações: K_2HPO_4 (0,5 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,8 g/L), NaCl (0,1 g/L), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,01 g/L), extrato de levedura (0,8 g/L), manitol (10,0 g/L) + 5 mL/L de azul de bromotimol a

0,5% (p/v) em etanol. O meio inclinado (sólido) foi obtido adicionando-se 15 g/L de agar ao meio líquido.

Após autoclavados (121°C/20 min.) e resfriados, os meios foram inoculados em câmara de fluxo laminar e incubados a 28/30°C. Após o crescimento das bactérias foi adicionada vaselina líquida (Labsynth), previamente autoclavada, cobrindo todo o meio de cultura sólido, e os tubos de ensaio armazenados a temperatura de 4-6°C. O meio líquido, após inoculado, foi incubado sob agitação, por um período de 5-6 dias quando a suspensão de bactérias atingiu cerca de 10^9 células viáveis/mL (=UFC - Unidades Formadoras de Colônias), estando pronto para ser utilizado para a inoculação.

A inoculação foi realizada procedendo-se da seguinte maneira: nos experimentos com nodulação em hidroponia, plântulas no estágio Vo, obtidas por meio da germinação em rolos de papel, tiveram o sistema radicular imerso na suspensão de bactérias durante cerca de 5 minutos antes da transferência para os vasos com a solução nutritiva. As plântulas foram fixadas à tampa de isopor, pela região do coleto, tendo todo o sistema radicular imerso na solução nutritiva. Foram realizadas mais duas inoculações de reforço a intervalos de dois dias, colocando-se, no vaso, 2 mL de inóculo/planta/vez.

Nos experimentos em que a nodulação foi obtida em vasos contendo vermiculita como substrato, as inoculações, em número de três, foram realizadas a intervalos de dois dias colocando-se 2 mL de inóculo/planta/vez, ao redor do caule, à partir do

estádio Vo. Após cada distribuição do inóculo, foi aplicado na superfície superior do vaso, 50 mL/vaso de H₂O destilada visando a distribuição do inóculo ao longo do perfil do substrato.

3.3. Soluções:

3.3.1. Solução Nutritiva:

Foram preparadas duas soluções-estoque, 10 vezes concentradas, baseadas na solução de HOAGLAND & ARNON (1950), uma formulada a 150 mM de N-NO₃⁻ e outra desprovida de N, respectivamente solução +N e solução -N. Pela mistura, em proporções adequadas, das duas soluções obtinha-se a solução-tratamento com a concentração desejada de N-NO₃⁻.

As soluções-estoque, 10 vezes concentradas, foram formuladas com os seguintes sais e respectivas concentrações:

a) solução +N: Ca(NO₃)₂.4H₂O (50 mM), KNO₃ (50 mM), MgSO₄.7H₂O (20 mM), KH₂PO₄ (10 mM), H₃BO₃ (28,6 mg/L), MnCl₂.4H₂O (18,1 mg/L), ZnSO₄.7H₂O (2,2 mg/L), CuSO₄.5H₂O (0,8 mg/L), H₂MoO₄ (0,9 mg/L).

b) solução -N: MgSO₄.7H₂O (20 mM), KH₂PO₄ (10 mM), CaCl₂.2H₂O (50 mM), KCl (50 mM) + micronutrientes conforme solução +N.

As duas soluções foram preparadas com macro + micronutrientes, exceto o Fe. Em separado foi preparada solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo Na₂-EDTA (33,2 g/L), FeSO₄.7H₂O (25 g/L) e NaOH (3,65 g/L). Dessa solução de Fe-EDTA, foi usado 1 mL/L de solução nutritiva, adicionado à solução no momento de usá-la.

Nos experimentos de hidroponia, foram colocadas três plantas/vaso. Um tubo plástico flexível introduzido na solução, ligado à tubulação de um compressor de ar por uma agulha de seringa hipodérmica, proporcionou uniformidade na aeração da solução entre os vasos durante todo o período.

A drenagem dos vasos foi realizada através de uma mangueira plástica acoplada em orifício perfurado no fundo dos vasos, o que permitiu as trocas de solução nutritiva sem movimentar o sistema radicular das plantas.

A primeira troca de solução nutritiva foi realizada após uma semana da transferência das plântulas para os vasos. As demais trocas foram realizadas duas vezes/semana. O volume inicial da solução no vaso foi restabelecido diariamente adicionando-se H_2O destilada. O pH da solução também foi monitorado diariamente com pHmetro portátil, e ajustado para valores de $6,0 \pm 0,2$ com H_2SO_4 1N.

Nos vasos-tratamento com solução nutritiva -N, foi mantida, até a nodulação, a concentração de $75 \mu M$ de NO_3^- , colocando-se dia sim dia não, 5 mL de solução a $15 mM$ de NO_3^-/L da solução nutritiva.

Para todos os tratamentos em hidroponia, até a nodulação, foi adicionado em cada troca da solução nutritiva 1 mL/L de uma solução de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ a $4,034 mg/L$ para fornecer $1 \mu g/L$ de Co, de acordo com AHMED & EVANS (1960).

Experimentos de nodulação em vasos com vermiculita não receberam Co nem solução contendo NO_3^- (tratamentos -N) na fase

inicial de crescimento. Durante o cultivo, foram aplicados duas vezes por semana 250 mL/vaso de solução nutritiva-tratamento; com o crescimento das plantas, passou-se a aplicar 400 mL/vaso, com a mesma frequência. Irrigações, quando necessárias, foram realizadas com água de torneira, colocando-se água apenas no prato plástico na parte basal dos vasos.

3.3.2. Soluções de Co, AVG e AIA:

Para essas substâncias, foram preparadas soluções-estoque individuais para cada tratamento, de forma a ser colocado 1mL da solução-estoque/L de solução nutritiva. Após preparadas, foram mantidas em geladeira até a utilização.

O preparo da solução de AIA envolveu a adição de algumas gotas de NaOH 2N até a dissolução, complementação do volume, ajuste do pH para 6,0 e armazenamento em geladeira ao abrigo da luz.

3.4. Variação Diurna na Composição dos Exsudatos do Xilema:

Plantas foram inoculadas e cultivadas em vermiculita, supridas com solução nutritiva -N, em casa de vegetação, durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4), quando procedeu-se a coleta.

A intervalos de duas horas foram coletados os exsudatos do xilema de 18 plantas (6 vasos com 3 plantas cada) durante o período de uma hora. Foram seis coletas (horas), sendo a primeira coleta das 8:00 às 9:00 e a última das 18:00 às 19:00.

No dia da coleta, o nascimento do sol se deu às 6:27 e o ocaso às 19:18, com dia claro, sem nuvens, alta irradiância, com temperatura variando de 21 a 41°C (mínima/máxima).

3.5. Nodulação e Crescimento de Plantas:

Foram conduzidos, em casa de vegetação, um experimento em vermiculita e três em hidroponia. As plântulas foram inoculadas no estágio Vo e conduzidas durante todo o período com soluções-tratamento até a coleta (estádio R4). Para as plantas do tratamento "-N" e sem inoculação, em hidroponia, foi mantido a concentração de 75 μM de N-NO_3^- na solução nutritiva durante todo o ciclo.

Nesses experimentos, foram avaliados o número de nódulos/planta e as produções de massa fresca e seca de nódulos e de plantas.

3.6. Nodulação, Crescimento de Plantas e Fixação de N_2 :

Foram conduzidos, em casa de vegetação, três experimentos em hidroponia. As plântulas foram inoculadas no estágio Vo e conduzidas durante todo o período nas soluções-tratamento, até a coleta (estádio R4). Além do número de nódulos/planta e crescimento de plantas, foi avaliada, indiretamente, a atividade de fixação de N_2 pelos nódulos através das análises bioquímicas dos exsudatos do xilema das plantas.

3.7. Fixação de N_2 por Nódulos de Plantas Adultas:

Foram conduzidos, em casa de vegetação, um experimento em vermiculita e três em hidroponia. As plântulas foram inoculadas no estágio Vo e conduzidas com solução nutritiva -N, em hidroponia ou em vermiculita, até a frutificação - estágio R3 - (vagem de 0,5cm num dos quatro nós mais altos com folhas "abertas") quando passaram a receber as soluções-tratamento, pelo período de sete dias, até a coleta (estádio R4), mantendo-se plantas -N (controle).

Verificou-se, além da produção de massa de planta e de nódulos, o efeito dos tratamentos na atividade fixadora de N_2 do nódulo, através das análises bioquímicas dos exudatos do xilema das plantas.

3.8. Transferência de Plantas Adultas e Noduladas para Hidroponia:

Foram realizados cinco experimentos em casa de vegetação. As plântulas foram inoculadas (estádio Vo) e cultivadas em vermiculita até a frutificação (estádio R3), recebendo apenas solução -N. Nesse estágio, as plantas tiveram o sistema radicular lavado cuidadosamente, para a retirada da vermiculita, sem provocar queda dos nódulos, e transferidas para vasos contendo solução nutritiva -N ou com 5 mM de $N-NO_3^-$. As plantas foram mantidas por períodos de tempo variáveis sob aeração com ar comprimido ou anoxia ou borbulhamento com N_2 e/ou sendo transferidas novamente para a vermiculita. Algumas

plantas permaneceram em vermiculita e passaram a receber solução nutritiva-tratamento da seguinte forma: no dia de início dos tratamentos foi colocado 1 L/vaso da solução nutritiva-tratamento; nos dias subsequentes foram colocados, diariamente, 500 mL/vaso.

Além da atividade fixadora de N_2 dos nódulos (medida indiretamente, através das análises bioquímicas dos exsudatos do xilema das plantas), verificou-se, em alguns dos experimentos, a atividade de asparaginase e os teores de Lb e de proteína total dos nódulos.

3.9. Características Avaliadas:

Procedeu-se a contagem do número de nódulos/planta e pesagem das massas fresca e seca dos nódulos, da parte aérea e do sistema radicular das plantas. Nos exsudatos do xilema procedeu-se a análise de ureídeos totais, $N-NO_3^-$, aminoácidos livres totais e composição dos aminoácidos por HPLC. Em alguns dos experimentos de transferência de plantas adultas noduladas para hidroponia, foram ainda determinadas, nos nódulos, a atividade de asparaginase e as concentrações de Lb e de proteína solúvel total.

3.10. Coleta de Exsudatos do Xilema:

A coleta de exsudatos do xilema foi realizada em plantas no estágio R4, conforme McCLURE & ISRAEL (1979). Os caules das plantas foram seccionados com uma lâmina de barbear na região

do nó cotiledonar, a superfície do corte lavada com H_2O destilada e enxugada com papel de filtro. A gota que se formava, pela exsudação do xilema na superfície do caule cortado, era coletada com pipeta Pasteur e imediatamente transferida para tubos Eppendorf mantidos em banho de gelo ($\pm 0^\circ C$). Após a coleta, os Eppendorfs contendo os exsudatos, foram armazenados em freezer a $-18^\circ C$ para análises bioquímicas posteriores.

Exceto para o experimento de variação diurna na composição de exsudatos do xilema, a coleta de exsudatos foi realizada no período entre 10:00 e 12:00, procurando coletar pelo menos 100 μL por repetição de cada tratamento. Plantas mantidas em vermiculita receberam, na véspera e horas antes da coleta dos exsudatos, solução nutritiva-tratamento de forma a terem o substrato saturado favorecendo a exsudação.

3.11. Coleta de Nódulos:

Após destacados do sistema radicular das plantas, os nódulos foram lavados em água corrente para a retirada da vermiculita e/ou sais aderidos à superfície. Em seguida foram colocados a $4^\circ C$, transferidos para laboratório onde foram lavados por várias vezes em H_2O destilada gelada, enxugados com papel de filtro, pesados, acondicionados em frascos de vidro e congelados em freezer a $-18^\circ C$ por até uma semana, procedendo-se às dosagens nesse período.

3.12. Análises Bioquímicas de Exsudatos do Xilema:

3.12.1. Dosagem de Ureídeos Totais:

A determinação de ureídeos totais nos exsudatos do xilema (alantoína + ácido alantóico) seguiu a metodologia de VOGELS & VAN DER DRIFT (1970), usando alíquotas de 5 a 25 μL de exsudato e alantoína como padrão. As leituras de absorbâncias a 535nm foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B280, sendo realizados pelo menos três repetições para cada amostra de exsudato coletada.

3.12.2. Dosagem de Aminoácidos Livres Totais:

A determinação de aminoácidos livres totais, seguiu o método da ninhidrina de YEMM & COCKING (1955), usando alíquota de 20 μL de exsudato e leucina como padrão. As leituras de absorbâncias a 570nm foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B280, sendo realizadas pelo menos três repetições para cada amostra de exsudato coletada.

3.12.3. Dosagem de Aminoácidos Livres por HPLC:

A separação de aminoácidos livres por HPLC foi realizada em coluna de fase reversa, após derivação com o-phthaldialdeído-OPA (BENSON & HARE, 1975; JARRET *et al.*, 1986). Uma alíquota de 20 μL , de uma amostra composta pelas repetições dos tratamentos diluída em H_2O MILLI Q à concentração de 1 μmol de aminoácidos totais/mL, foi adicionada a 60 μL do reagente OPA. Após exatos 2 minutos, 10 μL da mistura foram injetados no HPLC.

O cromatógrafo consistia de 2 bombas LKB mod. 2150, controladas por um gerador de gradientes LKB mod. 2152. Foi empregada uma coluna C18 Supercap ODS-2, sendo os aminoácidos detectados por um monitor de fluorescência Shimadzu modelo RF-530, com λ de excitação de 250nm e λ de emissão de 480nm. O registro foi feito por um registrador/integrador LKB modelo 2221.

Os solventes utilizados para formação do gradiente foram: "tampão A" = tampão fosfato ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) pH 7,25 a 50 mM + 20 mL/L de tetrahidrofurano + 20 mL/L de metanol; "tampão B" = metanol 65% em H_2O MILLI Q. O gradiente foi de: 20 a 60% de B entre 0 a 25 min.; 60 a 75% de B entre 25 e 31 min.; 75 a 100% de B entre 31 e 50 min. O fluxo foi de 0,8 mL/minuto. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma-18, com 15 aminoácidos protéicos, e outro padrão formulado com os aminoácidos asparagina, glutamina, serina e alanina, todos à concentração de 250 nmol/mL.

3.12.4. Dosagem de N-NO_3^- :

A determinação de N-NO_3^- seguiu a metodologia de CATALDO et al. (1975), usando uma alíquota de 20 μL de exsudato e KNO_3 como padrão. As leituras de absorbâncias a 410nm foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B280, sendo realizadas pelo menos três repetições para cada amostra de exsudato coletada.

3.13. Análises Bioquímicas de Nódulos:

3.13.1. Dosagem de Lb e de Proteína Total dos Nódulos:

A determinação de Lb dos nódulos seguiu a metodologia descrita por BECANA *et al.* (1986), com algumas modificações. Em almofariz foram macerados 0,5 g de nódulos com 6 mL de solução de Drabkin's (52 mg de KCN, 198 mg de $K_3Fe(CN)_6$ e 1 g de $(NaHCO_3)_2$ em 1000 mL de H_2O destilada). O macerado foi filtrado em gaze e centrifugado a 20.000 xg/20 min. Todas as operações foram realizadas a 4°C. No sobrenadante foram feitas as leituras das absorbâncias em 560, 540 e 520nm, em espectrofotômetro Micronal modelo B390, tendo como branco a solução de Drabkin's. Os valores obtidos foram aplicados na fórmula $A_{540} - 1/2 (A_{520} + A_{560})$. A concentração de Lb na fração solúvel foi determinada à partir de uma curva-padrão preparada com solução contendo 10 mg hemoglobina bovina e 50 mg de BSA em 100 mL de solução de Drabkin's. A concentração de proteína total também foi determinada no sobrenadante, pelo método "dye-binding" de BRADFORD (1976), usando como padrão BSA dissolvido em solução de Drabkin's. A leitura da absorbância a 595nm foi feita em espectrofotômetro Micronal modelo B290 contra um branco preparado com solução de Drabkin's.

Para as dosagens acima, pegou-se em cada extração, 0,5 g de nódulos de cada repetição (vaso com três plantas cada).



3.13.2. Dosagem da Atividade de Asparaginase e do Teor de Proteína Total dos Nódulos:

A atividade de asparaginase (E.C.3.5.1.1) foi medida em extratos solúveis de nódulos usando o método fenol-hipoclorito (HARPER, 1985), que determina a quantidade amônia formada. A concentração de proteína total, nesses extratos, foi determinada pelo método de BRADFORD (1976).

Em almofariz foram macerados 1 g de nódulos com 5 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 50 mM; DTT 1 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,16 mM e Glicerol 10%), filtrados em gaze e centrifugados a 20.000 xg/15 min. Do sobrenadante, 1 ml foi passado em coluna Sephadex G-25 (médio), sendo as proteínas eluídas com o mesmo tampão de extração. O eluído foi usado para o ensaio de asparaginase e para dosagem de proteína total (BRADFORD, 1976). O ensaio de difusão da NH_3 para dosagem de asparaginase seguiu a metodologia descrita por SODEK & LEA (1993), fazendo a leitura da absorbância a 630nm em espectrofotômetro Micronal modelo B390 do extrato incubado por uma hora e do extrato tempo zero, contra um branco preparado sem extrato, usando como padrão solução de NH_4^+ a 1 $\mu\text{mol/mL}$. Todas as etapas, da extração até a montagem dos ensaios, foram realizadas à temperatura de 0-4°C.

Para as extrações acima, pegou-se 1,0 g de nódulos frescos de cada repetição (vaso com três plantas) formando uma amostra composta para cada tratamento.

3.14. Análise Estatística:

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, usando delineamento de blocos ao acaso, com pelo menos três repetições (vaso com três plantas) para cada tratamento. Procedeu-se a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).

4. RESULTADOS

4.1. VARIAÇÃO DIURNA NA COMPOSIÇÃO DE EXSUDATOS DO XILEMA:

Com objetivo de obter subsídios para os futuros experimentos de coleta de exsudatos, auxiliando na determinação do melhor horário de fazê-lo, foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em vasos com vermiculita até a frutificação (estádio R4), no qual avaliou-se a variação na composição dos solutos nitrogenados dos exsudatos do xilema em coletas realizadas ao longo do dia.

As plantas utilizadas apresentaram-se bastante uniformes quanto ao crescimento (massa de parte aérea e de sistema radicular) e nodulação (número e massa seca de nódulos/planta e massa específica de nódulo), (tabela 1), não se constituindo, dessa maneira, em fator de interferência para as características avaliadas.

A variação diurna dos teores de aminoácidos livres totais e de ureídeos totais nos exsudatos do xilema, bem como a eficiência nodular (capacidade do nódulo em sintetizar ureídeos em relação à massa seca do próprio nódulo), estão apresentados na figura 1. O teor de aminoácidos livres totais apresentou elevação brusca entre 8:00 e 10:00, com pico às 10:00, seguido de decréscimo gradativo ao longo do dia. Os ureídeos totais apresentaram comportamento inverso ao dos aminoácidos, porém, não apresentando diferenças significativas entre as horas de coleta, o mesmo acontecendo com a eficiência nodular.

A variação diurna da composição de aminoácidos livres (mol%) nos exsudatos do xilema separados por HPLC, estão apresentadas na tabela 2. Como vários aminoácidos apresentaram valores inferiores a 1%, esses não foram considerados no cálculo total. Em razão da não utilização de um padrão com ácido γ -aminobutírico (GABA), e do surgimento de um pico que se caracterizava com GABA, baseado no tempo de retenção e em outros trabalhos da mesma natureza, optamos caracterizá-lo como GABA(?).

Asparagina, seguida de glutamina e de ácido aspártico, são os três aminoácidos que predominam em todas as horas de coleta. Nas coletas de 10:00 e de 12:00 ocorreu uma maior amplitude na distribuição entre os aminoácidos, coincidentemente com diminuição de ácido aspártico. Chama a atenção a presença de GABA(?) nas três primeiras horas de coleta, especialmente pela elevada participação na coleta de 8:00.

Em razão de um maior equilíbrio das formas de N (ureídeos totais e aminoácidos livres totais) encontradas nos exsudatos do xilema no intervalo entre 10:00 e 12:00, e principalmente pela maior taxa no fluxo de exsudatos observada nesse horário, optamos por realizar as coletas de exsudatos dos experimentos futuros entre 10:00 e 12:00.

Tabela 1. Valores de massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de plantas, massa seca de nódulos (MSN), nódulos por planta (Número/Planta) e massa específica de nódulo (MEN), apresentado por plantas de soja na frutificação (estádio R4). As plantas foram inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 55 dias recebendo solução nutritiva -N. Foram coletados exsudatos do xilema das plantas a intervalos de 2 horas, durante 1 hora, para análise da variação diurna da composição bioquímica dos exsudatos.

Hora de Coleta	MSPA g/planta	MSR g/planta	MSN mg/planta	Nódulos Nº/Planta ¹	MEN mgMS/Nódulo
8:00	5,13 ² a	1,36 a	822,92 a	199,1 a	4,25 a
10:00	5,13 a	1,40 a	833,22 a	218,4 a	3,85 a
12:00	5,19 a	1,42 a	878,57 a	223,5 a	4,00 a
14:00	5,22 a	1,42 a	859,03 a	211,5 a	4,12 a
16:00	5,21 a	1,42 a	886,12 a	216,8 a	4,16 a
18:00	5,15 a	1,37 a	838,27 a	197,8 a	4,26 a
sd	0,20	0,18	61,03	33,06	0,70
cv(%)	3,9	13,0	7,2	15,7	17,0

Médias, nas colunas, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Valores originais foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ para a realização da análise estatística. 2-Cada valor representa a média de 6 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

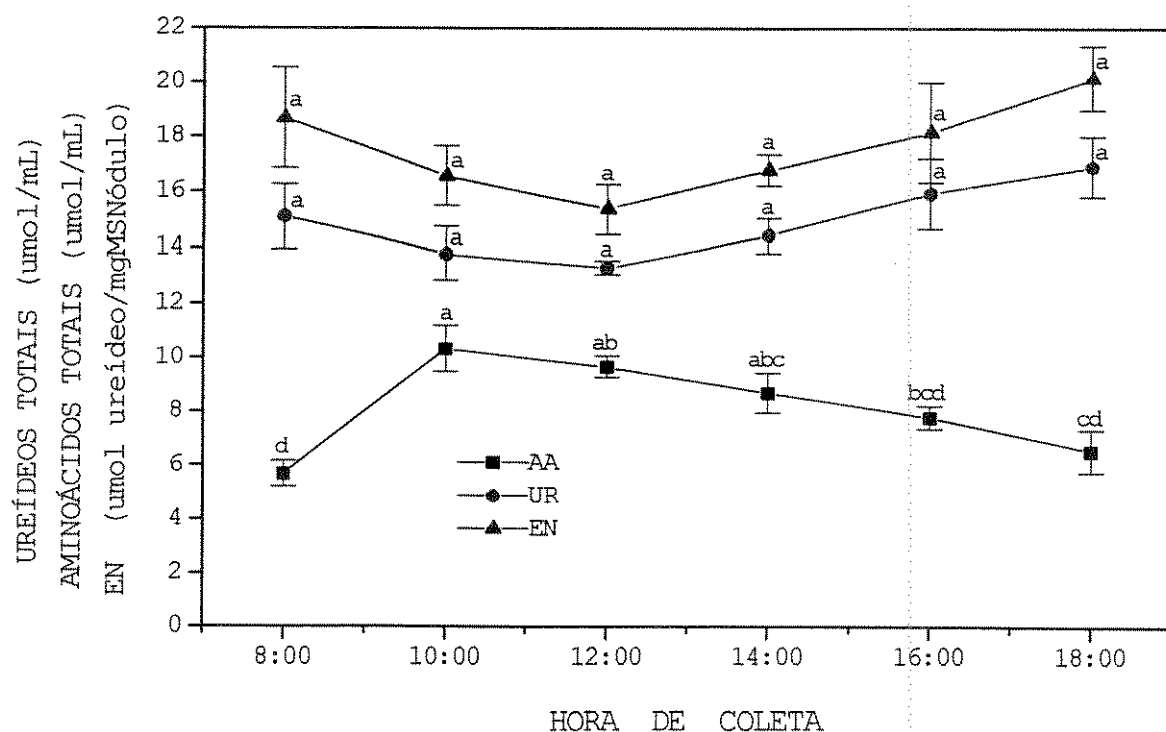


Figura 1. Variação diurna dos teores de aminoácidos livres totais (AA) e de ureídeos totais (UR) nos exsudatos do xilema, e eficiência nodular (EN) de nódulos de plantas de soja inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4), recebendo solução nutritiva -N. Exsudatos foram coletados a intervalos de 2 horas, durante 1 hora cada. Valores são médias \pm SE (n=18 plantas vindas de 6 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Para cada característica, médias assinaladas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Variação diurna da composição de aminoácidos (AA) livres (mol%) nos exsudatos do xilema de plantas de soja inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4), recebendo solução nutritiva -N.

AA	Hora de Coleta					
	8:00	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00
ASN	57,93	54,36	56,38	55,35	55,78	62,31
GLN	18,39	23,56	21,74	20,22	23,93	27,13
ASP	11,59	5,28	6,44	17,04	20,29	10,56
SER	*	6,78	5,12	*	*	*
HIS	*	2,45	4,19	4,56	*	*
THR	*	2,07	2,75	*	*	*
GABA(?)	12,09	3,44	3,38	*	*	*
ARG	*	2,08	*	2,83	*	*

*Aminoácidos presentes nas amostras, porém, apresentando valores (mol%) inferiores a 1%. Presentes em todas as horas de coleta, com valor inferior a 1%, mas não incluídos na tabela: GLU; ALA; TYR; VAL; PHE; ILE; LEU; LYS. Cada tratamento (hora de coleta) proveio de uma amostra composta dos exsudatos do xilema de 18 plantas (6 repetições - vasos - com 3 plantas cada).

4.2. NODULAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLANTAS:

Foram conduzidos quatro experimentos, sendo três em hidroponia e um em vermiculita, com o objetivo de verificar a nodulação e o crescimento de plantas em concentrações de NO_3^- e/ou Co, e de NO_3^- e/ou AIA.

4.2.1. Concentrações de NO_3^- em Hidroponia:

Com objetivo de verificar a capacidade de nodulação em hidroponia, da cv. de soja Santa Rosa pela estirpe de *B. japonicum* SMS 463, assim como a concentração de NO_3^- na solução nutritiva suficiente para inibir a nodulação, foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia até a frutificação (estádio R4).

O crescimento de plantas, inoculadas e não inoculadas, cultivadas em hidroponia em quatro concentrações de NO_3^- , durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4), foi avaliado pelas produções de massa fresca e seca de parte aérea (tabelas 3 e 4) e das raízes (tabelas 5 e 6). A nodulação, avaliada pela contagem do número de nódulos/planta e pela produção de massa fresca e seca de nódulos/planta, é apresentada na tabela 7.

O NO_3^- , tanto em plantas inoculadas quanto em plantas não inoculadas, estimulou o crescimento (produções de massa fresca e seca de parte aérea e de raiz), comparado ao controle -N, porém, este estímulo não foi proporcional à concentração de NO_3^- na solução nutritiva (tabelas 3 a 6). Por outro lado, NO_3^- na

concentração de 3,75 mM na solução nutritiva, foi suficiente para inibir quase que totalmente a nodulação (tabela 7).

Plantas inoculadas em hidroponia -N, apesar de razoavelmente noduladas (tabela 7), não apresentaram um bom crescimento (tabelas 3 a 6), não diferindo inclusive do tratamento -N sem inoculação (no qual foi mantido o mínimo de 75 μM de NO_3^- na solução nutritiva durante todo o período). Plantas -N inoculadas apresentaram, inclusive, menor produção de massa fresca e de massa seca de raiz, que as não inoculadas (tabelas 5 e 6).

Nesse experimento ficou evidenciada a possibilidade de nodulação de plantas de soja cv. Santa Rosa pela estirpe de *B. japonicum* SMS463, em hidroponia, e da inibição da nodulação pelo NO_3^- ocorrer em concentrações não muito elevadas. Por essa razão, nos experimentos de nodulação conduzidos posteriormente, procurou-se trabalhar com concentração de NO_3^- na solução nutritiva de no máximo 5,0 mM.

Tabela 3. Produção de massa fresca (g/planta) de parte aérea de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e não inoculadas e cultivadas em hidroponia, em quatro concentrações de NO_3^- , durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- (mM)	Inoculada	Não Inoculada	sd	cv(%)
0	7,59 ¹ b A	7,35 b A	1,33	17,8
3,50	30,14 a A	27,60 a A	3,52	12,2
7,50	29,60 a A	27,85 a A	5,59	19,5
15,00	29,21 a A	28,76 a A	2,55	8,8
sd	2,70	4,32		
cv(%)	11,2	18,9		
DMS	5,67	9,08		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 4. Produção de massa seca (g/planta) de parte aérea de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e não inoculadas e cultivadas em hidroponia, em quatro concentrações de NO_3^- , durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- (mM)	Inoculada	Não Inoculada	sd	cv (%)
0	1,38 ¹ b A	1,44 b A	0,38	27,3
3,75	6,47 a A	5,33 a A	0,93	15,7
7,50	5,69 a A	5,40 a A	1,09	19,7
15,0	5,85 a A	5,74 a A	0,64	11,0
sd	0,63	0,95		
cv (%)	13,0	21,2		
DMS	1,33	2,00		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 5. Produção de massa fresca (g/planta) do sistema radicular de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e não inoculadas e cultivadas em hidroponia, em quatro concentrações de NO_3^- , durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- (mM)	Inoculada	Não Inoculada	sd	cv (%)	DMS
0	6,28 ¹ b B	8,32 b A	0,78	10,6	1,34
3,75	18,59 a A	18,81 a A	2,57	13,8	
7,50	19,25 a A	18,28 a A	2,01	10,7	
15,00	18,24 a A	19,11 a A	2,61	14,0	
sd	2,40	1,81			
cv (%)	15,4	11,2			
DMS	5,04	3,81			

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 6. Produção de massa seca (g/planta) do sistema radicular de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e não inoculadas e cultivadas em hidroponia em quatro concentrações de NO_3^- , durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- (mM)	Inoculada	Não Inoculada	sd	cv (%)	DMS
0	0,48 ¹ b B	0,73 b A	0,05	8,3	0,09
3,75	1,34 a A	1,21 a A	0,17	13,3	
7,50	1,09 a A	1,06 a A	0,12	11,0	
15,00	1,24 a A	1,34 a A	0,17	12,9	
sd	0,13	0,14			
cv (%)	12,2	13,2			
DMS	0,27	0,30			

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 7. Produção de massa fresca (MF) e seca (MS) de nódulos e número de nódulos/planta em plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em quatro concentrações de NO_3^- , durante 55 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- (mM)	MF Nódulos		MS Nódulos		Nódulo/ planta ¹
	mg/planta	mg/nódulo	mg/planta	mg/nódulo	
0	767,50 ² a	11,47 a	161,00 a	2,47 a	69,0 a
3,75	19,25 b	11,58 a	3,39 b	2,03 a	1,6 b
7,50	-	-	-	-	-
15,00	-	-	-	-	-
sd	72,90	2,99	13,47	0,65	0,82
cv(%)	18,5	25,9	16,4	28,7	16,9
DMS	126,11		23,30		24,8

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Dados originais foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ para realização da análise estatística. 2-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. Análise de variância realizada sem considerar as concentrações de 7,5 e de 15,0 mM de NO_3^- em razão da não ocorrência de nodulação nessas concentrações.

4.2.2. Concentrações de NO_3^- e de Co em Vermiculita:

Foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em vasos com vermiculita até a frutificação (estádio R4), com o objetivo de verificar a concentração de Co tolerada pelas plantas e que fosse, ao mesmo tempo, suficiente para impedir o efeito inibitório de NO_3^- na nodulação.

O crescimento das plantas (avaliado pelas produções de massa seca de parte aérea e de raiz), em três concentrações de NO_3^- e de Co, após 45 dias, é apresentado na tabela 8. A nodulação, avaliada pela contagem do número de nódulos/planta e pela produção de massa fresca e seca de nódulos, está representada na figura 2 e tabela 9, respectivamente.

Diferentemente do observado em hidroponia, (item 4.2.1), o "estímulo" de NO_3^- ao crescimento das plantas em vermiculita não aconteceu, destacando-se apenas a concentração de 5,0 mM associado a 300 $\mu\text{g/L}$ de Co (tabela 8). A excelente nodulação obtida na ausência de NO_3^- (figura 2), suportou o crescimento das plantas contribuindo para esse resultado. Além disso, em vermiculita, o NO_3^- nas concentrações utilizadas inibiu muito pouco a nodulação (figura 2), além de não afetar o crescimento dos nódulos (tabela 9).

O Co, nas concentrações utilizadas, não apresentou efeito sobre o crescimento das plantas (tabela 8), ocorrendo apenas, na concentração de 300 $\mu\text{g/L}$ de Co associada a 5,0 mM de NO_3^- , crescimento pouco acima dos demais. A nodulação na ausência de NO_3^- foi inibida com 900 $\mu\text{g/L}$ de Co, todavia, na presença de

5,0mM de NO_3^- , Co (300 e 900 $\mu\text{g/L}$) preveniu parcialmente (embora não discriminado pelo teste de médias) a nodulação do efeito inibitório de NO_3^- (figura 2). Por outro lado, a produção de massa de nódulos não foi afetada pelo Co (tabela 9).

Tabela 8. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 45 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^-	Co	MSPA	MSR
(mM)	($\mu\text{g/L}$)	g/planta	g/planta
	0	4,74 ¹ c	0,92 b
0	300	5,50 bc	1,04 b
	900	4,46 c	1,01 b
	0	5,58 bc	0,94 b
2,5	300	5,56 bc	0,97 b
	900	5,28 bc	0,94 b
	0	5,90 bc	1,13 b
5,0	300	7,75 a	1,87 a
	900	6,86 ab	1,32 ab
sd		0,68	0,26
cv(%)		11,8	23,1
DMS		1,63	0,63

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

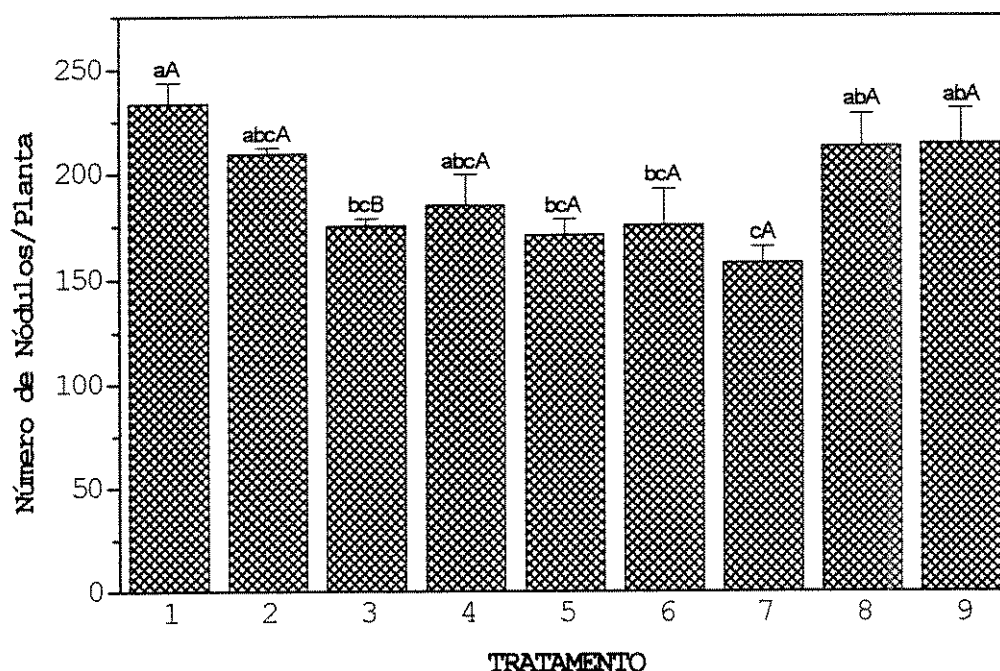


Figura 2. Produção de nódulos por plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 45 dias, até a frutificação (estádio R4). Tratamentos 1, 2 e 3 = 0 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6 = 2,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9 = 5,0 mM de NO_3^- , tendo, dentro de cada concentração de NO_3^- , respectivamente, 0, 300 e 900 $\mu\text{g/L}$ de Co. Barras são médias \pm SE ($n=12$ plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Médias seguidas da mesma letra, minúscula para todos os tratamentos, e maiúscula dentro de cada concentração de NO_3^- , não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados originais foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ para a realização da análise estatística.

Tabela 9. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 45 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- mM	Co $\mu\text{g/L}$	MF Nódulos		MS Nódulos	
		g/planta	mg/nódulo	g/planta	mg/nódulo
	0	2,17 ¹ a	9,21 a	0,50 a	2,12 a
0	300	2,58 a	12,34 a	0,53 a	2,53 a
	900	2,14 a	12,15 a	0,46 a	2,60 a
	0	2,31 a	12,59 a	0,48 a	2,62 a
2,5	300	2,16 a	12,60 a	0,45 a	2,61 a
	900	2,18 a	12,54 a	0,46 a	2,62 a
	0	2,03 a	12,92 a	0,42 a	2,68 a
5,0	300	2,71 a	12,94 a	0,54 a	2,56 a
	900	2,43 a	11,16 a	0,51 a	2,32 a
sd		0,32	1,66	0,06	0,34
cv(%)		13,9	13,8	12,5	13,3

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

4.2.3. Concentrações de NO_3^- e de Co em Hidroponia:

Foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia durante 33 dias, até a frutificação (estádio R4), com o objetivo de verificar a possibilidade da prevenção da nodulação, do efeito inibitório de NO_3^- , por meio da utilização de inibidor da síntese de etileno (Co) na solução nutritiva em hidroponia.

Foram utilizadas três concentrações de NO_3^- e de Co, e o crescimento das plantas avaliado pelas produções de massa fresca e seca de parte aérea e de raiz (tabelas 10 e 11). A nodulação, avaliada pela contagem do número de nódulos/planta e pela produção de massa de nódulos/planta, é apresentada na figura 3 e tabela 12, respectivamente.

No geral, NO_3^- estimulou o crescimento das plantas (tabelas 10 e 11), e inibiu a nodulação (figura 3 e tabela 12), sendo a nodulação inibida completamente à concentração de 5,0 mM de NO_3^- (figura 3).

O Co a 900 $\mu\text{g/L}$, na presença de NO_3^- , inibiu o crescimento das plantas (tabelas 10 e 11). Na ausência de NO_3^- , Co (300 e a 900 $\mu\text{g/L}$) inibiu a nodulação (figura 3) e o crescimento dos nódulos (tabela 12).

Tabela 10. Produção de massa fresca de parte aérea (MFPA) e de raiz (MFR), de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 33 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^-	Co	MFPA	MFR
(mM)	($\mu\text{g/L}$)	g/planta	g/planta
	0	5,27 ¹ fg	2,37 de
0	300	3,87 fg	1,97 de
	900	2,75 g	1,44 e
	0	29,15 bc	6,28 bc
2,5	300	23,22 cd	5,52 cd
	900	10,89 ef	3,34 cde
	0	37,20 a	12,01 a
5,0	300	32,25 ab	9,52 ab
	900	16,13 de	4,91 cde
sd		3,34	1,51
cv(%)		18,7	28,6
DMS		8,04	3,62

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 11. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR), de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 33 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^-	Co	MSPA	MSR
(mM)	($\mu\text{g/L}$)	g/planta	g/planta
	0	0,74 ¹ e	0,22 cd
0	300	0,54 e	0,14 d
	900	0,37 e	0,10 d
	0	4,63 ab	0,71 ab
2,5	300	3,40 bc	0,45 bc
	900	1,49 de	0,24 cd
	0	5,19 a	0,90 a
5,0	300	4,37 ab	0,70 ab
	900	2,23 cd	0,35 cd
sd		0,60	0,12
cv(%)		23,7	27,9
DMS		1,45	0,28

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

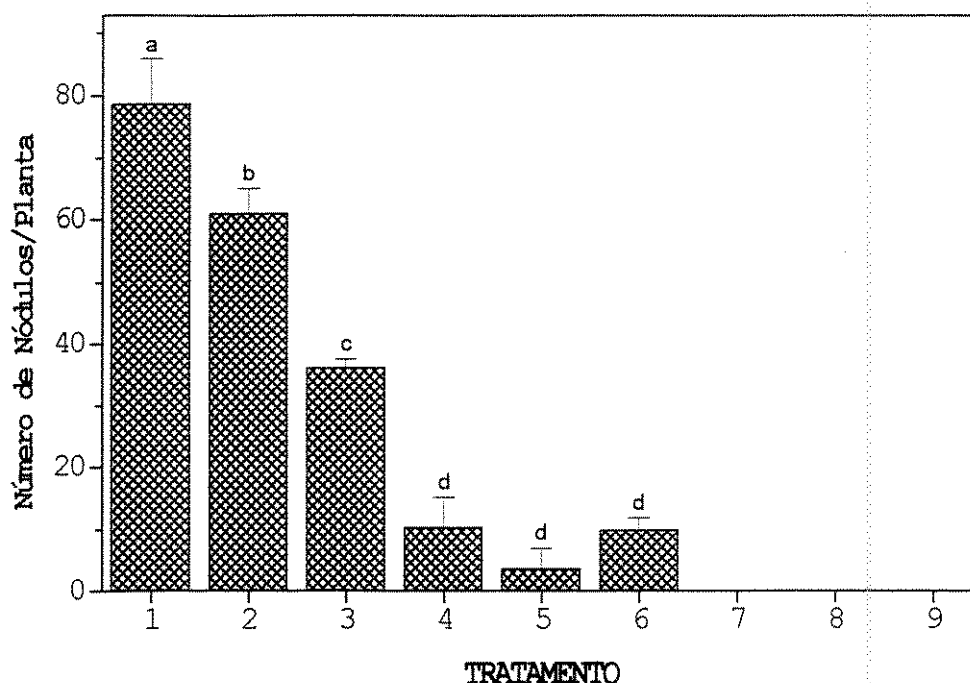


Figura 3. Número de nódulos/planta, em plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 33 dias, até a frutificação (estádio R4). Tratamentos 1, 2 e 3 = 0 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6 = 2,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9 = 5,0 mM de NO_3^- , tendo, dentro de cada concentração de NO_3^- , respectivamente, 0, 300 e 900 $\mu\text{g/L}$ de Co. Barras são médias \pm SE ($n=12$ plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados originais foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ para a realização da análise estatística. Análise estatística realizada sem considerar a concentração de 5 mM de NO_3^- , em razão da não ocorrência de nodulação nessa concentração.

Tabela 12. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 33 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- mM	Co $\mu\text{g/L}$	MF Nódulos		MS Nódulos	
		mg/planta	mg/nódulo	mg/planta	mg/nódulo
0	0	262,50 ¹ a	3,42 a	63,75 a	0,83 a
	300	78,75 b	1,24 bc	25,00 b	0,40 bc
	900	32,50 bc	0,91 c	16,25 bc	0,45 bc
2,5	0	30,00 bc	2,62 ab	5,50 cd	0,48 bc
	300	12,50 c	0,93 c	2,50 d	0,19 c
	900	16,25 c	1,92 bc	6,25 cd	0,71 ab
5,0	0	-	-	-	-
	300	-	-	-	-
	900	-	-	-	-
sd		22,99	0,61	5,11	0,15
cv(%)		31,9	32,9	25,7	22,7
DMS		52,75	1,39	11,72	0,34

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. Análise estatística realizada sem considerar a concentração de 5,0 mM de NO_3^- , em razão da não ocorrência de nodulação nessa concentração.

4.2.4. Concentrações de NO_3^- e de AIA em Hidroponia:

Com o objetivo de verificar a possível participação de auxinas estimulando a nodulação e/ou prevenindo a nodulação do efeito inibitório de NO_3^- , foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia até a floração (estádio R1), sendo submetidas ao AIA na solução nutritiva apenas durante as duas semanas iniciais de cultivo.

O crescimento das plantas, após 30 dias, em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA, foi avaliado pelas produções de massa fresca e seca de parte aérea e de raiz (tabelas 13 e 14). A nodulação, avaliada pelo número de nódulos/planta e pela produção de massa de nódulos, é apresentada na figura 4 e tabela 15, respectivamente.

O NO_3^- estimulou o crescimento das plantas (tabelas 13 e 14). Todavia a nodulação foi inibida pela presença de NO_3^- , ocorrendo inibição total à concentração de 4,0 mM de NO_3^- (figura 4). Apesar de inibir a nodulação, os nódulos formados na presença de NO_3^- , em geral, apresentaram maior massa específica (tabela 15). Esses nódulos, na sua maioria, foram formados na região superior da raiz, na superfície da solução nutritiva.

No geral, AIA à concentração de 1,0 μM , e na presença de NO_3^- , estimulou o crescimento das plantas (parte aérea e raiz), tanto em massa fresca quanto em massa seca (tabelas 13 e 14). Também foi observado maior nodulação à concentração de 1,0 μM de AIA na presença de 2,0 mM de NO_3^- (figura 4), demonstrando

certa prevenção, pelo AIA, do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação.

Tabela 13. Produção de massa fresca (MF) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 30 dias, até a floração (estádio R1), em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA (AIA presente apenas nas duas semanas iniciais).

NO_3^- mM	AIA μM	MF Parte Aérea g/planta	MF Raiz g/planta
0	0,0	6,86 ¹ d	6,18 d
	0,01	6,81 d	5,97 d
	1,0	7,02 d	5,95 d
	100	4,64 d	5,57 d
2,0	0,0	26,33 c	17,28 abc
	0,01	25,48 c	15,64 abc
	1,0	27,13 bc	19,43 a
	100	26,20 c	16,64 abc
4,0	0,0	29,15 bc	13,29 c
	0,01	32,86 ab	15,29 abc
	1,0	37,98 a	18,40 ab
	100	32,34 ab	14,65 bc
sd		2,37	1,67
cv(%)		10,8	13,0
DMS		5,88	4,15

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 14. Produção de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 30 dias, até a floração (estádio R1), em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA (AIA presente apenas nas duas semanas iniciais).

NO_3^-	AIA	MS Parte Aérea	MS Raiz
mM	μM	g/planta	g/planta
0	0,0	0,97 ¹ d	0,33 e
	0,01	0,97 d	0,31 e
	1,0	1,01 d	0,32 e
	100	0,68 d	0,29 e
2,0	0,0	3,98 bc	1,21 abc
	0,01	3,71 c	1,09 abcd
	1,0	3,98 bc	1,31 ab
	100	3,76 bc	1,13 abcd
4,0	0,0	4,13 bc	0,85 d
	0,01	4,74 ab	1,04 bcd
	1,0	5,54 a	1,34 a
	100	4,52 bc	1,00 cd
sd		0,40	0,12
cv(%)		12,7	13,8
DMS		1,00	0,29

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

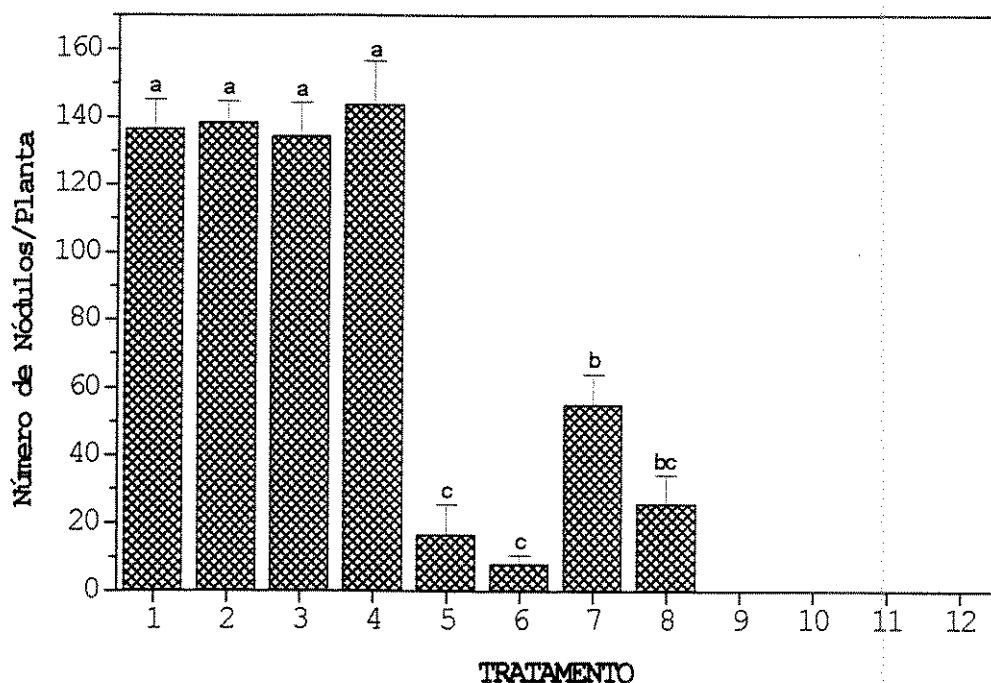


Figura 4. Produção de nódulos por plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 30 dias, até a floração (estádio R1), em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA (AIA presente apenas nas duas semanas iniciais). Tratamentos 1, 2, 3 e 4 = 0 mM de NO_3^- ; 5, 6, 7 e 8 = 2,0 mM de NO_3^- ; 9, 10, 11 e 12 = 4,0 mM de NO_3^- , tendo, dentro de cada concentração de NO_3^- , respectivamente, 0, 0,01, 1,0 e 100 μM de AIA. Barras são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados originais foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ para a realização da análise estatística. Análise estatística realizada considerando-se apenas as concentrações de NO_3^- em que ocorreu nodulação.

Tabela 15. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 30 dias, até a floração (estádio R1), em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA. (AIA presente apenas nas duas semanas iniciais).

NO_3^- mM	AIA μM	MF de Nódulo		MS de Nódulo	
		g/planta	mg/nódulo	mg/planta	mg/nódulo
0	0,0	0,78 ¹ a	5,75 bc	120,70 a	0,88 bc
	0,01	0,70 a	5,02 c	112,50 a	0,81 bc
	1,0	0,75 a	5,77 bc	121,83 a	0,93 abc
	100	0,47 ab	3,17 c	74,34 ab	0,51 c
2,0	0,0	0,19 bc	13,28 a	28,34 bc	1,84 ab
	0,01	0,11 c	12,73 ab	16,00 c	1,72 ab
	1,0	0,76 a	14,42 a	109,17 a	2,01 a
	100	0,32 bc	12,80 ab	48,34 bc	1,99 a
4,0	0,0	-	-	-	-
	0,01	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
sd		0,14	3,08	21,76	0,46
cv(%)		26,8	33,7	27,6	34,4
DMS		0,32	7,30	51,68	1,09

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. Análise estatística realizada apenas para as concentrações de NO_3^- em que ocorreu nodulação.

4.3. NODULAÇÃO, CRESCIMENTO DE PLANTAS E FIXAÇÃO DE N_2 :

Foram conduzidos mais três experimentos em hidroponia, nos quais, além da nodulação e crescimento das plantas submetidas a concentrações de NO_3^- e de inibidores (Co e AVG) ou de indutor (AIA) da síntese de etileno, foi avaliada também, a atividade fixadora de N_2 dos nódulos por meio de análise da composição dos produtos nitrogenados transportados no xilema.

4.3.1. Concentrações de NO_3^- e de Co em Hidroponia:

Foi conduzido um experimento que, em parte, consistiu na repetição do experimento do item 4.2.3, porém, trabalhou-se com concentrações menores de NO_3^- e de Co, em razão de termos verificado, naquele experimento, inibição total da nodulação à concentração de 5,0 mM de NO_3^- e de efeito tóxico, às plantas, do Co na concentração mais elevada.

O crescimento de plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia durante 42 dias, até a frutificação (estádio R4), em três concentrações de NO_3^- e de Co, avaliado pelas produções de massa seca (parte aérea e raiz), é apresentado na tabela 16.

A nodulação, avaliada pela contagem de nódulos/planta e pela produção de massa seca de nódulos/planta, é apresentada, respectivamente, na figura 5 e tabela 17.

A atividade dos nódulos (fixação de N_2) avaliada pelos produtos transportados nos exsudatos do xilema (aminoácidos livres totais, NO_3^- e, principalmente, ureídeos totais) e pela eficiência nodular, é apresentada na figura 6.

O NO_3^- estimulou o crescimento das plantas - (parte aérea e raiz) - (tabela 16). Todavia, quanto à nodulação (número e massa de nódulos), nesse experimento, o efeito inibitório de NO_3^- ocorreu apenas à concentração de 3,0 mM e na ausência de Co. Inclusive, pequeno aumento numérico da nodulação e da massa de nódulos foi observado na concentração de 1,5 mM de NO_3^- (figura 5 e tabela 17).

Apesar de não ter inibido a nodulação nem a massa de nódulos a 1,5 mM (figura 5 e tabela 17), o NO_3^- , nessa concentração, inibiu a atividade fixadora de N_2 dos nódulos, causando diminuição do teor de ureídeos nos exsudatos do xilema (figura 6A). Além disso, o teor de NO_3^- nos exsudatos do xilema relacionou-se diretamente à concentração de NO_3^- na solução nutritiva (figura 6C).

Nas concentrações zero e 300 $\mu\text{g/L}$ de Co, no geral, o teor de aminoácidos livres decresceu com o aumento da concentração de NO_3^- na solução (figura 6B).

O Co a 600 $\mu\text{g/L}$ causou inibição do crescimento das plantas (na presença de NO_3^-) (tabela 16), inibição da nodulação (figura 5) e da massa de nódulos (tabela 17), e redução do teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema (figura 6A). Além disso, nessa concentração, Co causou diminuição no teor de aminoácidos livres totais na ausência de NO_3^- (figura 6B), porém, não alterou o transporte de NO_3^- no xilema (figura 6C).

Tabela 16. Produção de massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR), de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 42 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^-	Co	MSPA	MSR
(mM)	($\mu\text{g/L}$)	g/planta	g/planta
	0	1,37 ¹ d	0,37 e
0	300	1,11 d	0,29 e
	600	0,52 d	0,15 e
	0	8,26 b	2,00 bc
1,5	300	7,78 b	1,83 c
	600	3,73 c	0,74 de
	0	13,41 a	3,36 a
3,0	300	11,82 a	2,61 b
	600	6,88 b	1,38 cd
sd		0,96	0,29
cv (%)		15,7	20,5
DMS		2,30	0,70

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

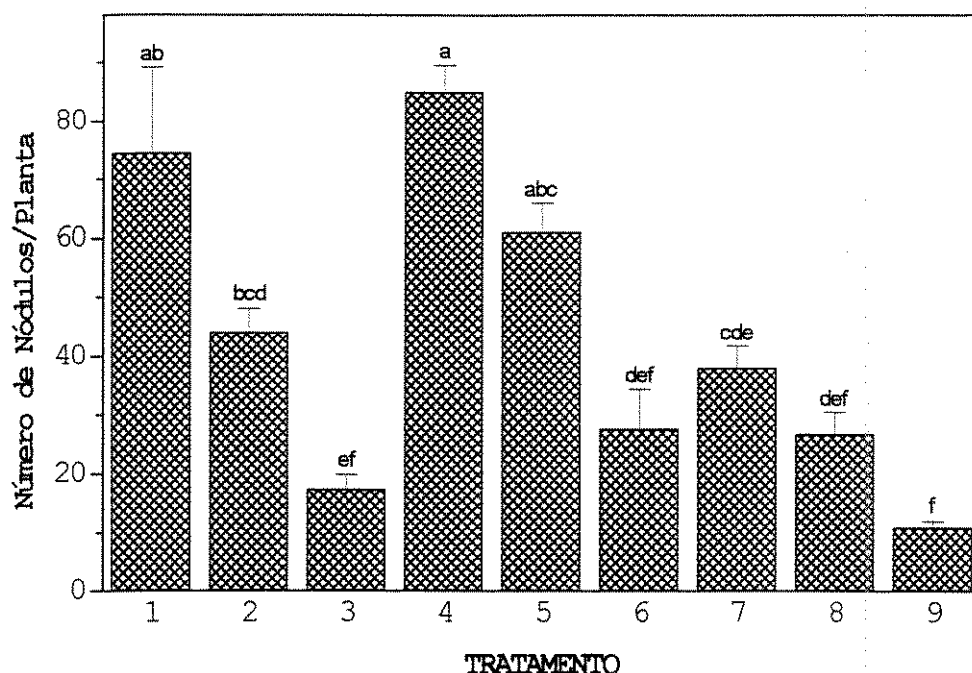


Figura 5. Produção de nódulos/planta em plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 42 dias, até a frutificação (estádio R4). Tratamentos 1, 2 e 3 = 0 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6 = 1,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9 = 3,0 mM de NO_3^- ; tendo dentro de cada nível de NO_3^- , respectivamente, 0, 300 e 600 $\mu\text{g/L}$ de Co. Barras são médias \pm SE ($n=12$ plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Valores originais foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ para realização da análise estatística.

Tabela 17. Produção de massa seca de nódulos (MSN) e de massa específica de nódulo (MEN) de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 42 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^-	Co	MSN	MEN
(mM)	($\mu\text{g/L}$)	mg/planta	mgMS/nódulo
0	0	114,88 ¹ ab	1,534 a
	300	72,25 bcd	1,627 a
	600	19,63 d	1,170 a
1,5	0	136,55 a	1,604 a
	300	96,55 abc	1,594 a
	600	44,88 cd	1,452 a
3,0	0	59,48 bcd	1,610 a
	300	47,48 cd	1,720 a
	600	14,30 d	1,279 a
sd		25,49	0,461
cv(%)		37,9	30,5
DMS		61,30	

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

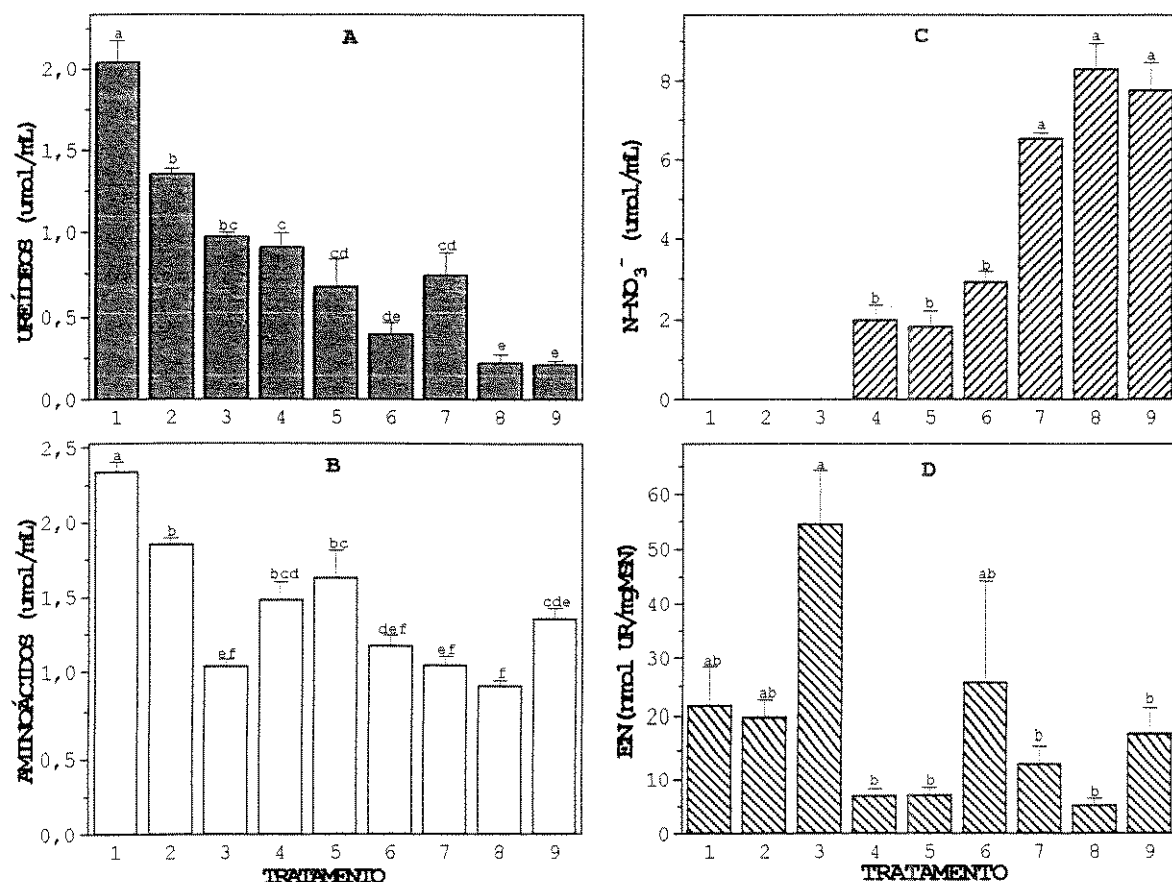


Figura 6. Teores de ureídeos totais (A), aminoácidos livres totais (B) e de NO_3^- (C) nos exsudatos do xilema e eficiência nodular (D) de nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de Co, durante 42 dias, até a frutificação (estádio R4). Tratamentos 1, 2 e 3 = 0 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6 = 1,5 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9 = 3,0 mM de NO_3^- ; tendo dentro de cada nível de NO_3^- , respectivamente, 0, 300 e 600 µg/L de Co. Barras são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)).

4.3.2. Concentrações de NO_3^- e de AVG em Hidroponia:

Foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia por 35 dias, até a frutificação (estádio R4), com o objetivo de verificar a possibilidade da prevenção do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação pela utilização de inibidor específico da síntese de etileno (AVG). Em razão de ter ocorrido nodulação bastante elevada à concentração de 3,0 mM NO_3^- no experimento do item 4.3.1, optamos por aumentar a concentração de NO_3^- para 4,0 mM.

O crescimento das plantas em três concentrações de NO_3^- e de AVG, avaliado pela produção de massa seca de parte aérea e de raiz, é apresentado na tabela 18. A nodulação, avaliada pela contagem de nódulos/planta e pela produção de massa seca de nódulos, é apresentada, respectivamente, na figura 7 e tabela 19. A atividade de nódulo (fixação de N_2) avaliada pelos produtos transportados nos exsudatos do xilema (aminoácidos livres totais, NO_3^- e, principalmente, ureídeos totais) e pela eficiência nodular, é apresentada na figura 8. A composição % de aminoácidos livres presentes nos exsudatos do xilema, separados por HPLC, é apresentada na tabela 20.

O NO_3^- estimulou o crescimento de plantas, tanto de parte aérea quanto de raiz (tabela 18). Por outro lado, o NO_3^- inibiu a nodulação (figura 7), reduziu a massa seca de nódulos (tabela 19) e a atividade fixadora N_2 do nódulo (figura 8A), além de aparecer nos exsudatos do xilema de forma proporcional à concentração na solução nutritiva (figura 8C).

O AVG, na concentração de até 0,1 μM na solução nutritiva, não exerceu nenhum efeito sobre o crescimento das plantas (tabela 18), nem sobre a nodulação (figura 7 e tabela 19); porém, na ausência de NO_3^- , a atividade fixadora do nódulo (teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema) apresentou pequena diminuição com AVG à 0,1 μM (figura 8A). O AVG a 0,1 μM , na ausência de NO_3^- causou diminuição no teor de aminoácidos livres totais, enquanto que na presença de NO_3^- proporcionou aumento desse (figura 8B). Em experimentos preliminares, o AVG a concentração de 1,0 μM na solução nutritiva, causou grande toxicidade às plantas de soja.

Quanto à composição de aminoácidos livres presentes nos exsudatos do xilema (tabela 20), o NO_3^- , principalmente à concentração de 4,0 mM, causou grande aumento de asparagina e diminuição de aspartato. A resposta ao AVG dependeu da presença ou não de NO_3^- ; na ausência de NO_3^- , AVG (0,1 μM) estimulou o aumento de aspartato e diminuiu o de asparagina e de glutamina; com o aumento da concentração de NO_3^- , o AVG não apresentou mais efeito, passando a predominar o efeito de NO_3^- .

Tabela 18. Produção de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de AVG, durante 35 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^-	AVG	MS Parte Aérea	MS Raiz
mM	μM	g/planta	g/planta
0	0	1,14 ¹ b	0,31 c
	0,01	1,21 b	0,34 c
	0,1	1,39 b	0,40 bc
2,0	0	4,46 a	0,98 a
	0,01	4,51 a	1,04 a
	0,1	4,78 a	0,98 a
4,0	0	5,65 a	0,97 a
	0,01	5,47 a	0,93 a
	0,1	5,62 a	0,80 ab
sd		0,53	0,14
cv(%)		14,0	18,5
DMS		1,55	0,40

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

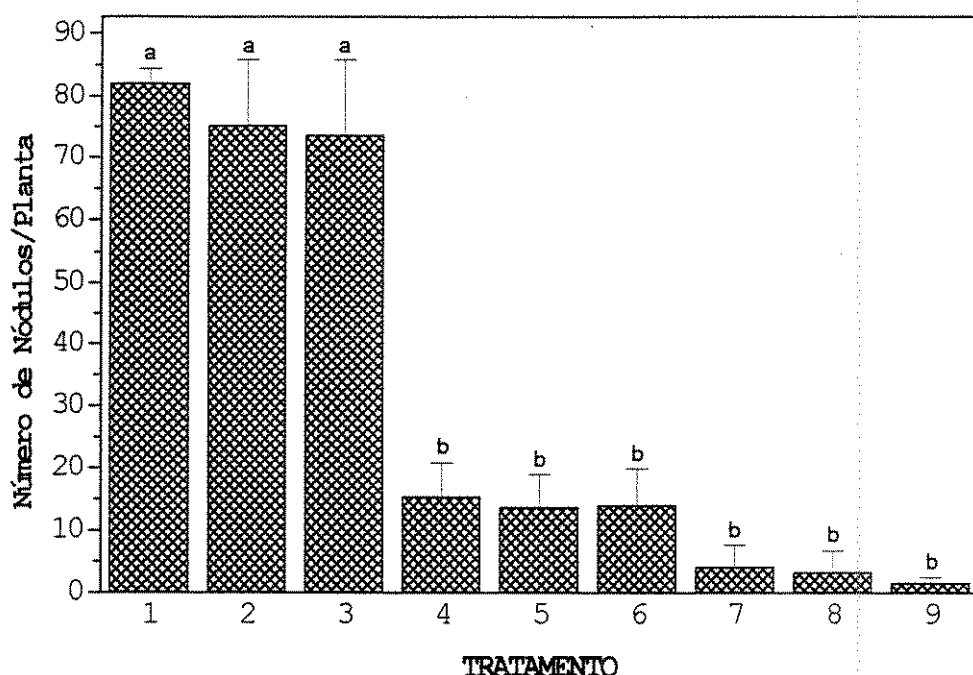


Figura 7. Produção de nódulos por plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de AVG, durante 35 dias, até a frutificação (estádio R4). Tratamentos 1, 2 e 3 = 0 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6 = 2,0 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9 = 4,0 mM de NO_3^- , tendo, respectivamente, dentro de cada concentração de NO_3^- , 0, 0,01 e 0,1 μM de AVG. Barras são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados originais foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ para a realização da análise estatística.

Tabela 19. Produção de massa seca (MS) de nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de AVG, durante 35 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- mM	AVG μM	MS de Nódulos	
		mg/planta	mg/nódulo
0	0	82,17 ¹ a	1,01 a
	0,01	87,17 a	1,18 a
	0,1	93,50 a	1,31 a
2,0	0	19,00 b	1,01 a
	0,01	12,57 b	0,93 a
	0,1	18,43 b	1,19 a
4,0	0	4,30 b	0,66 a
	0,01	3,17 b	0,32 a
	0,1	1,60 b	0,64 a
sd		12,41	0,39
cv(%)		34,7	42,4
DMS		36,04	

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

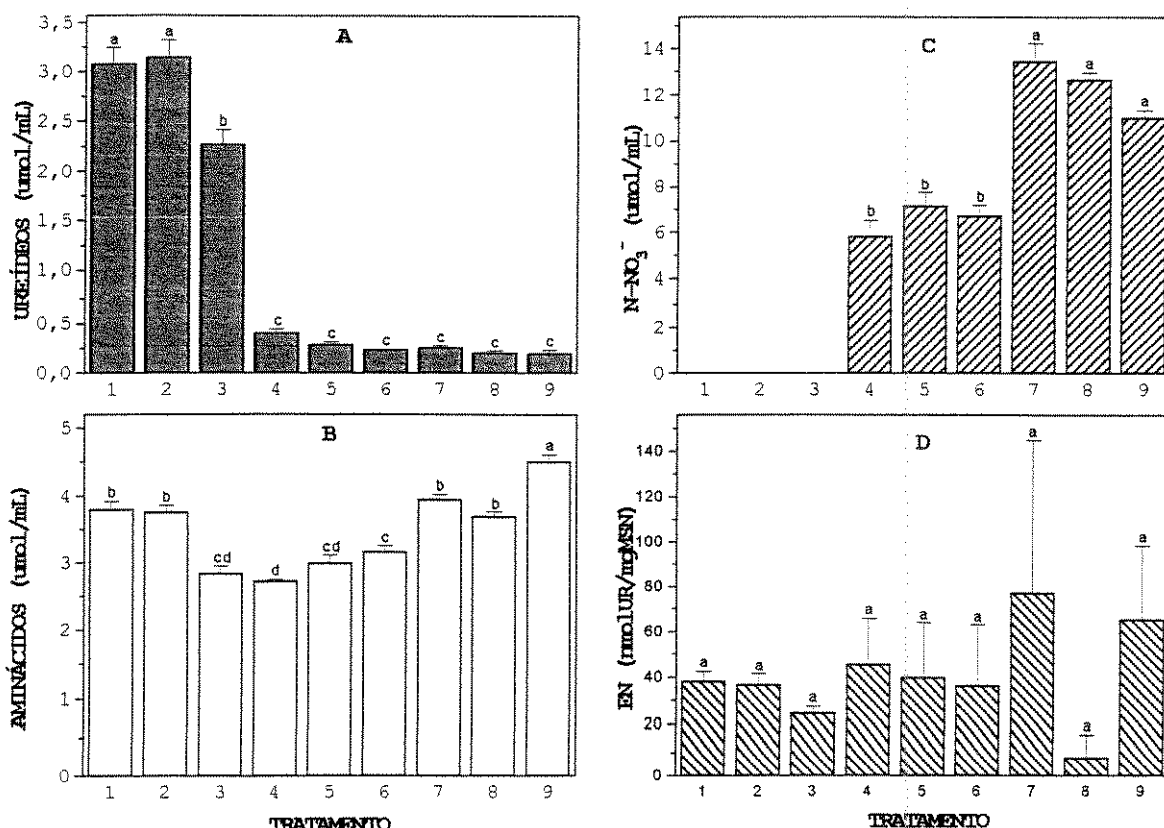


Figura 8 Teores de ureídeos totais (A), aminoácidos livres totais (B), e de N-NO_3^- (C) encontrados nos exsudatos do xilema, e eficiência nodular (D) de nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e de AVG, durante 35 dias, até a frutificação (estádio R4). Tratamentos 1, 2 e 3 = 0 mM de NO_3^- ; 4, 5 e 6 = 2,0 mM de NO_3^- ; 7, 8 e 9 = 4,0 mM de NO_3^- , tendo, respectivamente, dentro de cada concentração de NO_3^- , 0, 0,01 e 0,1 μM de AVG. Barras são médias \pm SE ($n=12$ plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 20. Composição de aminoácidos livres (mol%) do exsudato do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e duas de AVG, durante 35 dias, até a frutificação (estádio R4).

AA	0mM NO_3^-		2mM NO_3^-		4mM NO_3^-	
	AVG	AVG	AVG	AVG	AVG	AVG
	0µM	0,1µM	0µM	0,1µM	0µM	0,1µM
ASN	42,99	24,95	51,15	73,60	75,31	71,72
GLN	7,93	4,56	6,81	6,96	11,14	6,68
ASP	35,38	59,50	35,35	10,92	4,25	8,86
SER	3,40	3,18	*	1,36	*	3,19
GABA(?)	2,10	2,96	1,39	1,03	*	1,53
THR	1,88	1,80	1,37	1,37	1,49	1,59
ARG	1,76	1,46	*	*	1,04	*
HIS	1,60	*	*	*	1,66	*
GLU	1,56	*	*	*	*	*
VAL	1,40	1,59	2,81	2,10	2,20	2,14
PHE	*	*	*	0,91	1,07	1,04
ILE	*	*	1,12	0,82	0,88	*
LEU	*	*	*	0,93	0,96	*
ALA	*	*	*	*	*	2,27

*Aminoácidos presentes nas amostras, porém, apresentando valores (mol%) inferiores a 0,80%. Os aminoácidos TYR e LYS também presentes em todas as amostras, porém com valor inferior a 0,80%, não foram incluídos na tabela.

4.3.3. Concentrações de NO_3^- e de AIA em Hidroponia:

Foi conduzido um experimento com plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia, até a frutificação (estádio R4), com adição de AIA à solução nutritiva, com o objetivo de verificar o possível envolvimento de auxinas estimulando a nodulação e/ou prevenindo-a do efeito inibitório de NO_3^- . Esse experimento, em parte, consistiu na repetição do experimento do item 4.2.4, porém, além de avaliarmos a atividade de fixação de N_2 , o AIA foi mantido durante todo o período, desde a inoculação até a coleta dos dados, na frutificação.

O crescimento das plantas em três concentrações NO_3^- e quatro de AIA, avaliado, após 39 dias, pelas produções de massa fresca e seca de parte aérea e de raiz, é apresentado na tabela 21. A nodulação, avaliada pela produção de massa fresca e seca de nódulos e pela contagem de nódulos/planta é apresentada, respectivamente, na tabela 22 e figura 9A. A atividade de fixação de N_2 do nódulo, avaliada pelos produtos transportados nos exsudatos do xilema (aminoácidos livres totais, NO_3^- e, principalmente, ureídeos totais), é apresentada na figura 9. A composição de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema, separados por HPLC, é apresentada na tabela 23.

O NO_3^- na solução nutritiva, estimulou o crescimento de plantas (tabela 21). Apesar de, no geral, na presença de NO_3^- os nódulos apresentaram maior massa específica - massa fresca e seca - (tabela 22), a nodulação (figura 9A) e a atividade fixadora de N_2 do nódulo - medida pelo teor de ureídeos totais

nos exsudatos do xilema - (figura 9B), foram inibidas pelo NO_3^- na solução nutritiva.

O NO_3^- , quando presente na solução nutritiva, também apareceu nos exsudatos do xilema das plantas de forma proporcional à concentração na solução nutritiva (figura 9D), provocando, ainda, no geral, redução no teor de aminoácidos livres totais nos exsudatos (figura 9C).

Na presença de NO_3^- , maiores valores numéricos para massa de planta (tabela 21), massa de nódulo (tabela 22) e nodulação (figura 9A), no geral, foram observados quando da presença do AIA às concentrações de 0,01 e de 1,0 μM na solução nutritiva. Todavia, o IAA na solução nutritiva, não exerceu efeito nítido sobre os teores de ureídeos totais e de aminoácidos livres totais nos exsudatos do xilema (figura 9B e 9C), causando inclusive, na ausência de NO_3^- , redução desses, principalmente à concentração de 100 μM .

Quanto à composição mol% de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema (tabela 23), NO_3^- e AIA interagiram. Na ausência de AIA, NO_3^- estimulou o aumento de asparagina e diminuiu, principalmente, o de glutamina. Já o AIA (1,0 μM), na ausência de NO_3^- provocou a diminuição de asparagina e de glutamina e aumento de aspartato; esse efeito do AIA se intensificou com o aumento da concentração de NO_3^- , anulando por completo o efeito estimulador de NO_3^- no aumento de asparagina.

Tabela 21. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- mM	AIA μM	MFPaérea g/planta	MFRaiz g/planta	MSPaérea g/planta	MSRaiz g/planta
0	0,0	7,49 ¹ d	5,14 b	1,36 d	0,41 c
	0,01	6,70 d	4,98 b	1,12 d	0,40 c
	1,0	7,04 d	5,61 b	1,26 d	0,42 c
	100	4,50 d	5,78 b	0,76 d	0,41 c
2,0	0,0	43,65 bc	35,97 a	7,77 bc	2,59 ab
	0,01	44,22 bc	38,11 a	7,94 bc	2,71 ab
	1,0	45,78 bc	43,83 a	8,74 ab	3,07 ab
	100	35,80 c	41,13 a	6,30 c	2,63 ab
4,0	0,0	53,84 ab	35,90 a	9,72 ab	2,71 ab
	0,01	54,05 ab	40,65 a	9,31 ab	2,89 ab
	1,0	59,09 a	43,99 a	10,49 a	3,15 a
	100	36,14 c	39,31 a	6,19 c	2,40 b
sd		4,20	3,82	0,84	0,28
cv(%)		12,7	13,5	14,2	14,3
DMS		10,44	9,49	2,09	0,71

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 22. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulos, de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e quatro de AIA, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R4).

NO_3^- mM	AIA μM	MF Nódulos		MS Nódulos	
		g/planta	mg/nódulo	g/planta	mg/nódulo
0	0,0	1,11 ¹ a	10,53 bcd	0,17 a	1,58 bcd
	0,01	0,88 ab	9,31 cd	0,13 ab	1,39 cd
	1,0	0,99 ab	9,55 cd	0,15 a	1,46 cd
	100	0,50 abcd	5,28 d	0,07 abc	0,77 d
2,0	0,0	0,71 abc	25,26 ab	0,11 abc	3,75 a
	0,01	1,04 a	20,44 abcd	0,16 a	3,29 ab
	1,0	1,13 a	26,61 a	0,16 a	3,84 a
	100	0,73 abc	20,96 abc	0,09 abc	2,70 abc
4,0	0,0	0,17 cd	16,65 abcd	0,02 c	2,27 abcd
	0,01	0,20 cd	17,78 abcd	0,03 c	2,27 abcd
	1,0	0,36 bcd	19,99 abcd	0,05 bc	2,51 abcd
	100	0,04 d	12,31 abcd	0,01 c	1,28 cd
sd		0,25	6,14	0,04	0,72
cv (%)		38,9	37,8	43,0	32,0
DMS		0,63	15,25	0,10	1,80

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

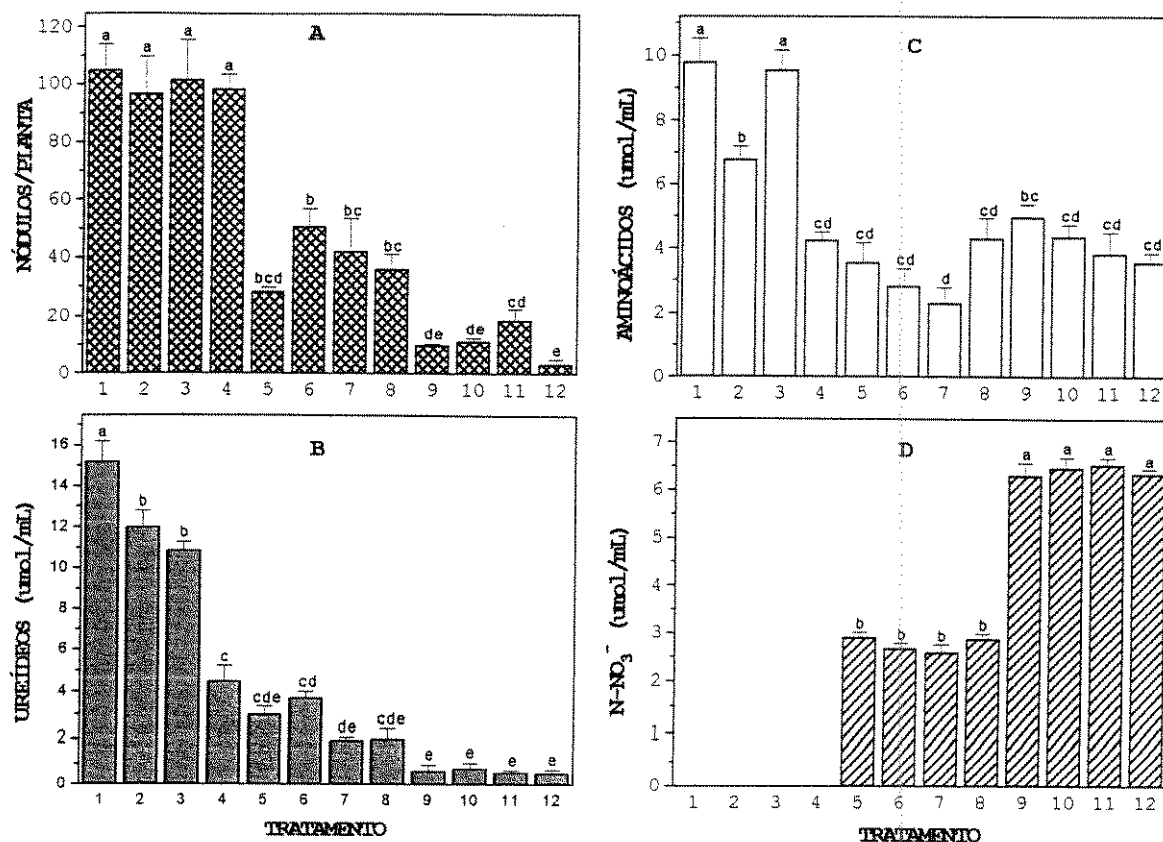


Tabela 23. Composição (mol %) de aminoácidos livres (AA) do exsudato do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, em três concentrações de NO_3^- e duas de IAA, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R4).

AA	0mM NO_3^-		2mM NO_3^-		4mM NO_3^-	
	AIA	AIA	AIA	AIA	AIA	AIA
	0 μM	1,0 μM	0 μM	1,0 μM	0 μM	1,0 μM
ASN	49,19	40,59	44,15	34,35	69,60	30,54
GLN	15,03	13,49	9,23	10,17	3,73	*
ASP	19,73	28,38	38,37	30,62	26,67	61,71
SER	4,68	6,87	8,25	8,62	*	4,62
THR	3,43	3,33	*	3,52	*	*
HIS	2,61	2,18	*	*	*	*
ARG	2,63	2,39	*	2,69	*	*
ALA	*	*	*	4,41	*	*
GABA(?)	1,64	1,65	*	3,61	*	*
VAL	1,06	1,12	*	2,01	*	3,13

*Aminoácidos presentes nas amostras, porém, apresentando valores (mol%) inferiores a 1,0%. Presentes em todas as amostras, com valores inferiores a 1,0%, mas não incluídos na tabela: GLU; TYR; PHE; ILE; LEU e LYS.

4.4. FIXAÇÃO DE N_2 POR NÓDULOS DE PLANTAS ADULTAS:

Nos experimentos anteriores (ítems 4.2 e 4.3), as plantas foram conduzidas desde a inoculação até a coleta, na frutificação (exceto experimento do ítem 4.2.4 em que o AIA foi mantido na solução nutritiva apenas nas duas semanas iniciais) recebendo os tratamentos de NO_3^- e/ou de inibidores (Co e AVG) e/ou indutor (AIA) da síntese de etileno. Em razão da necessidade de se verificar um possível efeito desses produtos relacionados à síntese de etileno, associado ou não ao NO_3^- , na atividade fixadora de N_2 de nódulos já formados (planta adulta), foram conduzidos mais quatro experimentos, sendo um em vermiculita e três em hidroponia.

4.4.1. Mantidas em Vermiculita e Submetidas a NO_3^- e Co:

Com o objetivo de verificar se o Co exerce algum efeito na atividade do nódulo já formado, inibindo ou estimulando a atividade fixadora de N_2 ou prevenindo a atividade do nódulo contra o efeito inibitório do NO_3^- , foi conduzido um experimento em vermiculita submetendo as plantas, na frutificação (estádio R3), aos tratamentos de NO_3^- e/ou Co por um período de sete dias.

Plantas de soja inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 50 dias recebendo solução nutritiva -N, e que foram submetidas aos tratamentos com 15 mM de NO_3^- e/ou 900 $\mu g/L$ de Co durante sete dias, apresentaram crescimento bastante uniforme (tabela 24).

Plantas submetidas aos tratamentos com NO_3^- , à concentração de 15 mM por sete dias, apresentaram menor nodulação - número e massa de nódulos/planta - (tabela 25), evidenciando que, durante esse período, processos infecciosos secundários e/ou crescimento de nódulos já iniciados, ocorreram na ausência de NO_3^- , os quais foram impedidos de ocorrer pela presença do NO_3^- .

A de fixação simbiótica do N_2 - avaliada pela presença de ureídeos nos exsudatos do xilema - foi fortemente inibida pela presença de NO_3^- na solução nutritiva, enquanto que aumento do teor de NO_3^- nos exsudatos foi observado concomitantemente (tabela 26).

Mesmo na ausência de NO_3^- , pequeno teor de NO_3^- foi detectado nos exsudatos, o que é explicado pelas condições de cultivo em vermiculita, com o uso de água de torneira para irrigação e preparo (diluição da solução estoque) da solução nutritiva, formas possíveis de contaminação.

Os aminoácidos livres totais sofreram pequena diminuição na presença de NO_3^- (tabela 26), porém não chegando a ser discriminada pelo teste de média empregado.

O Co, à concentração de 900 $\mu\text{g/L}$ na solução nutritiva, não afetou as características avaliadas (tabelas 24 a 26). Além disso, Co não foi eficiente em prevenir os nódulos do efeito negativo de NO_3^- na atividade de fixação de N_2 (tabela 26).

Tabela 24. Produção de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita, durante 50 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻	Co	MS Parte Aérea	MS Raiz
mM	µg/L	g/planta	g/planta
0	0	7,00 ¹ a	1,70 a
	900	6,71 a	1,66 a
15	0	8,55 a	1,93 a
	900	7,21 a	1,59 a
sd		1,33	0,36
cv(%)		18,0	20,7

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 25. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulos e número de nódulos/planta de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita, durante 50 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻ mM	Co µg/L	MF Nódulos		MS nódulos		Nódulos/ planta ¹
		g/planta	mg/nódulo	g/planta	mg/nódulo	
0	0	4,06 ² a	12,61 a	0,81 a	2,51 a	319,0 a
	900	3,80 a	11,37 a	0,77 ab	2,30 a	328,1 a
15	0	2,26 b	13,27 a	0,48 bc	2,81 a	171,1 b
	900	1,91 b	11,85 a	0,40 c	2,47 a	165,6 b
sd		0,66	1,26	0,13	0,28	41,70
cv(%)		21,8	10,3	21,6	11,0	17,0
DMS		1,45		0,29		92,16

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Dados originais foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$ para a realização da análise estatística. 2-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 26. Teores de ureídeos totais, aminoácidos (AA) livres totais e de N-NO_3^- , encontrados nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita, durante 50 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO_3^-	Co	Ureídeos	AA Totais	N-NO_3^-
mM	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{mol/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$
0	0	18,04 ¹ a	7,50 ab	0,60 b
	900	17,34 a	7,71 a	0,77 b
15	0	2,76 b	5,42 b	16,79 a
	900	2,80 b	6,05 ab	17,01 a
sd		2,09	1,02	1,62
cv(%)		20,4	15,3	18,4
DMS		4,61	2,26	3,57

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

4.4.2. Mantidas em Hidroponia e Submetidas a NO_3^- e Co:

O experimento anterior (item 4.4.1) foi repetido, só que em hidroponia, para verificar se há diferença de resposta aos tratamentos aplicados entre os sistemas de cultivo de hidroponia e vermiculita.

Plantas de soja, inoculadas e cultivadas em hidroponia durante 54 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N, e que foram submetidas aos tratamentos com 15 mM de NO_3^- e/ou 900 $\mu\text{g/L}$ de Co por sete dias, não tiveram o seu crescimento (tabela 27) nem a nodulação - número e massa de nódulos/planta - (tabela 28) afetados. Diferentemente do que ocorreu em vermiculita (tabela 25), em hidroponia a nodulação permaneceu estável, mesmo na ausência de NO_3^- na solução nutritiva (tabela 28).

Apesar de não afetar a nodulação (tabela 28), o NO_3^- , a 15 mM por sete dias, inibiu a atividade fixadora de N_2 do nódulo, reduzindo grandemente o teor de ureídeos nos exudatos do xilema (tabela 29). Além disso, o NO_3^- apareceu em alta concentração nos exsudatos do xilema, apesar de não interferir no teor de aminoácidos livres totais.

Vale a observação de que, mesmo na ausência de NO_3^- , o conteúdo de ureídeos totais observados nos exsudatos do xilema de plantas em hidroponia (tabela 29), foi muito menor que aquele de plantas em vermiculita (tabela 26). Como ocorreu no experimento em vermiculita (item 4.4.1), o Co, em hidroponia, também não exerceu nenhum efeito sobre as características

avaliadas (tabelas 27 a 28), nem preveniu a atividade fixadora de N_2 do nódulo do efeito inibitório de NO_3^- (tabela 29).

Tabela 27. Produção de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 54 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO_3^-	Co	MS Parte Aérea	MS Raiz
mM	$\mu g/L$	g/planta	g/planta
0	0	1,61 ¹ a	0,38 a
	900	1,56 a	0,40 a
15	0	1,78 a	0,43 a
	900	1,79 a	0,46 a
sd		0,26	0,05
cv(%)		15,6	11,1

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 28. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulos e número de nódulos/planta em plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 54 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻ mM	Co µg/L	MF Nódulos		MS Nódulos		Nódulo/ planta ¹
		g/planta	mg/nódulo	g/planta	mg/nódulo	
0	0	1,07 ² a	9,74 a	0,18 a	1,61 a	111,7 a
	900	0,89 a	8,46 a	0,15 a	1,47 a	104,0 a
15	0	0,91 a	10,81 a	0,14 a	1,65 a	84,2 a
	900	0,88 a	7,38 a	0,15 a	1,24 a	119,3 a
sd		0,09	1,24	0,02	0,17	13,18
cv(%)		9,7	13,6	9,9	11,6	12,6

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Dados originais foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$ para a realização da análise estatística. 2-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 29. Teores de ureídeos totais, aminoácidos livres totais (AA) e de N-NO_3^- , encontrados nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 54 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO_3^-	Co	Ureídeos	AA Totais	N-NO_3^-
mM	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{mol/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$
0	0	4,87 ¹ a	3,21 a	-
	900	5,33 a	2,54 a	-
15	0	0,85 b	3,60 a	13,81 ² a
	900	1,25 b	3,56 a	12,99 a
sd		0,51	0,64	0,44
cv (%)		16,7	19,9	3,3
DMS		1,45		

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. 2-Análise estatística realizada considerando apenas os dois tratamentos com NO_3^- em razão da não detecção desse nos demais.

4.4.3. Mantidas em Hidroponia e Submetidas a NO_3^- e AVG:

Foi conduzido um experimento em hidroponia com os mesmos objetivos dos experimentos dos itens 4.4.1 e 4.4.2, somente que foi utilizado AVG, um inibidor específico da síntese de etileno e, além disso, optamos por reduzir a concentração de NO_3^- para 5,0 mM em razão do grande efeito inibitório, observado na atividade fixadora de N_2 , quando à concentração de 15 mM.

Plantas de soja inoculadas e cultivadas em hidroponia durante 31 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N e que foram submetidas aos tratamentos com 5,0 mM de NO_3^- e/ou 0,5 μM de AVG por sete dias, não tiveram o seu crescimento afetado (tabela 30).

Apesar de não afetar a nodulação e a massa de nódulos (tabela 31), o NO_3^- , na solução nutritiva à 5,0 mM por sete dias, inibiu a atividade fixadora de N_2 do nódulo (tabela 32), reduzindo o teor de ureídeos, e ao mesmo tempo aparecendo em grande concentração nos exsudatos do xilema. Por outro lado, o teor de aminoácidos livres totais não foi influenciado pela presença de NO_3^- na solução nutritiva (tabela 32).

O AVG, à concentração de 0,5 μM na solução nutritiva por sete dias, não afetou nenhuma das características analisadas (tabelas 30 a 32); além disso, não se mostrou eficaz em prevenir o efeito inibitório de NO_3^- na atividade fixadora de N_2 do nódulo (tabela 32).

Tabela 30. Produção de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 31 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻	AVG	MS Parte Aérea	MS Raiz
mM	µM	g/planta	g/planta
0	0	1,87 ¹ a	0,56 a
	0,5	1,89 a	0,45 a
5	0	2,35 a	0,68 a
	0,5	1,96 a	0,56 a
sd		0,34	0,14
cv (%)		16,7	24,8

Médias seguidas da mesma letra, na colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 31. Produção de massa seca (MS) de nódulos e número de nódulos/planta de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 31 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻ mM	AVG µM	MS de Nódulos		Nódulo/ planta ¹
		g/planta	mg/nódulo	
0	0	0,23 ² a	1,13 a	213,4 a
	0,5	0,22 ab	1,24 a	186,3 a
5	0	0,18 ab	0,92 a	200,1 a
	0,5	0,14 b	0,99 a	144,6 a
sd		0,03	0,19	42,3
cv(%)		17,4	17,9	22,8
DMS		0,08		

Médias seguidas da mesma letra, na colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Dados originais foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ para a realização da análise estatística. 2-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 32. Teores de ureídeos totais, aminoácidos totais (AA) e de N-NO_3^- , encontrados nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 31 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO_3^-	AVG	Ureídeos	AA Totais	N-NO_3^-
mM	μM	$\mu\text{mol/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$	$\mu\text{mol/mL}$
0	0	2,07 ¹ a	3,76 a	-
	0,5	2,03 a	3,91 a	-
5	0	0,67 b	4,49 a	10,82 ² a
	0,5	0,50 b	4,01 a	10,27 a
sd		0,19	0,51	0,66
cv(%)		14,4	12,6	6,2
DMS		0,42		

Médias seguidas da mesma letra, na colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. 2-Análise estatística realizada considerando apenas os tratamentos com NO_3^- , em razão da não detecção desse nos demais tratamentos.

4.4.4. Mantidas em Hidroponia e Submetidas a NO_3^- e AIA:

Com o objetivo de verificar se o AIA exerce algum efeito na atividade do nódulo já formado, inibindo ou estimulando a atividade fixadora de N_2 ou prevenindo a atividade do nódulo contra o efeito inibitório de NO_3^- , foi conduzido um experimento, em hidroponia, submetendo as plantas na frutificação (estádio R3) aos tratamentos de NO_3^- e/ou AIA por um período de sete dias.

Plantas de soja, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução nutritiva -N, e que foram submetidas aos tratamentos com 5,0 mM de NO_3^- e/ou 1,0 μM de AIA por sete dias, não tiveram o seu crescimento (tabela 33) nem nodulação - número e massa de nódulos - (tabelas 34 e 35) afetados.

Embora a nodulação e a massa de nódulos não tenham sido afetadas pelo NO_3^- à concentração de 5,0 mM, a atividade fixadora de N_2 (expressa pelo teor de ureídeos totais no exsudato do xilema) do nódulo foi inibida (tabela 36), concomitantemente ao surgimento de NO_3^- em grande concentração nos exsudatos do xilema.

O AIA não afetou de forma significativa as características avaliadas, embora o número de nódulos/planta tenha sido ligeiramente maior (embora não significativo) na presença de 1,0 μM de AIA (tabela 35). Além disso, o AIA não foi eficaz em prevenir a atividade fixadora de N_2 dos nódulos do efeito inibitório de NO_3^- (tabela 36).

Tabela 33. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de parte aérea e de raiz de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻	AIA	MF Paérea	MF Raiz	MS Paérea	MS Raiz
mM	µM	g/planta	g/planta	g/planta	g/planta
0	0	6,52 ¹ a	4,66 a	1,12 a	0,40 a
	1,0	5,39 a	4,81 a	1,00 a	0,45 a
5,0	0	6,30 a	5,19 a	1,06 a	0,46 a
	1,0	7,15 a	5,14 a	0,96 a	0,52 a
sd		1,98	1,37	0,37	0,10
cv(%)		33,8	25,1	35,4	22,0

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 34. Produção de massa fresca (MF) e de massa seca (MS) de nódulo, de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻ mM	AIA µM	MF de Nódulo		MS de Nódulo	
		g/planta	mg/nódulo	g/planta	mg/nódulo
0	0	0,92 ¹ a	7,76 a	0,15 a	1,23 a
	1,0	0,90 a	6,10 a	0,14 a	0,96 a
5	0	0,71 a	6,29 a	0,10 a	0,91 a
	1,0	0,76 a	7,26 a	0,11 a	1,03 a
sd		0,31	3,00	0,05	0,45
cv(%)		38,0	43,7	40,7	43,6

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 35. Produção de nódulos por plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO ₃ ⁻ (mM)	AIA (M)	Número de Nódulos/Planta
0	0	128,6 ¹ a
	1,0	147,4 a
5,0	0	117,4 a
	1,0	127,0 a
sd		34,94
cv(%)		26,90

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ para a realização da análise estatística. Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada.

Tabela 36. Teores de ureídeos totais, aminoácidos totais (AA) e de N-NO_3^- em exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em hidroponia, durante 39 dias, até a frutificação (estádio R3), em solução -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, durante sete dias.

NO_3^-	AIA	Ureídeos	AA Totais	N-NO_3^-
(mM)	μM	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$
0	0	10,97 ¹ a	6,01 a	-
	1,0	9,60 a	5,82 a	-
5	0	2,48 b	6,22 a	12,00 ² a
	1,0	3,79 b	5,30 a	14,07 a
sd		1,14	0,62	1,62
cv(%)		17,0	11,6	12,4
DMS		2,51	1,37	

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. 2-Análise estatística realizada considerando-se apenas os tratamentos onde foi detectado NO_3^- .

4.5. TRANSFERÊNCIA DE PLANTAS ADULTAS E NODULADAS PARA HIDROPONIA:

Em razão de resultados obtidos nos experimentos anteriores, nos quais plantas mantidas no sistema de hidroponia apresentaram menor atividade fixadora de N_2 (avaliado pelo teor de ureídeos nos exsudatos do xilema) comparado às plantas mantidas em vermiculita, foram conduzidos mais cinco experimentos no sistema de transferência de plantas da vermiculita para hidroponia, e em alguns tratamentos, voltando novamente as plantas para a vermiculita. O objetivo desses experimentos foi de verificar, além de NO_3^- , possíveis efeitos de estresse de O_2 provocados pelo sistema de hidroponia (hipoxia e anoxia) na atividade fixadora de N_2 de nódulos já formados e fixando N_2 ativamente, além de alterações nos teores de Lb e de proteína total nos nódulos e na atividade de asparaginase.

4.5.1. Hidroponia com Aeração e com ou sem NO_3^- :

Foram conduzidos dois experimentos no sistema de transferência de plantas da vermiculita para hidroponia com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de exposição de plantas adultas noduladas a hidroponia e/ou NO_3^- , sobre a atividade fixadora de N_2 dos nódulos, além da atividade de asparaginase e os teores de proteína total e de Lb nos nódulos.

No primeiro experimento, plantas de soja inoculadas e cultivadas em vasos com vermiculita durante 49 dias, até a

frutificação (estádio R3), recebendo solução -N, e que foram transferidas ou não para hidroponia, com ou sem adição de NO_3^- , apresentaram-se bem e uniformemente noduladas (tabela 37).

Mesmo sob aeração constante, a simples transferência das plantas da vermiculita para a hidroponia -N causou uma queda acentuada na atividade fixadora de N_2 pelos nódulos de soja - medida pela translocação de ureídeos nos exsudatos do xilema - (figura 10). O NO_3^- , também causou redução na atividade fixadora do nódulo, tanto em vermiculita quanto em hidroponia, mas esta redução foi mais acentuada (embora não diferindo estatisticamente), quando associado à hidroponia.

O teor de aminoácidos livres totais nos exsudatos do xilema (figura 11), foi menos afetado pelos tratamentos de hidroponia e/ou NO_3^- do que o teor de ureídeos. Os tratamentos +N apresentaram uma queda até o terceiro dia, recuperaram-se no quinto dia e mantiveram-se mais ou menos constantes, juntamente com o tratamento em hidroponia -N, até o final. Por outro lado, à semelhança de ureídeos totais, o controle (vermiculita -N) apresentou acréscimos constantes do teor de aminoácidos livres totais durante praticamente todo o período. Em tratamentos aos quais o NO_3^- foi fornecido, tanto plantas em hidroponia quanto plantas em vermiculita, apresentaram aumento exponencial do teor de NO_3^- nos exsudatos do xilema (figura 12).

A composição de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema, separados por HPLC, é apresentada na tabela 38. Plantas que foram submetidas ao tratamento com NO_3^- , tanto em hidroponia

quanto em vermiculita, apresentaram grande aumento de asparagina, enquanto que glutamina e serina sofreram grandes reduções. As plantas transferidas para hidroponia -N apresentaram grande aumento de aspartato e redução de asparagina e glutamina nos exsudatos do xilema.

Tabela 37. Número de nódulos/planta observados em plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 49 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, por período de até 9 dias.

Tratamento	Dias Após Início dos Tratamentos					
	0	1	3	5	7	9
H -N	191,8	190,0 a	205,2 a	182,8 a	185,8 a	195,0 a
H +N	191,8	181,8 a	189,8 a	187,2 a	196,8 a	196,5 a
V -N	191,8	182,8 a	182,0 a	176,5 a	195,0 a	177,8 a
V +N	191,8	182,8 a	177,0 a	170,8 a	197,8 a	179,0 a
sd		18,0	13,5	15,9	25,3	24,0
cv(%)		9,7	7,2	8,9	13,1	12,8

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados originais foram transformados para $\sqrt{x} + 0,5$ para a realização da análise estatística. Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada. H=hidroponia; V=vermiculita; -N= solução nutritiva -N; +N = solução nutritiva com 5 mM NO_3^- .

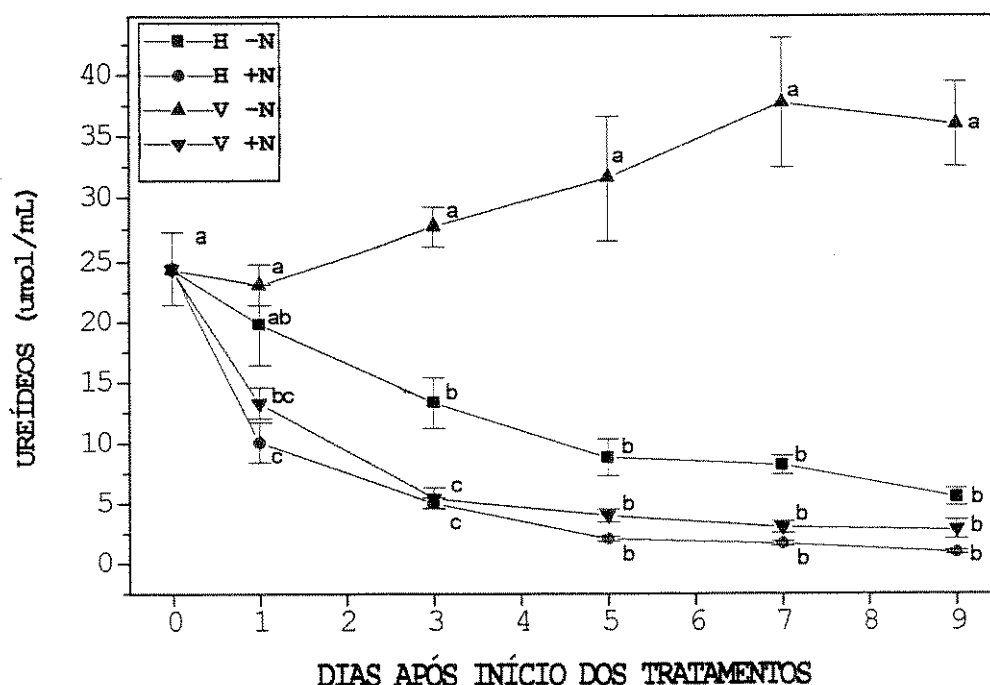


Figura 10. Teor de ureídeos totais observados nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 49 dias, até a frutificação, (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme figura, por período de até 9 dias. Valores são médias \pm SE ($n=12$ plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Para cada dia amostrado, valores assinalados com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). H=hidroponia e V=vermiculita; -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5,0 mM de NO_3^- .

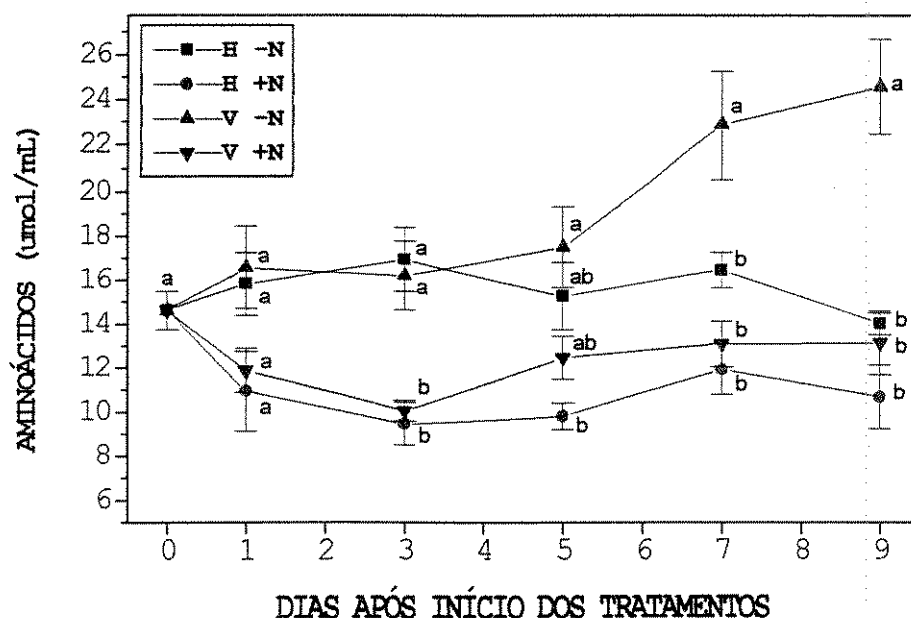


Figura 11. Teor de aminoácidos livres totais observados nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 49 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme figura, por período de até 9 dias. Valores são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Para cada dia amostrado, valores assinalados com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). H=hidroponia e V=vermiculita; -N=solução nutritiva - N; +N=solução nutritiva com 5,0 mM de NO_3^- .

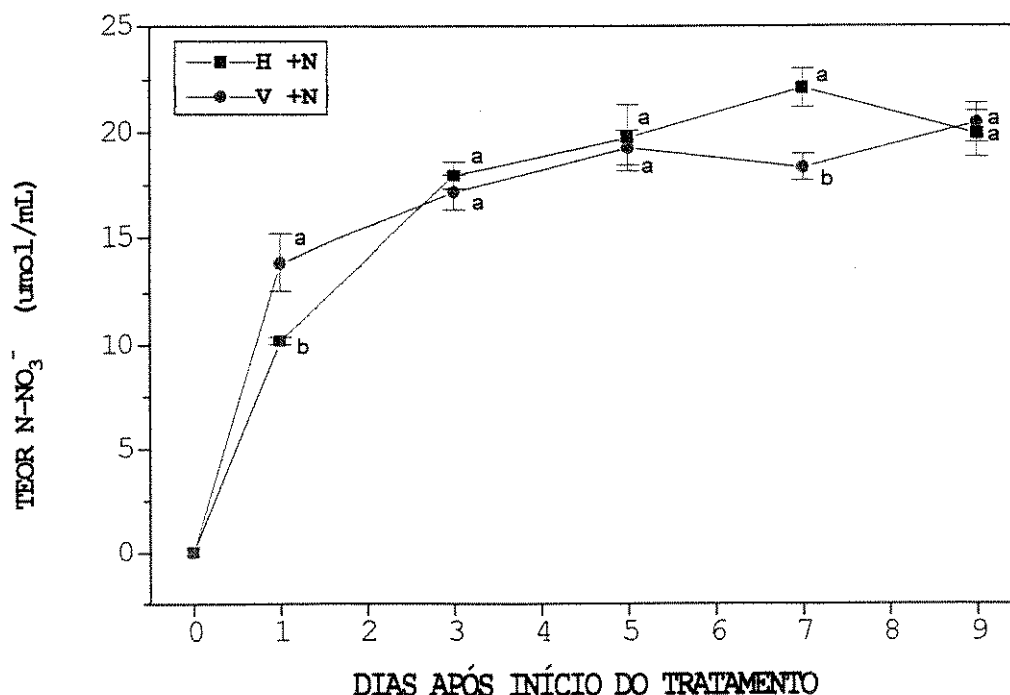


Figura 12. Teor de N-NO_3^- observado nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 49 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme figura, por período de até 9 dias. Valores são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Para cada dia amostrado, valores assinalados com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). H=hidroponia e V=vermiculita; +N=solução nutritiva com 5,0 mM de NO_3^- .

Tabela 38. Composição (mol %) de aminoácidos livres (AA) dos exsudatos do xilema de plantas de soja cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 49 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos com 5 mM de NO_3^- (+N) ou sem NO_3^- (-N), em vermiculita (V) ou hidroponia (H), por período de até 9 dias.

AA	Dia Zero			Dia Cinco			Dia Nove		
	V -N	H -N	H +N	V -N	V +N	H -N	H +N	V -N	V +N
ASN	47,53	36,67	76,25	44,06	84,23	28,33	83,72	52,87	82,35
GLN	21,15	10,04	4,89	20,25	5,09	9,92	4,28	19,49	6,00
ASP	10,94	35,38	10,78	13,06	3,34	42,46	7,43	4,99	4,38
SER	8,16	5,09	2,04	11,25	2,04	7,91	*	10,08	1,68
THR	3,25	2,76	1,35	3,23	1,09	2,81	1,19	3,50	1,56
HIS	3,24	2,17	1,86	3,02	1,90	*	1,72	3,45	2,01
ARG	2,64	1,77	*	2,27	1,17	2,19	*	2,34	0,98
GABA	2,21	2,33	1,22	2,02	*	2,62	*	2,39	*
VAL	0,88	1,62	1,61	0,84	1,14	1,41	1,66	0,89	1,04
ALA	*	1,33	*	*	*	2,35	*	*	*
ILE	*	0,84	*	*	*	*	*	*	*

*Aminácidos presentes nas amostras, porém, apresentando valores (mol%) inferiores a 0,80%.
Presentes em todas as amostras, com valores inferiores a 0,80%, não incluídos na tabela: GLU;
TYR; MET; PHE; LEU e LYS.

Em experimento semelhante, com o objetivo de verificar alguma associação entre composição de exsudatos do xilema com atividade de asparaginase e os teores de Lb e de proteína solúvel total em nódulos, três lotes de plantas de soja, inoculadas e cultivadas em vermiculita -N durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), foram transferidas para hidroponia -N, com aeração, por períodos de 1, 3 e 5 dias. Nesses intervalos de tempo, a partir do início dos tratamentos, foram coletados os exsudatos do xilema e os nódulos, procedendo-se às dosagens de ureídeos totais e de aminoácidos livres totais nos exsudatos e de proteína total e Lb, além da atividade de asparaginase, nos nódulos.

A transferência das plantas para a hidroponia provocou uma queda acentuada na atividade fixadora de N_2 dos nódulos (teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema - figura 13A). Com apenas um dia de transferidas para a hidroponia, a queda do teor de ureídeos já se tornou significativa, estabilizando-se em relação ao controle (vermiculita -N), à partir do terceiro dia. O teor de aminoácidos totais também sofreu queda pela transferência para a hidroponia, somente que essa, em relação ao controle, foi bem menor do que para ureídeos (figura 13B).

Quanto à composição dos aminoácidos livres nos exsudatos do xilema (tabela 39), a transferência das plantas para a hidroponia provocou aumento muito grande do teor de aspartato e diminuição dos teores de asparagina e de glutamina. Além disso,

exsudatos de plantas em hidroponia apresentaram uma maior amplitude de distribuição entre os aminoácidos.

Quanto à atividade de asparaginase nos nódulos (tabela 40), nódulos de plantas que foram transferidas para a hidroponia apresentaram menores atividades, comparado ao controle vermiculita -N, nos três períodos de tempo amostrados. Na tabela 41 são apresentados os valores encontrados para proteína solúvel total nos nódulos de plantas de soja após a passagem pela coluna de Sephadex G-25 (extrato dessalinizado). Observa-se que os valores de proteína solúvel total entre os tratamentos são bastante próximos, indicando que as diferenças de atividade de asparaginase nos nódulos, entre os tratamentos, não foram devidas a ineficiência no processo de extração.

Nas tabelas 42 e 43, são apresentados, respectivamente, os teores de Lb e de proteína solúvel total nos nódulos. Nódulos de plantas transferidas para hidroponia, apresentaram menores teores de Lb, comparado aos controles vermiculita dia zero e vermiculita -N. A diminuição do teor de Lb ocorreu com apenas um dia da transferência das plantas para a hidroponia (embora o teste de médias não tenha discriminado), aumentando a diferença, comparado aos controles, com o tempo de permanência na hidroponia (tabela 42). Os teores de proteína solúvel total dos nódulos (tabela 43), variaram de forma semelhante aos da Lb, porém foram menos afetados pela hidroponia do que a Lb. Nesse experimento, o teor médio de Lb (8,39 mgLb/g de nódulo fresco) foi muito alto em relação ao teor médio de proteína

solúvel total (10,39 mg proteína/g de nódulo fresco), correspondendo aproximadamente a 81% da proteína solúvel total presente nos nódulos.

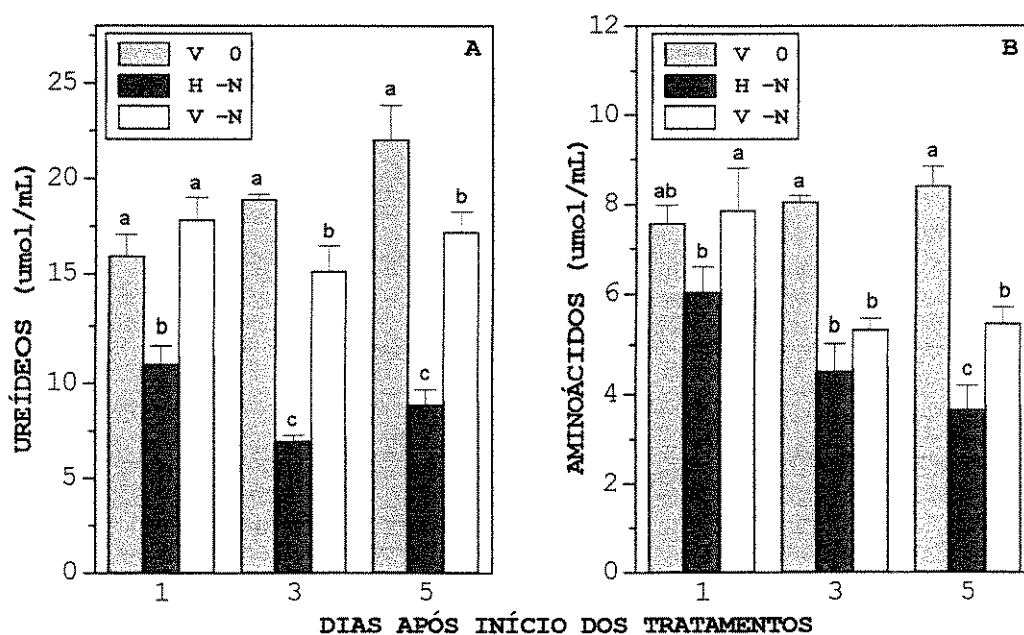


Figura 13. Teores de ureídeos totais (A) e de aminoácidos livres totais (B) presentes nos exsudatos do xilema de plantas de soja inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme figura, por períodos de 1, 3 e 5 dias. Barras são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições - vasos - com 3 plantas cada). Médias seguidas da mesma letra, dentro de cada dia de coleta, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). V 0= vermiculita dia zero; V=vermiculita; H=hidroponia; -N=solução nutritiva -N.

Tabela 39. Composição (mol%), de aminoácidos livres (AA) dos exsudatos do xilema de plantas de soja cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos em hidroponia (H) ou vermiculita (V), com solução nutritiva sem NO_3^- (-N), por períodos de 1, 3 e 5 dias. V 0= vermiculita dia zero.

AA	Dia 1				Dia 3				Dia 5			
	V 0	H -N	V -N	V 0	H -N	V -N	V 0	H -N	V 0	H -N	V -N	V -N
ASN	54,90	50,99	47,59	54,92	35,89	54,80	61,35	30,81	61,35	30,81	55,16	55,16
GLN	22,12	11,35	20,59	19,68	9,31	16,19	18,29	4,39	18,29	4,39	12,86	12,86
ASP	3,14	10,33	4,81	2,83	22,56	4,17	1,38	47,64	1,38	47,64	8,76	8,76
SER	6,72	6,94	10,05	5,71	7,35	5,58	4,51	3,11	4,51	3,11	5,50	5,50
THR	3,23	3,80	3,66	3,00	3,25	3,64	3,28	1,98	3,28	1,98	3,57	3,57
HIS	3,62	2,41	3,76	4,16	2,99	4,71	4,06	2,74	4,06	2,74	4,66	4,66
ARG	3,81	3,20	3,48	4,85	3,36	4,37	3,78	2,54	3,78	2,54	4,33	4,33
GABA	2,46	2,01	2,56	2,59	4,06	4,74	2,32	3,39	2,32	3,39	3,58	3,58
VAL	*	2,28	1,37	1,22	2,42	*	1,03	2,21	1,03	2,21	*	*
ALA	*	2,82	2,13	1,04	3,19	1,80	*	*	*	*	1,58	1,58
ILE	*	1,23	*	*	1,80	*	*	1,19	*	1,19	*	*
GLU	*	1,51	*	*	2,44	*	*	*	*	*	*	*
LEU	*	1,13	*	*	1,38	*	*	*	*	*	*	*

*Aminácidos presentes nas amostras, porém, apresentando valores (mol%) inferiores a 1,0%.
 Presentes em todas as amostras, com valores inferiores a 1,0%, não incluídos na tabela: TYR; MET; PHE e LYS.

Tabela 40. Atividade de asparaginase ($\text{nmolNH}_4^+/\text{g}$ de nódulo fresco/h), apresentada por nódulos de plantas de soja inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, por períodos de 1, 3 e 5 dias.

Tratamento	Dias Após Início dos Tratamentos		
	1	3	5
Vermiculita Dia Zero	646,17 ¹	2160,00	1299,30
Hidroponia -N	2625,00	1320,00	542,25
Vermiculita -N	3049,18	2842,40	828,05

1-Cada valor é oriundo de uma amostra de 4g de nódulos frescos composta por nódulos coletados de 12 plantas (4 vasos com 3 plantas cada, tomando-se 1,0 g de nódulos/vaso). -N=solução nutritiva -N.

Tabela 41. Teor de proteína solúvel total (mg proteína/g de nódulo fresco) presente em amostras de nódulos da extração com tampão para dosagem da atividade de asparaginase após a passagem pela coluna Sephadex G-25. Plantas de soja foram inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, por períodos de 1, 3 e 5 dias.

Tratamento	Dias Após Início dos Tratamentos		
	1	3	5
Vermiculita Dia Zero	7,64 ¹	7,52	9,97
Hidroponia -N	8,78	8,05	9,43
Vermiculita -N	7,85	8,06	7,82

1-Cada valor é oriundo de uma amostra de 4,0 g de nódulos frescos composta por nódulos coletados de 12 plantas (4 vasos com 3 plantas cada, tomando-se 1,0 g de nódulos/vaso). -N= solução nutritiva -N.

Tabela 42. Teor de Lb (mg Lb/g de nódulo fresco) apresentado por nódulos plantas de soja inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, por períodos de 1, 3 e 5 dias.

Tratamento	Dias Após Início dos Tratamentos		
	1	3	5
Vermiculita Dia Zero	8,12 ¹ a	8,93 a	9,49 a
Hidroponia -N	7,36 a	7,74 b	7,77 b
Vermiculita -N	8,19 a	8,32 ab	9,59 a
sd	0,98	0,43	0,68
cv(%)	12,5	5,2	7,6
DMS		0,85	1,34

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada, tomando-se para cada repetição 0,5 g de nódulos fresco. -N=solução nutritiva -N.

Tabela 43. Teor de proteína solúvel total (mg proteína/g de nódulo fresco) presente em amostras de nódulos da extração por Drabkin's para dosagem de Lb. Plantas de soja foram inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 45 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, por períodos de 1, 3 e 5 dias.

Tratamento	Dias Após Início dos Tratamentos		
	1	3	5
Vermiculita Dia Zero	9,54 a	10,09 a	12,00 a
Hidroponia -N	9,67 a	8,86 a	11,44 b
Vermiculita -N	10,29 a	9,73 a	11,85 ab
sd	1,64	2,27	0,22
cv(%)	16,7	23,8	1,8
DMS			0,43

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Cada valor representa a média de 4 repetições (vasos) com 3 plantas cada, tomando-se para cada repetição 0,5 g de nódulos fresco. -N=solução nutritiva -N.

4.5.2. Hidroponia com ou sem Aeração e com ou sem NO_3^- :

Foram conduzidos dois experimentos no sistema de transferência de plantas (vermiculita→hidroponia→vermiculita), com o objetivo de avaliar o efeito da exposição de plantas adultas noduladas à hidroponia (com e sem borbulhamento de ar) e/ou NO_3^- , na atividade fixadora de N_2 e nos teores de Lb e de proteína dos nódulos, além da capacidade de recuperação da atividade fixadora de N_2 e de Lb dos nódulos, após a suspensão do tratamento de estresse.

Plantas de soja, inoculadas e cultivadas em vermiculita, recebendo solução nutritiva -N durante 43 dias, até a frutificação (estádio R3), e que foram submetidas aos tratamentos com ou sem NO_3^- (em vermiculita ou em hidroponia), com ou sem aeração (em hidroponia), durante 4 dias, apresentaram-se bastante uniformes quanto ao crescimento e nodulação (tabela 44).

A atividade fixadora de N_2 pelo nódulo (medida pelo teor de ureídeos totais nos exsudatos no xilema) foi fortemente inibida pela transferência das plantas para a hidroponia (figura 14). O NO_3^- também causou inibição da atividade fixadora do nódulo, com maior intensidade em plantas na hidroponia do que em plantas na vermiculita, demonstrando sinergismo entre hidroponia e NO_3^- .

Destaca-se, nesse experimento, a capacidade de resposta do nódulo ao último tratamento a que foi submetido, evidenciado pela recuperação da atividade fixadora de N_2 , a qual demonstrou

ser dependente do tipo e duração do estresse imposto. Assim, plantas submetidas a hidroponia por 2 dias sem aeração e que passaram a receber aeração nos 2 dias finais, apresentaram uma grande capacidade de recuperação da atividade fixadora de N_2 (tratamentos 5 e 7 comparados, respectivamente, aos tratamentos 6 e 8). Resultado semelhante foi observado quando plantas em hidroponia por 2 dias foram transferidas e mantidas por 2 dias em vermiculita. Nesse caso, as plantas que estavam sem aeração (mais estressadas) apresentaram maior recuperação do que plantas que estavam recebendo aeração (tratamentos 9 e 11 comparados, respectivamente, aos tratamentos 10 e 12). A capacidade de recuperação do nódulo de plantas em hidroponia -N por 2 dias sem aeração e transferidas para vermiculita -N por 2 dias (tratamento 9) foi tão grande que o valor de ureídeos no xilema ficou próximo ao do tratamento controle vermiculita -N (tratamento 13).

Quanto aos aminoácidos livres totais (figura 15), não houve uma resposta nítida das plantas aos tratamentos a que foram submetidas. De maneira geral, os tratamentos de hidroponia associados ao NO_3^- , apresentaram teores mais elevados de aminoácidos livres totais, quando comparados aos tratamentos de hidroponia -N. Teores mais elevados de aminoácidos livres foram observados em hidroponia + NO_3^- sem aeração por quatro dias ou sem aeração nos dois dias finais (figura 15-t3,t8).

Plantas supridas com NO_3^- apresentaram NO_3^- nos exsudatos do xilema (figura 16), sendo que a absorção de NO_3^- mostrou ser

dependente da aeração, aumentando grandemente quando na presença dessa (tratamentos 4, 7 e 12). Verificou-se, também com NO_3^- , resposta ao suspender o tratamento de estresse de O_2 ; assim, plantas em hidroponia sem aeração por dois dias e que passaram a receber aeração nos dois dias finais (tratamento 7), ou que foram transferidas novamente para vermiculita (tratamentos 11 e 12), aumentaram o teor de NO_3^- nos exsudatos do xilema.

Na tabela 45 é apresentada a composição (mol%) de aminoácidos livres dos exsudatos do xilema. Plantas submetidas à hidroponia sem aeração (tratamentos 1, 3, 6 e 8) apresentaram uma queda acentuada de asparagina e um aumento de serina e de alanina, respondendo ao último tratamento de aeração recebido. Queda acentuada da asparagina ocorreu também nas plantas em hidroponia -N, independentemente da aeração (tratamentos 1, 2, 5 e 6).

Plantas em hidroponia que foram submetidas à aeração por 4 dias (tratamentos 2 e 4), ou por 2 dias finais após 2 dias sem aeração (tratamentos 5 e 7) ou mesmo aquelas que receberam aeração apenas por 2 dias em hidroponia e que foram transferidas para vermiculita (tratamentos 10 e 12), apresentaram grande aumento de aspartato, principalmente os tratamentos -N (tratamentos 2, 5 e 10). Por outro lado, glutamina diminuiu em praticamente todos os tratamentos, principalmente nos de hidroponia (tratamentos 1 a 8).

Tabela 44. Valores de massa seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de plantas; massa seca de nódulos (MSN), nódulos por planta (Nº/Planta) e massa específica de nódulo (MEN), apresentado por plantas de soja. Plantas foram inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 43 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos, conforme tabela, pelo período de 4 dias.

Tratamento	MSPA g/planta	MSR g/planta	MSN g/planta	Nódulos Nº/Planta ¹	MEN mgMS/Nódulo
1 -N, -ar, 4d	4,74 ² a	1,22 a	0,535 b	191,4 a	2,766 a
2 -N, +ar, 4d	4,05 a	1,17 a	0,478 b	190,2 a	2,506 a
3 +N, -ar, 4d	4,25 a	1,24 a	0,491 b	184,0 a	2,668 a
4 +N, +ar, 4d	4,13 a	1,18 a	0,496 b	184,5 a	2,746 a
5 -N, -ar, 2d → -N, +ar, 2d	4,44 a	1,16 a	0,520 b	202,3 a	2,537 a
6 -N, +ar, 2d → -N, -ar, 2d	4,80 a	1,38 a	0,555 ab	206,0 a	2,739 a
7 +N, -ar, 2d → +N, +ar, 2d	4,33 a	1,28 a	0,518 b	189,4 a	2,753 a
8 +N, +ar, 2d → +N, -ar, 2d	4,77 a	1,41 a	0,516 b	203,9 a	2,565 a
9 -N, -ar, 2d → V, -N, 2d	4,53 a	1,24 a	0,530 b	177,4 a	3,058 a
10 -N, +ar, 2d → V, -N, 2d	4,56 a	1,30 a	0,590 ab	196,4 a	3,058 a
11 +N, -ar, 2d → V, +N, 2d	4,44 a	1,14 a	0,525 b	186,9 a	2,805 a
12 +N, +ar, 2d → V, +N, 2d	4,74 a	1,30 a	0,596 ab	197,8 a	3,053 a
13 V, -N, 4d	5,35 a	1,48 a	0,698 a	203,6 a	3,441 a
14 V, +N, 4d	4,81 a	1,30 a	0,578 ab	191,5 a	3,029 a
sd	0,64	0,21	0,070	24,9	0,470
cv (%)	14,1	16,5	12,8	12,9	16,6
DMS			0,155		

Médias, nas colunas, seguidas da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). 1-Valores originais foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ para a realização da análise estatística. 2-Cada valor representa a média de 5 repetições com 3 plantas cada; onde: - N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM NO₃; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva; V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; → = mudança para condição seguinte.

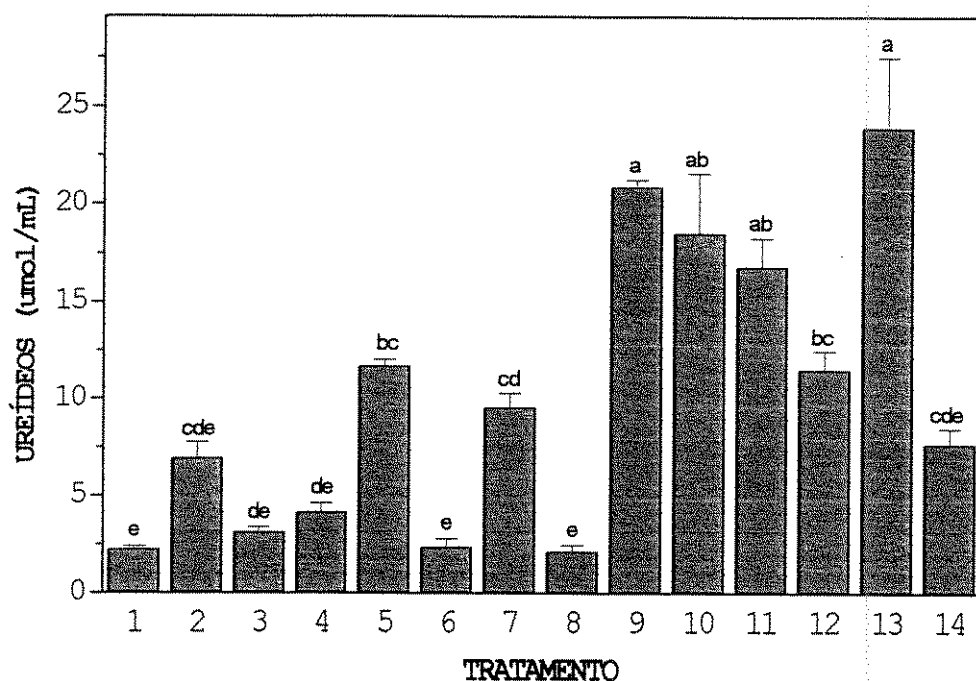


Figura 14. Teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 43 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, pelo período de 4 dias. Barras são médias \pm SE (n=15 plantas vindas de 5 repetições com 3 plantas cada). Tratamentos seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=-N,-ar,4d	5=-N,-ar,2d→-N,+ar,2d	9=-N,-ar,2d→ V,-N,2d
2=-N,+ar,4d	6=-N,+ar,2d→-N,-ar,2d	10=-N,+ar,2d→ V,-N,2d
3=+N,-ar,4d	7=+N,-ar,2d→+N,+ar,2d	11=+N,-ar,2d→ V,+N,2d
4=+N,+ar,4d	8=+N,+ar,2d→+N,-ar,2d	12=+N,+ar,2d→ V,+N,2d
13= V,-N,4d	14= V,+N,4d	

onde: -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5mM N-NO_3^- ; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva; V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; → = mudança para condição seguinte.

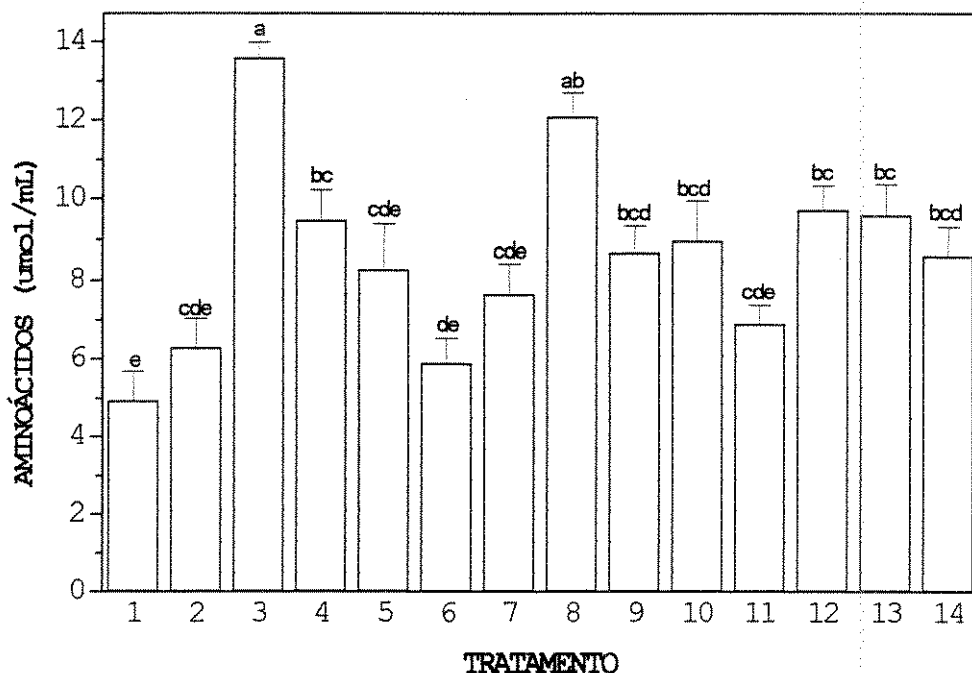


Figura 15. Teor de aminoácidos livres totais nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 43 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, pelo período de 4 dias. Barras são médias \pm SE (n=15 plantas vindas de 5 repetições com 3 plantas cada). Tratamentos seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=-N,-ar,4d	5=-N,-ar,2d→-N,+ar,2d	9=-N,-ar,2d→V,-N,2d
2=-N,+ar,4d	6=-N,+ar,2d→-N,-ar,2d	10=-N,+ar,2d→V,-N,2d
3=+N,-ar,4d	7=+N,-ar,2d→+N,+ar,2d	11=+N,-ar,2d→V,+N,2d
4=+N,+ar,4d	8=+N,+ar,2d→+N,-ar,2d	12=+N,+ar,2d→V,+N,2d
13=V,-N,4d	14=V,+N,4d	

onde: -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO_3^- ; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva; V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; → = mudança para condição seguinte.

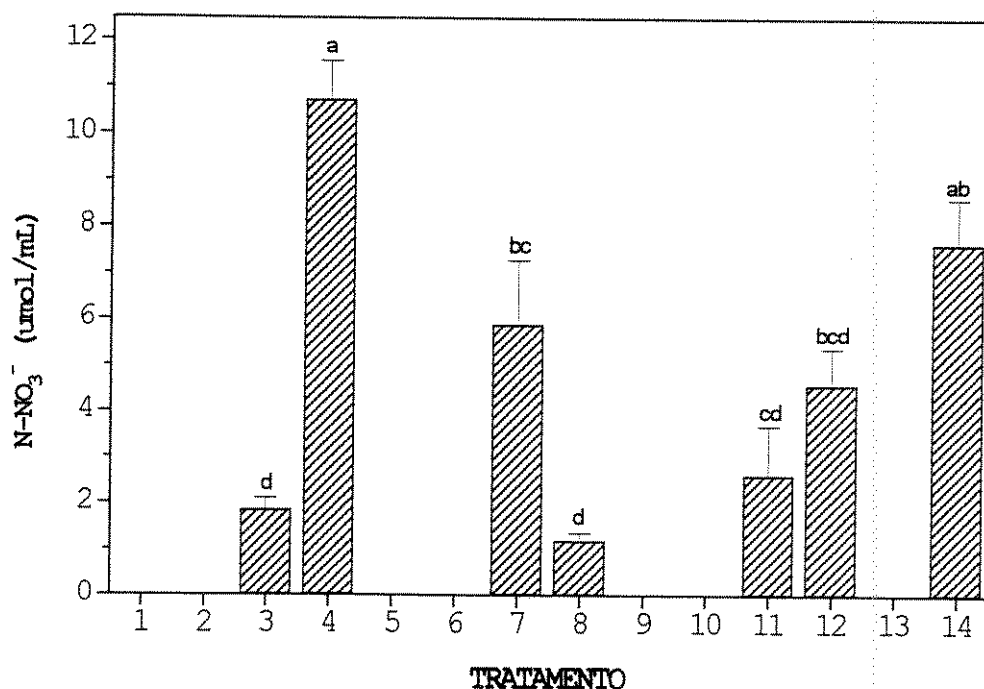


Figura 16. Teor de N-NO_3^- nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 43 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, pelo período de 4 dias. Barras são médias \pm SE ($n=15$ plantas vindas de 5 repetições com 3 plantas cada). Tratamentos seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=-N,-ar,4d 5=-N,-ar,2d→-N,+ar,2d 9=-N,-ar,2d→ V,-N,2d
 2=-N,+ar,4d 6=-N,+ar,2d→-N,-ar,2d 10=-N,+ar,2d→ V,-N,2d
 3=+N,-ar,4d 7=+N,-ar,2d→+N,+ar,2d 11=+N,-ar,2d→ V,+N,2d
 4=+N,+ar,4d 8=+N,+ar,2d→+N,-ar,2d 12=+N,+ar,2d→ V,+N,2d
 13= V,-N,4d 14= V,+N,4d

onde: -N= solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5mM NO_3^- ; +ar= borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; -ar= sem borbulhamento da solução nutritiva; V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; → = mudança para condição seguinte. Análise estatística realizada considerando-se apenas os tratamentos em que foi detectado NO_3^- .

Tabela 45. Composição (mol%) de aminoácidos livres (AA) dos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas durante 43 dias em vermiculita, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos pelo período de quatro dias.

AA	TRATAMENTO													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ASN	26,14	30,76	28,26	61,92	41,28	25,66	60,28	27,97	63,40	46,24	54,23	64,18	57,98	80,06
GLN	*	6,03	10,69	6,90	9,46	*	7,69	2,23	17,61	11,07	11,99	11,40	20,53	8,83
ASP	15,70	51,62	10,78	22,07	28,42	3,89	17,57	2,99	2,67	30,75	5,06	20,08	6,91	11,11
SER	11,10	3,44	14,65	*	3,78	12,29	2,22	14,70	2,91	*	4,79	*	3,28	*
ALA	8,24	*	11,89	*	*	18,47	*	38,18	*	*	*	*	*	*
GABA	8,34	3,47	3,91	*	2,76	4,12	*	3,62	2,33	3,25	3,66	*	2,50	*
VAL	6,86	2,29	3,89	4,05	3,98	6,91	3,58	3,19	2,63	2,34	6,05	4,34	*	*
GLU	8,52	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
THR	3,68	2,39	3,65	2,09	2,29	4,52	2,45	2,78	2,65	2,65	3,25	*	2,67	*
ARG	2,19	*	3,00	*	1,62	2,35	*	*	2,31	*	2,16	*	2,50	*
ILE	4,39	*	2,37	*	2,13	5,15	1,48	1,78	*	*	2,54	*	*	*
LEU	4,84	*	2,97	*	1,53	6,01	1,86	2,56	*	*	1,79	*	*	*
HIS	*	*	2,66	2,97	2,75	3,06	2,87	*	3,49	3,70	4,48	*	3,63	*
PHE	*	*	1,28	*	*	3,01	*	*	*	*	*	*	*	*
TYR	*	*	*	*	*	2,62	*	*	*	*	*	*	*	*
MET	*	*	*	*	*	1,94	*	*	*	*	*	*	*	*
LYS	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*Aminoácidos presentes nas amostras, porém, apresentando valores mol % inferiores a 0,80%.

1=-N,-ar,4d 5=-N,-ar,2d→-N,+ar,2d 9=-N,-ar,2d→ V,-N,2d 13= V,-N,4d

2=-N,+ar,4d 6=-N,+ar,2d→-N,-ar,2d 10=-N,+ar,2d→ V,-N,2d 14= V,+N,4d

3=+N,-ar,4d 7=+N,-ar,2d→+N,+ar,2d 11=+N,-ar,2d→ V,+N,2d

4=+N,+ar,4d 8=+N,+ar,2d→+N,-ar,2d 12=+N,+ar,2d→ V,+N,2d

onde: -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO₃⁻; +ar=borbulhamento da

solução nutritiva com ar comprimido; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva;

V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; → = mudança para

condição seguinte.

Em experimento semelhante, plantas de soja foram inoculadas e cultivadas em vermiculita, recebendo solução nutritiva -N durante 65 dias, até o início do desenvolvimento das sementes (estádio R5). Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos de hidroponia (com ou sem aeração) e/ou de NO_3^- , pelo período de 4 dias, quando procedeu-se a coleta dos nódulos. O objetivo foi de avaliar o efeito da exposição de plantas adultas noduladas à hidroponia (com e sem borbulhamento de ar) e/ou NO_3^- , nos teores de Lb e de proteína solúvel total dos nódulos, além da recuperação após a suspensão do tratamento de estresse.

Os teores de Lb e de proteína solúvel total estão apresentados, respectivamente, nas figuras 17 e 18. Nódulos de plantas em hidroponia + NO_3^- sem aeração durante 4 dias (figura 17-t3), foram aqueles que apresentaram menores teores de Lb. A transferência de plantas para a vermiculita, após 2 dias em hidroponia + NO_3^- sem aeração, promoveu aumento muito pequeno no teor de Lb dos nódulos (figura 17-t7,t9).

O teor de proteína solúvel total dos nódulos (figura 18) dentro de cada tratamento, foi aproximadamente um reflexo do teor de Lb, embora esta, nesse experimento, tenha correspondido à apenas 44% da proteína total do nódulo (os teores médios de Lb e proteína solúvel total foram, respectivamente, 4,77 e 10,94mg/g de nódulo fresco).

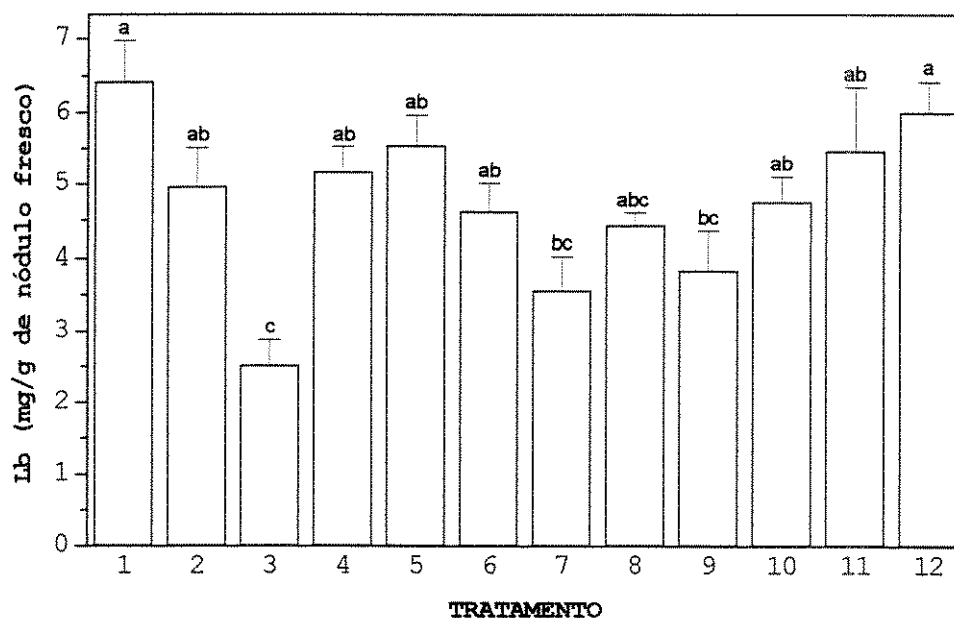


Figura 17. Teor de Lb em nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 65 dias, até a frutificação (estádio R5), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, durante 4 dias. Barras são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições com 3 plantas cada). Foram realizadas 3 extrações para cada repetição, utilizando 0,5g de nódulos/repetição/extração. Tratamentos assinalados com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=-N,-ar,4d	5=-N,-ar,2d \rightarrow V,-N,2d	9=+N,-ar,2d \rightarrow V,+N,2d
2=-N,+ar,4d	6=-N,+ar,2d \rightarrow V,-N,2d	10=+N,+ar,2d \rightarrow V,+N,2d
3=+N,-ar,4d	7=+N,-ar,2d \rightarrow V,-N,2d	11=V,-N,4d
4=+N,+ar,4d	8=+N,+ar,2d \rightarrow V,-N,2d	12=V,+N,4d

onde:-N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO_3^- ; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva; V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; \rightarrow = mudança para condição seguinte.

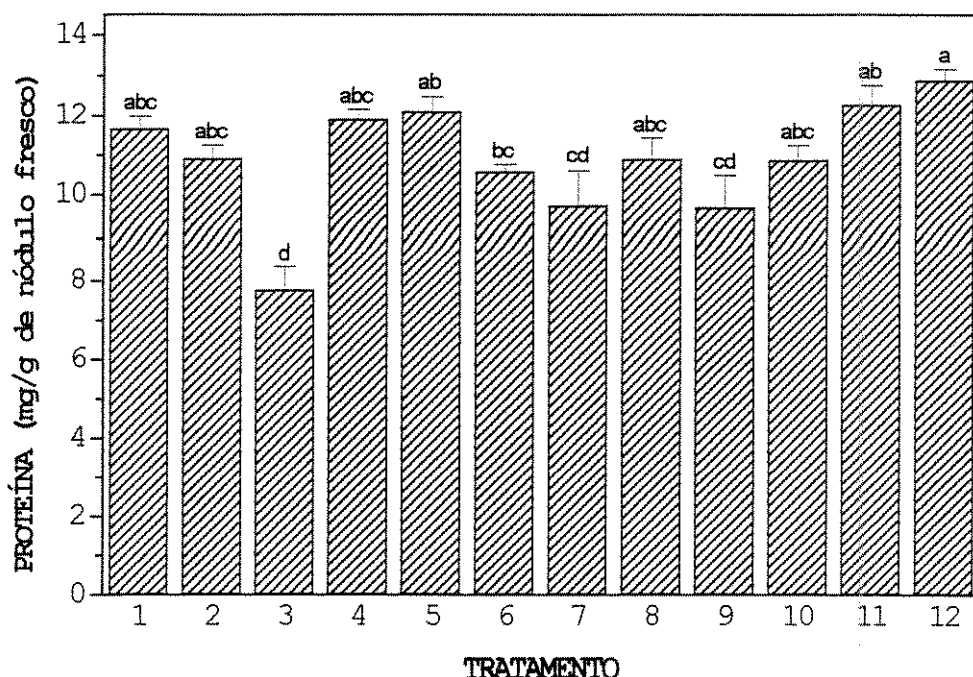


Figura 18. Teor de proteína solúvel total em nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 65 dias, até a frutificação (estádio R5), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, durante 4 dias. Barras são médias \pm SE (n=12 plantas vindas de 4 repetições com 3 plantas cada). Foram realizadas 3 extrações para cada repetição utilizando 0,5 g de nódulos/repetição/extração. Dosagem realizada em extrato obtido da extração com solução de Drabkin's para dosagem de Lb. Tratamentos assinalados com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=-N,-ar,4d	5=-N,-ar,2d \rightarrow V,-N,2d	9=+N,-ar,2d \rightarrow V,+N,2d
2=-N,+ar,4d	6=-N,+ar,2d \rightarrow V,-N,2d	10=+N,+ar,2d \rightarrow V,+N,2d
3=+N,-ar,4d	7=+N,-ar,2d \rightarrow V,-N,2d	11=V,-N,4d
4=+N,+ar,4d	8=+N,+ar,2d \rightarrow V,-N,2d	12=V,+N,4d

onde: -N= solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5mM de NO_3^- ; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; -ar = sem aeração da solução nutritiva; V=vermiculita; d=número de dias em que as plantas receberam o tratamento; \rightarrow = mudança para condição seguinte.

4.5.3. Hidroponia com ou sem NO_3^- e com Borbulhamento com Ar, com N_2 ou Anoxia:

Foi conduzido um experimento no sistema de transferência de plantas (vermiculita→hidroponia), com o objetivo de avaliar o efeito da exposição de plantas adultas noduladas ao estresse de O_2 (hidroponia com borbulhamento de ar, com borbulhamento de N_2 ou sem borbulhamento) e/ou de NO_3^- , na atividade fixadora de N_2 , atividade de asparaginase, e nos teores de Lb e de proteína solúvel total dos nódulos.

Plantas de soja foram inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 51 dias até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período foram submetidas à hidroponia, com ou sem NO_3^- , recebendo borbulhamento da solução com ar comprimido (hipoxia), ou com N_2 (anoxia total) ou sem borbulhamento (anoxia parcial), durante 5 dias, quando procedeu-se a coleta dos exsudatos e dos nódulos.

Nos exsudatos foram dosados ureídeos totais (figura 19), aminoácidos livres totais (figura 20) e a composição mol% dos aminoácidos (tabela 46). Nos nódulos foram dosadas, atividade de asparaginase e teor de proteína solúvel total (tabela 47), e teores de Lb e de proteína solúvel total (figura 21A e 21B).

Nódulos de plantas submetidas à hidroponia tiveram a atividade fixadora de N_2 fortemente inibida (figura 19). O efeito inibitório da hidroponia foi tão acentuado que mascarou o efeito inibitório do NO_3^- , sendo esse observado quase que somente em plantas em vermiculita (tratamento 8). Os resultados

obtidos na figura 19, nos dá um indicativo de que o fator limitante à atividade fixadora do nódulo em hidroponia seja a baixa pressão parcial de O_2 provocada pelo sistema, uma vez que, numericamente, menores valores para ureídeos totais foram observados nos tratamentos de anoxia total (tratamentos 3 e 4). Podemos sugerir que, em hidroponia, mesmo sob aeração constante, os nódulos estariam sob uma hipoxia parcial, daí os valores de ureídeos obtidos em plantas sob hidroponia sempre terem sido mais baixos daqueles obtidos de plantas em vermiculita.

Quanto aos aminoácidos livres totais (figura 20), esses não apresentaram resposta nítida aos tratamentos a que foram submetidas as plantas. De maneira geral, observou-se menores teores de aminoácidos livres totais nos tratamentos de hidroponia; todavia hidroponia $+NO_3^-$, com anoxia total (tratamento 4) ou com anoxia parcial (tratamento 6), apresentou os mais elevados teores de aminoácidos livres totais.

Já a composição mol% de aminoácidos livres (tabela 46) apresentou grandes alterações em resposta aos tratamentos de estresse. Em plantas em hidroponia $-N$ com aeração, observou-se um aumento muito grande de aspartato e diminuição de asparagina. Por outro lado, NO_3^- em aerobiose (vermiculita ou em hidroponia com aeração), aumentou grandemente asparagina e diminuiu glutamina. Plantas cujo sistema radicular foi submetido à tratamentos de restrição de O_2 (hidroponia com borbulhamento de N_2 e hidroponia sem borbulhamento),

independentemente da presença de NO_3^- , apresentaram nos exsudatos do xilema um aumento muito grande dos aminoácidos alanina e serina, seguidos da valina, isoleucina, leucina e gaba(?), e diminuição acentuada de asparagina, aspartato e glutamina (tabela 46).

Na tabela 47 são apresentados os valores da atividade de asparaginase e os teores de proteína solúvel total no extrato dessalinizado. Nódulos de plantas submetidas ao estresse de O_2 (borbulhamento com N_2 ou sem borbulhamento), apresentaram atividade de asparaginase mais elevada. Esses resultados estão, em parte, coerentes com os valores da composição mol% de aminoácidos (tabela 46), onde a participação de asparagina apresentou queda nesses tratamentos, todavia, o teor de aspartato também apresentou queda, dificultando o entendimento da participação de asparaginase no processo. Observa-se que os teores de proteína total dos tratamentos apresentaram valores bem próximos, indicando que a variação da atividade de asparaginase entre os tratamentos não foi devida à ineficiência do processo de extração.

O teor de Lb dos nódulos (figura 21A) não foi afetado de maneira uniforme pelos tratamentos, o mesmo acontecendo com proteína total (figura 21B). Comparados ao controle (vermiculita -N), menores teores de Lb foram observados em nódulos de plantas submetidas à hidroponia -N com ar (figura 21A-t1) e anoxia parcial $+\text{NO}_3^-$ (figura 21A-t6). Nesse experimento, Lb e proteína solúvel total variaram

proporcionalmente dentro dos tratamentos. Em termos médios, Lb (7,64mg/g de nódulo fresco) correspondeu a aproximadamente 57% da proteína solúvel total (13,48mg/g de nódulo fresco).

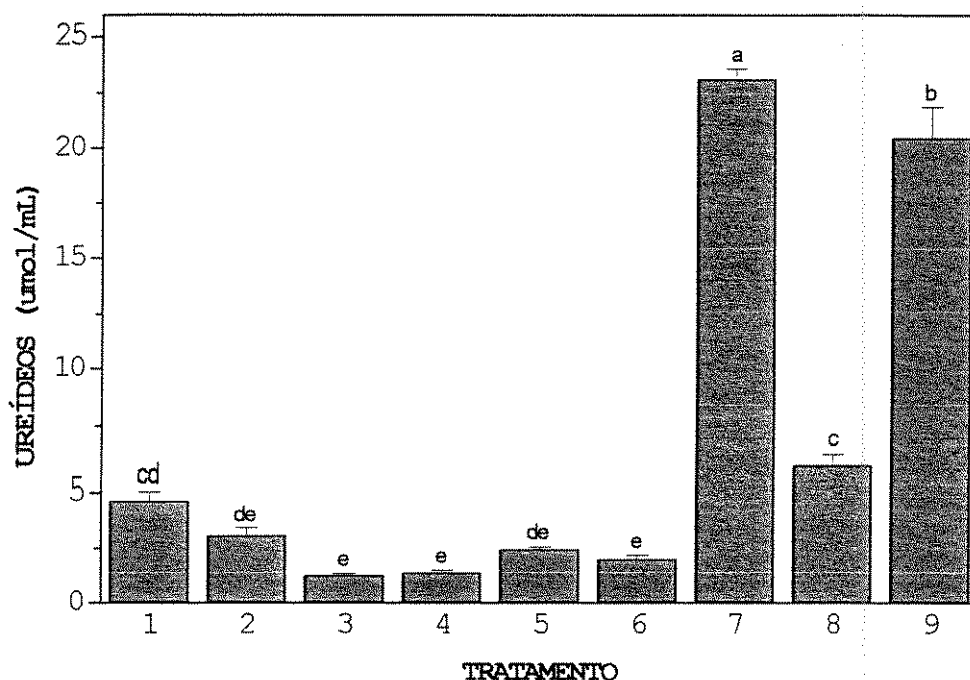


Figura 19. Teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 51 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, pelo período de 5 dias. Barras são médias \pm SE (n=18 plantas vindas de 6 repetições com 3 plantas cada). Tratamentos assinalados com mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=H,-N,+ar 3=H,-N,+N₂ 5=H,-N,-ar 7=V,-N 9=V,-N,dia zero

2=H,+N,+ar 4=H,+N,+N₂ 6=H,+N,-ar 8=V,+N

onde: H=hidroponia; V=vermiculita; -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO₃⁻; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; +N₂=borbulhamento da solução nutritiva com gás N₂; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva.

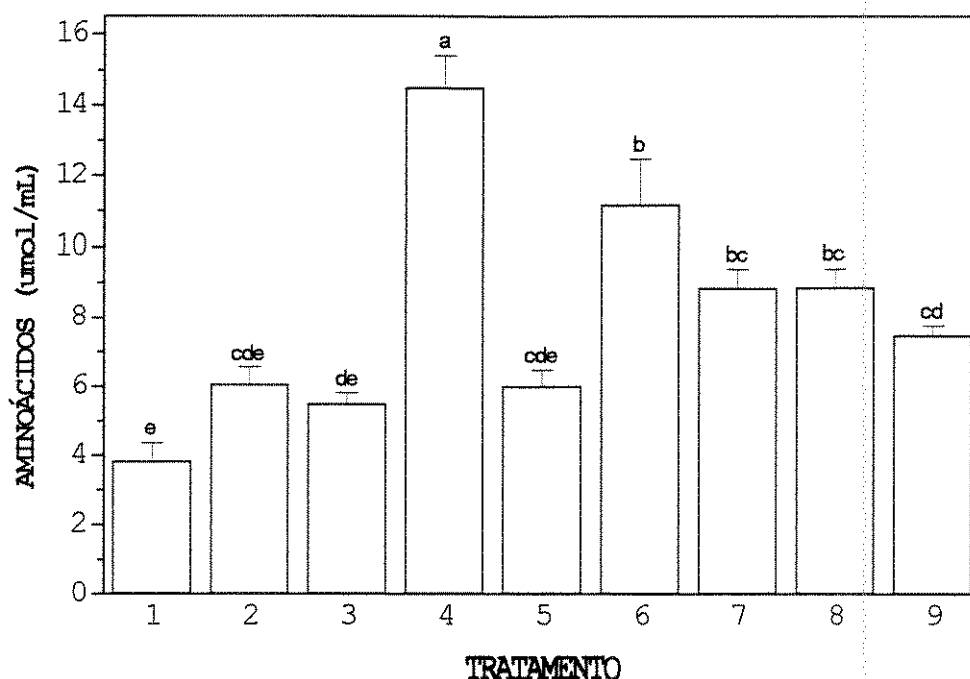


Figura 20. Teor de aminoácidos totais nos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 51 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo, pelo período de 5 dias. Barras são médias \pm SE (n=18 plantas vindas de 6 repetições com 3 plantas cada). Tratamentos assinalados com mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1=H,-N,+ar 3=H,-N,+N₂ 5=H,-N,-ar 7=V,-N 9=V,-N,dia zero
 2=H,+N,+ar 4=H,+N,+N₂ 6=H,+N,-ar 8=V,+N

onde: H=hidroponia; V=vermiculita; -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO₃⁻; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; +N₂=borbulhamento da solução nutritiva com gás N₂; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva.

Tabela 46. Composição(mol%) de aminoácidos livres (AA) dos exsudatos do xilema de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas durante 51 dias em vermiculita, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo pelo período de cinco dias.

AA	H + AR		H + N ₂		H - AR		V		VDZ
	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	
ASN	27,72	64,84	26,94	24,26	34,91	38,35	58,95	73,00	58,45
GLN	6,74	5,23	*	*	4,44	4,24	17,83	9,99	17,92
ASP	44,68	17,68	1,74	1,61	3,72	4,17	5,60	8,24	7,29
ALA	1,65	*	25,58	34,11	18,31	19,90	*	*	*
SER	3,90	*	11,46	14,91	11,46	12,35	3,02	*	3,27
HIS	2,55	2,69	1,98	2,08	2,20	2,26	3,82	3,57	4,02
THR	2,75	2,29	4,20	4,05	3,96	3,80	3,93	2,59	3,48
ARG	2,66	1,46	1,70	*	2,28	2,23	3,83	2,61	3,27
GABA(?)	2,09	*	4,22	2,75	3,82	3,46	1,99	*	2,30
VAL	2,33	3,43	6,63	5,94	5,92	4,10	1,03	*	*
ILE	1,23	1,27	4,75	4,18	4,17	2,74	*	*	*
LEU	*	1,11	4,59	4,50	3,38	2,40	*	*	*
GLU	1,70	*	1,21	*	*	*	*	*	*
PHE	*	*	1,59	1,61	1,43	*	*	*	*
TYR	*	*	1,00	*	*	*	*	*	*
MET	*	*	1,01	*	*	*	*	*	*
GLY	*	*	1,40	*	*	*	*	*	*
LYS	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*Aminoácidos presentes na amostra, porém, apresentando valor mol% inferior a 1%. H=hidroponia; V=vermiculita; -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO₃⁻; +AR=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; +N₂=borbulhamento da solução nutritiva com gás N₂; -AR=sem borbulhamento da solução nutritiva; V 0=vermiculita dia zero.

Tabela 47. Atividade de asparaginase e teor de proteína solúvel total apresentado por extratos de nódulos após passagem pela coluna de Sephadex G-25. Plantas de soja, cv Santa Rosa, foram inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 51 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos, de acordo com a tabela, durante 5 dias.

H/ V	Borbulha mento	SN	Asparaginase (nmolNH ₄ ⁺ /gNóduloFresco/h)	Proteína (mg/gNóduloFresco)
H	+AR	-N	698,47	14,33
		+N	193,81	13,34
H	+N ₂	-N	1978,17	16,37
		+N	2605,64	16,44
H	-AR	-N	3277,02	16,78
		+N	7833,47	14,74
V		-N	512,46	16,78
		+N	983,73	16,37
V0		-N	134,84	14,15

Valores correspondem a média de 2 extrações. Em cada extração utilizou-se amostra composta por 6,0 g de nódulos frescos advindos de 6 repetições (vasos) com 3 plantas cada. Coletou-se 1,0 g de nódulos/repetição para formar a amostra composta. H=hidroponia; V=vermiculita; V 0=vermiculita dia zero; SN= solução nutritiva; -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5,0 mM de NO₃⁻.

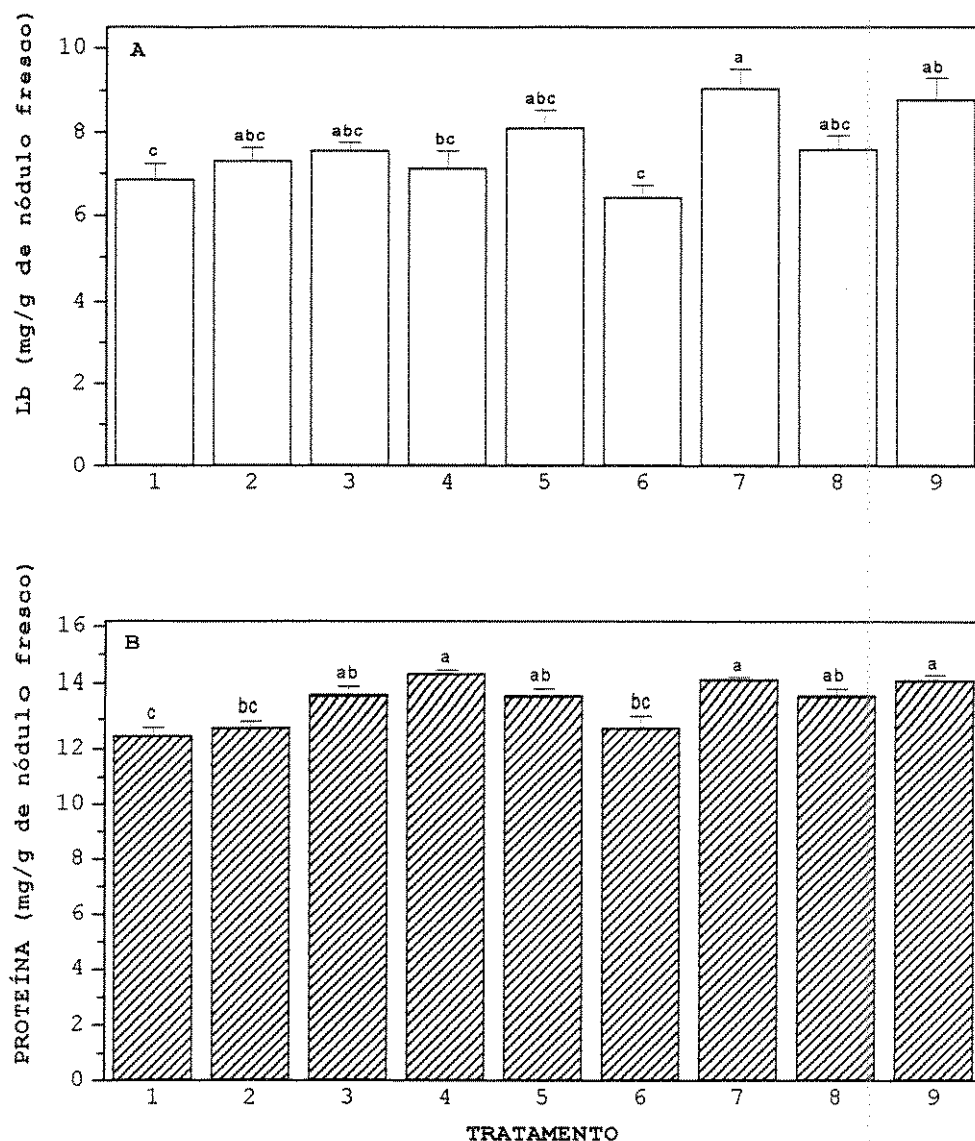


Figura 21. Teores de Lb (A) e de proteína total (B) em nódulos de plantas de soja, cv. Santa Rosa, inoculadas e cultivadas em vermiculita durante 51 dias, até a frutificação (estádio R3), recebendo solução nutritiva -N. Após esse período, as plantas foram submetidas aos tratamentos abaixo por 5 dias. Barras são médias \pm SE (n=18 plantas vindas de 6 repetições com 3 plantas cada). Foram realizadas 2 extrações para cada repetição, utilizando 0,5 g de nódulos/repetição/extração. Tratamentos assinalados com mesma letra, dentro de cada característica, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

1=H,-N,+ar 3=H,-N,+N₂ 5=H,-N,-ar 7=V,-N 9=V,-N,dia zero

2=H,+N,+ar 4=H,+N,+N₂ 6=H,+N,-ar 8=V,+N

onde: H=hidroponia; V=vermiculita; -N=solução nutritiva -N; +N=solução nutritiva com 5 mM de NO₃⁻; +ar=borbulhamento da solução nutritiva com ar comprimido; +N₂=borbulhamento da solução nutritiva com gás N₂; -ar=sem borbulhamento da solução nutritiva.

5.DISSCUSSÃO

5.1. VARIAÇÃO DIURNA NA COMPOSIÇÃO DE SOLUTOS NITROGENADOS NO XILEMA DE PLANTAS ADULTAS E NODULADAS:

Variações diurnas no transporte de N fixado ocorrem em plantas intactas e são devidas a variações na taxa de transpiração (MINCHIN & PATE, 1974; HOCKING et al., 1978; McCLURE et al., 1980; RAINBIRD et al., 1983). Em plantas transportadoras de ureídeos, como soja (McCLURE et al., 1980) e cowpea (RAINBIRD et al., 1983), a concentração de N na seiva do xilema permanece baixa durante o dia, mas à noite a concentração aumenta grandemente até a manhã seguinte, quando se inicia o processo de transpiração, e novamente o N é diluído. Como ureídeos são responsáveis pela grande parcela do N na seiva do xilema de plantas de soja noduladas (McCLURE & ISRAEL, 1979; STREETER, 1979; McCLURE et al., 1980; PATE et al., 1980), a curva obtida para ureídeos (figura 1), declinando no período da manhã e com ascendência no período da tarde, estaria relacionada à variação na transpiração. Uma vez que a massa nodular não diferiu entre as horas de coleta (tabela 1), a variação no teor de ureídeos observada ao longo do dia, assim como da eficiência nodular (figura 1), provavelmente foram devidas a variação da concentração dos ureídeos presentes nos exsudatos do xilema, a qual variou em função da transpiração.

A variação diurna da composição de aminoácidos livres (mol %) nos exsudatos do xilema separados por HPLC (tabela 2),

mostra que, para plantas noduladas e cultivadas em vermiculita e fixando ativamente N_2 , asparagina, seguida de glutamina e de ácido aspártico, são os três aminoácidos presentes nos exsudatos do xilema, e que praticamente predominam em todas as horas de coleta. A maior amplitude na distribuição entre os aminoácidos, nas coletas de 10:00 e de 12:00 ocorreu coincidentemente com o maior fluxo de exsudatos e com a diminuição na proporção de ácido aspártico. Torna-se difícil explicar a diminuição da participação de aspartato nas coletas de 10:00 e de 12:00. Poder-se-ia especular que, em razão de ocorrer concomitante à diminuição de aspartato aumento de serina, o N vindo da fixação de N_2 , via assimilação da amônia pela GS/GOGAT (SCHUBERT, 1986), poderia estar sendo desviado para a biossíntese de ureídeos, formando serina, um precursor da síntese de purinas (SCHUBERT, 1986; NEVES & HUNGRIA, 1987). A concentração de ureídeos realmente apresenta acréscimos nas coletas seguintes de exsudatos (figura 1), todavia a participação de aspartato também aumentou nas duas coletas seguintes (tabela 2), dificultando essa interpretação.

Chama a atenção a presença de GABA(?) nas três primeiras horas de coleta, especialmente na coleta de 8:00. Nódulos de leguminosas acumulam relativamente altas concentrações de GABA (VANCE & HEICKEL, 1991), podendo chegar, em algumas espécies, a mais de 20% do conteúdo total de N no órgão (LARHER et al., 1983), o que é difícil de explicar uma vez que o GABA não é usualmente incorporado em proteína (VANCE & HEICKEL, 1991). Em

nódulos, têm sido atribuídas duas funções ao GABA: uma sugere que a síntese de GABA proporciona uma rota alternativa para a biossíntese de succinato como resultado da limitação da α -cetoglutarato desidrogenase (KAHN et al., 1985, citado por DAY & COPELAND, 1991 e VANCE & HEICKEL, 1991), e outra, o envolvimento de GABA na regulação do pH citoplasmático sob condições de microanaerobiose ou de anaerobiose (STREETER & THOMPSON, 1972). Assumindo que HCO_3^- funciona como substrato para a PEPC (Fosfoenolpiruvato carboxilase) na fixação escura de CO_2 em nódulos, a acidez resultante do excesso de H^+ produzido durante a hidratação de CO_2 pode ser tóxica para a célula do hospedeiro. Assim, o GABA derivado pela α -descarboxilação do glutamato poderia ser um significativo dreno para o H^+ (VANCE & HEICHEL, 1991). Como nesse experimento as plantas não foram submetidas a nenhum tipo de anaerobiose, é mais provável que a primeira hipótese tenha ocorrido em função de uma limitação temporária da atividade da α -cetoglutarato desidrogenase.

5.2. NODULAÇÃO, CRESCIMENTO DE PLANTAS E FIXAÇÃO DE N_2 :

Efeito de NO_3^- no crescimento de plantas, na nodulação e na fixação de N_2 :

O estímulo de NO_3^- ao crescimento de plantas de soja (parte aérea e raiz) inoculadas e cultivadas em hidroponia até a frutificação (tabelas 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 16, 18 e 21), concomitantemente à inibição da nodulação (nódulos/planta) (tabela 7 e figuras 3, 4, 5, 7 e 9A) e diminuição da massa de nódulos/planta (tabelas 7, 12, 15, 17, 19 e 22), demonstra que NO_3^- exerce papel proeminente e decisivo na associação simbiótica *Bradyrhizobium*-soja, atuando ao mesmo tempo, quando acima de determinada concentração, como estimulador do crescimento de plantas e como potente inibidor da nodulação.

Dentre os nutrientes minerais, o N combinado é que exerce maior influência na associação simbiótica, inibindo a nodulação e decrescendo a massa nodular, quando presente acima de determinadas concentrações (DIXON & WHEELER, 1986; STREETER, 1988). Plantas supridas adequadamente com N combinado apresentam, normalmente, maior crescimento comparado com plantas somente confiadas ao N da fixação; uma possível razão seria o maior requerimento de energia para a nodulação e fixação de N_2 , comparado com o requerimento de energia para a assimilação de N combinado (DIXON & WHEELER, 1986). De acordo com REILLY (1990), NO_3^- disponível promove na planta proliferação vegetativa e aumento de biomassa. Além disso, NO_3^- exerce um amplo papel regulatório no crescimento e não somente

a simples provisão de substrato para a assimilação em componentes nitrogenados da planta (TREWAVAS, 1981, 1983, citado por REILLY, 1990).

NO_3^- afeta vários eventos relacionados à nodulação, incluindo inibição da deformação do pêlo radicular (TRUCHET & DAZZO, 1982), inibição da iniciação da infecção e divisão das células corticais (MALIK *et al.*, 1987), redução do número e distribuição dos sítios de ligação de lectinas recém-sintetizadas (SHERWOOD *et al.*, 1984), inibição da formação do cordão de infecção (MUNNS, 1968; MALIK *et al.*, 1987) e aumento do número de infecções abortadas (MUNNS, 1977, citado por STREETER, 1988). No presente trabalho, NO_3^- pode ter atuado afetando um ou mais desses passos.

Plantas inoculadas e cultivadas em vermiculita + NO_3^- até a frutificação (estádio R4), apresentaram crescimento (parte aérea e raiz) semelhante ao de plantas que não receberam NO_3^- (tabela 8); a inibição da nodulação (nódulos/planta) pelo NO_3^- foi mínima, mesmo à concentração de 5,0 mM de NO_3^- (figura 2) e a massa de nódulos não foi alterada pelo NO_3^- (tabela 9). Todavia, concentrações semelhantes de NO_3^- tiveram efeitos muito mais drásticos sobre a nodulação quando em hidroponia (tabelas 7, 12, 15, 17, 19 e 22 e figuras 3, 4, 5, 7 e 9A), confirmando observações de RALSTON & IMSANDE (1983), de que a resposta de nódulos de leguminosas ao N combinado é muito mais pronunciada em plantas cultivadas em hidroponia do que em substrato sólido. Parece que a vermiculita funciona mascarando o efeito

inibitório de NO_3^- . Uma possível explicação para o menor efeito inibitório de NO_3^- em vermiculita seria o menor contato direto entre NO_3^- e raiz e/ou nódulo, uma vez que, diferentemente da hidroponia, onde estas estruturas estão em tempo permanente expostas ao NO_3^- da solução nutritiva, em vermiculita parte do NO_3^- estaria retido pelos grânulos da argila e parte poderia ter sido perdida por lixiviação em razão da alta CTC (Capacidade de Troca Catiônica) da argila e da carga negativa do NO_3^- ; além disso, como a absorção de N pelas plantas depende exclusivamente do fluxo de massa (MALAVOLTA, 1980), essa é muito mais intensificada em hidroponia do que em meio sólido. Esses fatores, de certa forma, funcionariam como atenuadores da concentração de NO_3^- à qual as raízes e nódulos estariam expostos, indo de encontro às colocações de HINSON (1975) e EAGLESHAM (1989), de que o efeito de NO_3^- na nodulação é um mecanismo predominantemente "raiz-localizado" e não ligado ao status de N na "planta-toda". Além disso, a excelente nodulação obtida em plantas controle -N (figura 2), permitiu o crescimento normal dessas plantas não diferindo daquelas supridas com NO_3^- .

Por outro lado, NO_3^- em concentrações mais baixas, por exemplo a 1,5 mM, até estimulou a nodulação e a massa de nódulos em plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia (figura 5 e tabela 17). A explicação seria de que o N combinado é extremamente importante na fase inicial da associação simbiótica, quando as reservas cotiledonares estão se exaurindo

e os nódulos não estão fixando ativamente (PEAT et al., 1981B; OBATON et al., 1982, citado por DREVON et al., 1988B; BECANA & SPRENT, 1987). Nessa fase, o N combinado, quando em nível adequado, pode resultar em aumento da nodulação e da massa nodular (DAS, 1982; EAGLESHAM et al., 1983; TANAKA et al., 1985), em função de proporcionar maior vigor das plantas (MAHON & CHILD, 1979).

Embora citado que o NO_3^- (>2 mM) inibe o crescimento do nódulo (STREETER, 1981; EARDLY et al., 1984, citado por STREETER, 1988; SODEK & SILVA, 1996), no presente trabalho, nódulos formados em plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia ou em vermiculita, até a frutificação (estádio R4), na presença de NO_3^- (tabelas 7, 9, 12, 17 e 19), nem sempre apresentaram massa específica menores. De acordo com STREETER, (1988), o declínio em tamanho de nódulo, em resposta ao NO_3^- , pode ser explicado pelo decréscimo no tamanho das células, já que o número de células não varia. THORNTON & RUDORF (1936), citado por STREETER (1988), observaram que a inibição do crescimento do nódulo em plantas crescidas na presença de NO_3^- era acompanhada por alterações na estrutura do nódulo, os quais apresentaram um espeçamento da endoderme. No nosso trabalho, apesar da inibição do crescimento do nódulo (massa específica de nódulo) pela exposição ao NO_3^- , não ter sido significativa em todos os experimentos, observamos que, especialmente quando em hidroponia, os nódulos expostos ao NO_3^- ficaram com a superfície externa áspera ao tato, com ausência total de lenticelas, que é

uma característica típica de nódulos expostos ao alagamento, conforme observado por PANKHUST & SPRENT (1975B).

Nos experimentos nos quais avaliou-se o efeito de AIA (tabelas 15 e 22), a massa específica de nódulo (massa fresca e de massa seca) foi aumentada mais de duas vezes na presença de NO_3^- , porém sem efeito aparente de AIA. Torna-se difícil explicar esse aumento, uma vez que ocorreu somente em resposta ao NO_3^- , independente de AIA, e somente nesses dois experimentos.

Plantas adultas noduladas, não apresentaram ganho de massa (parte aérea e raiz) significativo ao serem expostos ao NO_3^- durante 7 dias, após terem sido inoculadas e cultivadas até a frutificação (estádio R3) em vermiculita (tabela 24) ou em hidroponia (tabelas 27, 30 e 33) recebendo solução -N. Isso sugere que, uma vez completada a fase de crescimento vegetativo, a expressão de N no ganho de massa da planta é diminuída. Além disso, o período de apenas 7 dias (equivaleria à passagem do estágio R3 para R4) representa pouco em termos de ganho de massa, comparado a todo um período de crescimento vegetativo como analisado no tópico anterior.

Plantas adultas, inoculadas e cultivadas em hidroponia, quando expostas ao NO_3^- durante 7 dias não tiveram afetada a nodulação (tabelas 28, 31 e 35), massa nodular nem a massa específica de nódulo (tabelas 28, 31 e 34). Todavia plantas inoculadas e cultivadas em vermiculita tiveram a nodulação e a massa de nódulos inibidas pela exposição ao NO_3^- durante 7 dias,

enquanto que a massa específica de nódulo não foi alterada (tabela 25). É possível que, em vermiculita, NO_3^- tenha inibido o crescimento de uma população de nódulos pequenos que não puderam ser contados, além de ter inibido o crescimento dos nódulos já formados, não alterando, dessa forma, a massa específica de nódulo. Esses resultados evidenciam que no sistema de cultivo em vermiculita, na ausência de NO_3^- , novas infecções podem ir ocorrendo e se desenvolvendo em nódulos, conforme verificado por PEAT et al. (1981), fato que não ocorre em plantas em hidroponia, sugerindo que hidroponia por si, já é um fator limitante ao processo de nodulação. Evidência a esse respeito é que, em geral, nos experimentos em vermiculita sempre foram observadas maiores nodulações.

Plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia até a frutificação (estádio R3) e permanentemente expostas ao NO_3^- , mesmo quando fracamente (figura 7), razoavelmente (figura 9A) ou bem noduladas (figura 5), tiveram a atividade fixadora de N_2 (medida pelo teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema) fortemente inibida (figuras 6A, 8A e 9B), enquanto que, concomitantemente o teor de NO_3^- apresentou grande aumento nos exsudatos do xilema (figuras 6C, 8C e 9D). Isso sugere que na associação simbiótica, nesta cv. de soja, a atividade do nódulo é mais sensível ao efeito inibitório de NO_3^- do que a própria nodulação, confirmando STREETER (1988). Como visto, o N combinado, quando em nível adequado, pode resultar em aumento da nodulação e da massa nodular (DAS, 1982; EAGLESHAM et al.,

1983; TANAKA *et al.*, 1985), em função de proporcionar maior vigor das plantas (MAHON & CHILD, 1978); porém, uma vez o nódulo estando apto a iniciar o processo da fixação, continuando exposto ao N combinado, a associação simbiótica deixa de existir (OGHOGHORIE & PATE, 1971; STREETER, 1988).

NO_3^- também demonstrou ser um potente inibidor da atividade fixadora de N_2 em plantas adultas. Assim, quando plantas adultas noduladas foram submetidas ao NO_3^- durante sete dias, após terem sido inoculadas e cultivadas até a frutificação (estádio R3) em vermiculita ou em hidroponia com solução -N, apresentaram diminuição de ureídeos e aumento de NO_3^- nos exsudatos do xilema (tabelas 26, 29, 32 e 36). Isso evidencia que ao ser suprida com N combinado a planta nodulada substitui a fixação de N_2 pelo N combinado (OGHOGHORIE & PATE, 1971). Todavia, a quantidade total de N acumulado não é modificada, uma vez que esta é ajustada à capacidade de crescimento da planta (WERY *et al.*, 1986). Além disso, conforme observado por vários pesquisadores (MATSUMOTO *et al.*, 1977; PATE *et al.*, 1979, 1980; PATERSON & LARUE, 1983; MCNEIL & LARUE, 1984), a presença de N inorgânico no meio radicular decresce a proporção relativa de N orgânico na seiva do xilema, ocorrendo ainda, decréscimo na relação ureídeos/amidas. A razão para essa "escolha" é incerta, mas parece estar ligada à economia de energia, uma vez que, em termos globais, mais energia é requerida para fixar N_2 do que para utilizar NO_3^- (BECANA & SPRENT, 1987).

Várias hipóteses têm sido criadas na tentativa de explicar o(s) mecanismo(s) inibitório de NO_3^- na atividade de fixação de N_2 . Atualmente três hipóteses são consideradas como principais: limitação de carboidratos para a atividade do nódulo; inibição pelos produtos do metabolismo de NO_3^- no nódulo; e ultimamente, a limitação de O_2 , para o nódulo, em função de uma barreira à difusão de O_2 , no nódulo, formada em resposta ao NO_3^- (BECANA & SPRENT, 1987; DREVON *et al.*, 1988A; STREETER, 1988; BECANA *et al.*, 1989; HUNT & LAYZEL, 1993). Porém, essas hipóteses ainda não são conclusivas.

O teor de aminoácidos livres totais nos exsudatos do xilema demonstrou não ser muito influenciado pela presença de NO_3^- . Assim, plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia até a frutificação na presença de NO_3^- , apresentaram pequena redução no teor de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema (figuras 6B e 9C) ou esse ficou praticamente estável (figura 8B), sendo as variações não proporcionais às concentrações de NO_3^- na solução. O mesmo foi verificado quando da exposição de plantas adultas noduladas ao NO_3^- durante sete dias, após terem sido inoculadas e cultivadas em vermiculita (tabela 26) ou em hidroponia (tabelas 29, 32 e 36), onde o teor de aminoácidos livres praticamente não se alterou.

Esses resultados confirmam observações de outros autores (McCLURE & ISRAL, 1979; McCLURE *et al.*, 1980; PATE *et al.*, 1980; HERRIDGE, 1982; HERRIDGE & PEOPLES, 1990; SODEK & SILVA, 1996), de que a dosagem de ureídeos nos exsudatos do xilema é

uma metodologia bastante precisa para medir, indiretamente, a atividade fixadora de N_2 do nódulo. Por outro lado a dosagem de NO_3^- nos exsudatos do xilema também é bastante precisa como indicativo da presença de N combinado no sistema radicular, enquanto que a dosagem de aminoácidos livres totais não dá indicações seguras da atividade fixadora de N_2 do nódulo, uma vez que o teor desses não se altera de maneira uniforme em resposta a tratamentos que afetam o transporte de ureídeos e de NO_3^- .

Efeito de Co, AVG e AIA no crescimento de plantas, na nodulação e na fixação de N_2 :

Além de ser importante na síntese de coenzima B_{12} pelos rizobia, a qual está envolvida na síntese de Lb (AHMED & EVANS, 1960), Co pode atuar como inibidor da biossíntese de etileno por inibir a enzima EFE (LAU & YANG, 1976; FERN & LARUE, 1991). A síntese de etileno pode ainda ser inibida por AVG, um inibidor específico da ACCsintase, enquanto que AIA participa estimulando a atividade da ACCsintase (YU & YANG, 1979; FERN & LARUE, 1991).

Aumento na liberação de etileno, em resposta à inoculação, tem sido observado em alfafa (LIGERO et al., 1986), *Vicia* (VAN WORKUM et al., 1995) e em soja (HUNTER, 1993; SAGANUMA, et al., 1995). Aplicado em *Vicia sativa* ssp. *nigra*, o AVG suprimiu o fenótipo Tsr (raízes curtas e grossas), e restaurou a nodulação (ZAAT et al., 1989). AVG também aumentou a nodulação em alfafa

(PETERS & CRIST-ESTES, 1989), em mutante *sym 5* de *Pisum sativum* cv. Sparkle (FEARN & LARUE, 1991; GUINEL & LARUE, 1991, 1992) e em *V. sativa* ssp. *nigra* inoculada com *R. leguminosarum* bv. *viciae* deficiente em exopolissacarídeo (VAN WORKUM et al., 1995). Em alfafa o AVG além de reduzir a produção de etileno estimulada pelo NO_3^- , foi hábil em restaurar a capacidade de nodulação, prevenindo a nodulação do efeito inibitório de NO_3^- (LIGERO et al., 1991), evidenciando que o efeito inibitório de NO_3^- na nodulação, em alfafa, é mediado pelo etileno. Co também foi eficiente em restaurar a nodulação em mutante *sym 5* de *P. sativum* cv. Sparkle (FERN & LARUE, 1991).

No entanto, neste trabalho Co (em plantas em hidroponia expostas ao Co até a frutificação) não foi eficaz em impedir o efeito inibitório de NO_3^- na nodulação (figuras 3 e 5), na massa de nódulos (tabelas 12 e 17) nem a atividade de fixação de N_2 (figura 6A). Co também não foi eficaz em prevenir a atividade de fixação de N_2 do efeito inibitório de NO_3^- , quando plantas adultas noduladas foram submetidas por uma semana ao Co, tanto em vermiculita quanto em hidroponia (tabelas 26 e 29).

Entretanto, plantas inoculadas e cultivadas em vermiculita expostas ao Co até a frutificação, não tiveram a massa de nódulos afetada pelo Co (tabela 9). Além disso, pequena recuperação na nodulação, pelo Co, foi observada na presença de NO_3^- (5,0 mM) (figura 2), vislumbrando a possibilidade de prevenção do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação. Contudo como esse efeito não foi confirmado em hidroponia, não pode ser

considerado muito confiável. Aumentos de massa de nódulos, conteúdo de Co, de cobalamina, de Lb e do número de bacteróides/massa de nódulo foram observados por DILWORTH et al. (1979) em *Lupinus*, em resposta à aplicação de Co em solos deficientes nesse elemento. Isso demonstra que a resposta ao Co é dependente do tipo de substrato utilizado, em que em substrato sólido (solo) o efeito negativo do Co pode não ser manifestado facilmente.

AVG, nas concentrações empregadas, não foi eficaz em prevenir as plantas do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação (figura 7), nem na atividade fixadora de N_2 do nódulo, quer em plantas expostas ao AVG até a frutificação (figura 8A) quer em plantas adultas noduladas expostas durante apenas uma semana (tabela 32), confirmando observações de SAGANUMA et al. (1995) sobre a ineficiência de AVG em controlar a nodulação em soja.

Por outro lado AIA, que atua estimulando a ACCsintase (YU & YANG, 1979), apresentou indícios de estar envolvido prevenindo a nodulação do efeito inibitório de NO_3^- quando mantido apenas nas duas primeiras semanas (figura 4), ou quando mantido até a frutificação (figura 9A). Estímulo de AIA restaurando a nodulação em soja, foi observado em mutante de *B. elkanii* deficiente neste hormônio, sugerindo fortemente que o AIA produzido por *B. elkanii* está envolvido na formação do nódulo em soja (FUKUHARA et al., 1994). Segundo esses autores, o AIA produzido por *B. elkanii* ainda poderia manter a atividade meristemática das raízes, o que seria uma forma de aumentar a

nodulação. O efeito de AIA no crescimento de plantas é bastante conhecido, principalmente por provocar o alongamento celular (hipótese do crescimento ácido). No nosso trabalho, AIA (1,0 μM) associado ao NO_3^- proporcionou pequeno estímulo (embora não discriminado pelo teste de médias) no crescimento (ganho de massa fresca e seca) de raízes (tabelas 13, 14 e 21), o que em parte também poderia ter contribuído para com o aumento da nodulação.

Também em *Vigna radiata*, AIA (1,0 μM) não somente foi eficaz em prevenir a nodulação do efeito inibitório de NO_3^- quando aplicado antes da inoculação, como também estimulou a formação de nódulos (SINGH & LODHA, 1989). Baseados na hipótese da destruição catalítica de AIA rizobiano pelo NO_2^- , os autores concluíram que o NO_3^- aumenta o requerimento de AIA ou reduz a síntese líquida de AIA rizobiano devido ao NO_2^- .

Quando mantido até a frutificação, o AIA a 100 μM , principalmente quando associado ao NO_3^- (4,0 mM), provocou inibição do crescimento longitudinal das raízes com o aparecimento do fenótipo Tsr em raízes; entretanto a nodulação não foi restaurada. O fenótipo Tsr ocorre em *V. sativa* ssp. *nigra* provocado pelo aumento na liberação de etileno em resposta à utilização de inóculo concentrado (ZAAT et al., 1989). Nesse caso, o AVG, além de restaurar a nodulação aos padrões normais, suprimiu esse fenótipo, evidenciando a participação de etileno no processo (ZAAT et al., 1989).

Segundo GOODLASS & SMITH, (1979) e ZAAT *et al.* (1989), a inibição do crescimento de raízes (fenótipo Tsr), parece ser efeito de substâncias de crescimento de plantas, particularmente de etileno, levando-os a supor que fatores da bactéria induzem a resposta de liberação de etileno pela planta e indiretamente causa o fenótipo Tsr. No nosso experimento, AIA a 100 μM pode ter estimulado a síntese de etileno provocando o surgimento desse fenótipo, uma vez ser sabido da participação de AIA na síntese de etileno (YU & YANG, 1979).

Todavia, conforme observado também por SINGH & LODHA, (1989), o AIA não foi eficaz em prevenir a atividade de fixação de N_2 da inibição pelo NO_3^- , quer em plantas expostas ao AIA até a frutificação (figura 9B), ou em plantas adultas, com nodulação pré-estabelecida, submetidas ao AIA (1,0 μM) juntamente com NO_3^- por uma semana (tabela 36). Além disso, AIA mantido até a frutificação, provocou, inclusive, acentuada diminuição na atividade fixadora de N_2 do nódulo (ureídeos) quando na ausência de NO_3^- na solução nutritiva (figura 9B). Por outro lado, AIA (1,0 μM) mantido apenas nas duas semanas iniciais, ou mesmo até a frutificação, associado ao NO_3^- apresentou pequeno estímulo (embora não significativo estatisticamente) no crescimento de plantas (tabelas 13, 14 e 21) e na massa nodular (tabelas 15 e 22).

Os resultados obtidos sugerem que o AIA poderia estar atuando diretamente no processo de nodulação, como observado por SINGH & LODHA (1989) e FUKUHARA *et al.* (1994), ou mesmo de

forma indireta, estimulando o crescimento do sistema radicular e assim favorecendo a nodulação (FUKUHARA *et al.*, 1994). O AIA poderia atuar auxiliando no estabelecimento da simbiose (processo de infecção e formação do nódulo), porém, uma vez que esse processo tenha se completado, o AIA não exerce efeito na atividade fixadora de N_2 do nódulo, conforme observado por SINGH & LODHA (1989).

Raízes noduladas de soja produzem mais etileno e contêm mais ACC do que raízes não inoculadas (HUNTER, 1993), sendo, essa produção estimulada pela inoculação e relacionada com a infecção rizobiana (SAGANUMA *et al.*, 1995). Todavia, soja é menos sensível ao etileno exógeno do que outras espécies como ervilha e trevo doce, não tendo a nodulação afetada de forma significativa por esse (LEE & LARUE, 1992). Além disso, SAGANUMA *et al.* (1995) também não observaram alteração do número de nódulos em plantas de soja em resposta ao AVG (10 μ M), e concluíram que não é claro se o etileno exerce algum efeito direto no processo da nodulação em soja, uma vez que o aumento na produção de etileno por raízes de soja inoculadas ocorre transientemente, poucos dias após a inoculação e antes dos nódulos tornarem-se visíveis. Ainda, de acordo com LEE & LARUE (1992), não há evidência direta de que o etileno endógeno esteja envolvido regulando a nodulação. Se regula o número de nódulos, esse pode atuar num estágio de desenvolvimento do nódulo que seria na passagem do cordão de infecção à partir da célula da epiderme para dentro do córtex e na iniciação do

primórdio do nódulo. Contudo, apesar das observações acima pondo em dúvida a participação direta de etileno no processo da nodulação, e de apesar de no nosso trabalho AVG não ter sido eficaz em prevenir a nodulação nem a atividade de fixação, do efeito inibitório de NO_3^- , e de em apenas uma situação Co ter sinalizado a possibilidade de prevenir as plantas do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação, a participação de etileno, mesmo que de forma indireta (via estímulo da ACCsintase por auxina), no processo da nodulação não deve ser descartada, como evidenciado pelos resultados obtidos com AIA. A estirpe de *Rhizobium* por nós utilizada no presente trabalho (SMS 463 = SEMIA 5019 = W29), inicialmente classificada como *B. japonicum*, atualmente, de acordo com BODDEY & HUNGRIA (1994), estaria enquadrada como *B. elkanii*, a qual tem como uma característica peculiar de sintetizar e excretar AIA em meio de cultura, o qual, como observado por FUKUHARA et al. (1994), está envolvido na nodulação em soja.

Co é um elemento considerado essencial para leguminosas em associação simbiótica (AHMED & EVANS, 1960). Co constitui o grupo prostético da vitamina B_{12} ocupando, o cianeto (CN), uma das posições de coordenação do átomo de Co (cianocobalamina); ao se ligar ao átomo de carbono 5' da ribose da adenosina, em substituição ao CN, forma a coenzima B_{12} (cobalamina). Nos nódulos, os rizobia necessitam de Co para sintetizar cobalamina, a qual está envolvida na reação de formação de succinil CoA (metilmalonil \rightarrow succinil CoA), que, juntamente com

glicina, irá formar o anel tetrapirrol do grupo heme da Lb (CONN & STUMPF, 1975; MALAVOLTA, 1980; MARSCHNER, 1986).

Em plantas expostas até a frutificação, Co também não afetou o teor de NO_3^- no xilema (figura 6C). Co também não afetou as características avaliadas em plantas adultas submetidas a 900 $\mu\text{g/L}$ de Co por sete dias, após terem sido inoculadas e cultivadas em vermiculita ou hidroponia na ausência de Co até a frutificação (estádio R4) (tabelas 24 a 29). Em leguminosas supridas com N combinado, a aplicação de Co não apresenta efeito no crescimento e conteúdo de N da parte aérea, o que demonstra a incapacidade do Co em superar o efeito inibitório de NO_3^- na fixação de N_2 (MARSCHNER, 1986).

Além de não ter sido eficiente em prevenir as plantas do efeito inibitório de NO_3^- na nodulação e fixação de N_2 , plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia até a frutificação (estádio R4) expostas ao Co, apresentaram inibição do crescimento (massa de parte aérea e de raiz), quando em concentrações de Co acima de 300 $\mu\text{g/L}$ (tabelas 10, 11 e 16). Porém, plantas inoculadas e cultivadas em vermiculita, expostas ao Co pelo mesmo período, não tiveram o crescimento inibido pelo Co, mesmo à concentração de 900 $\mu\text{g/L}$ (tabela 8). Semelhantemente ao NO_3^- , a resposta ao Co em hidroponia foi muito mais acentuada do que em vermiculita; todavia, diferentemente de NO_3^- , que é um ânion, o Co é um cátion bivalente (Co^{++}) e como tal pode ter ficado fortemente retido às cargas negativas da argila (vermiculita apresenta elevada CTC),

tornando menor sua concentração na solução do solo, conseqüentemente, menos prontamente disponível às raízes (MALAVOLTA, 1980); daí a ausência, em vermiculita, do efeito negativo do Co observado em plantas em hidroponia.

Co está presente na solução do solo à concentração média de 0,007-0,2 μM (MALAVOLTA, 1980), apresentando comportamento de micronutriente; como tal, o limiar entre carência e toxicidade é bastante estreito. O excesso de Co leva a diminuição de Fe e principalmente de Mn; por essa razão a toxidez de Co lembra os sintomas da deficiência desses nutrientes, com folhas cloróticas, depois necróticas e por fim secando por completo (MALAVOLTA, 1980). No nosso trabalho, concentrações mais elevadas de Co, em hidroponia, chegaram a provocar clorose nas folhas além de limitar o crescimento da planta.

Apesar de afetar de maneira não muito nítida os teores de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema (figura 8B), o AVG não afetou nenhuma das demais características avaliadas, quer seja quando mantido na solução desde a inoculação até a frutificação (tabelas 18 e 19 e figuras 7 e 8C), ou durante apenas sete dias em plantas adultas e noduladas (tabelas 30, 31 e 32). A falta de resposta ao AVG, principalmente na nodulação, não pode ser atribuída às concentrações utilizadas, uma vez que a 0,1 μM , na ausência de NO_3^- , o AVG chegou a provocar diminuição do teor de ureídeos nos exsudatos do xilema (figura 8A). Também em experimentos preliminares, plantas de soja em

hidroponia expostas a 1,0 μM de AVG na solução nutritiva desde o estágio V1, apresentaram sintomas de toxicidade, ocorrendo inibição do crescimento da haste principal, com indução do crescimento de ramificações e clorose generalizada da planta.

Com base na literatura e nos resultados aqui obtidos, podemos inferir que, a participação de etileno no processo da nodulação, em soja, não deve ser descartada; porém os resultados nos levam a sugerir que o etileno parece não ser responsável único e direto pelo controle da nodulação em soja, atuando no processo possivelmente como um dos componentes.

Efeito de NO_3^- , AVG e AIA na composição (mol%) de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema:

É interessante observar que em hidroponia -N (tabelas 20 e 23), há uma inversão na participação % entre os três principais aminoácidos, asparagina, glutamina e aspartato, comparado à composição dos exsudatos do xilema de plantas em vermiculita -N (tabela 2). Em hidroponia -N não só ocorre diminuição de asparagina e de glutamina, como também há um aumento muito grande de aspartato nos exsudatos do xilema (tabelas 20 e 23).

Em razão de, nos dois experimentos em que foram analisadas a composição dos aminoácidos livres nos exsudatos do xilema, não termos tratamento vermiculita -N, consideraremos hidroponia -N como controle comparativo. Nesse caso, o NO_3^- , principalmente a 4,0 mM, estimulou muito a produção de asparagina (tabelas 20 e 23) e diminuiu a de aspartato (tabela 20) e de glutamina

(tabela 23). Discussão a respeito de efeito de NO_3^- na composição de aminoácidos livres nos exsudatos do xilema será abordada com detalhes mais a frente na parte relativa a estresse, uma vez que outros fatores são incluídos auxiliando a discussão.

Por outro lado, a resposta ao AVG (0,1 μM) e AIA (1,0 μM) foi dependente da presença ou não de NO_3^- . AVG na ausência de NO_3^- (tabela 20), aumentou aspartato e diminuiu asparagina e glutamina, intensificando, de certa forma, o efeito de hidroponia -N. Com aumento da concentração de NO_3^- , o efeito de AVG foi sendo ofuscado por esse, e a 4,0 mM o NO_3^- exerceu seu efeito sozinho estimulando a produção de asparagina e diminuindo a de aspartato e de glutamina.

Todavia, AIA, na ausência de NO_3^- (tabela 23), apresentou efeito semelhante ao AVG (somente que em menores proporções), estimulando o aumento de aspartato e diminuindo asparagina e glutamina. Porém, na presença de NO_3^- , AIA não só levou à diminuição de asparagina e de glutamina como promoveu grande aumento de aspartato, anulando completamente o efeito de NO_3^- , principalmente na concentração de 4,0 mM de NO_3^- .

Em resumo: NO_3^- sozinho e/ou na presença de AVG, estimulou muito a produção de asparagina e diminuiu aspartato e glutamina. Por outro lado, AVG e AIA, na ausência de NO_3^- , proporcionaram diminuição de asparagina e glutamina e estimularam o aumento de aspartato, sendo o efeito de AIA menos pronunciado do que do AVG. Na presença de NO_3^- AVG não

apresentou efeito algum, enquanto que o AIA inibiu o efeito de NO_3^- , e intensificou grandemente seu efeito, diminuindo asparagina e glutamina e aumentando muito aspartato.

O AVG é considerado inibidor específico da enzima ACCsintase (LAU & YANG, 1976; YU & YANG, 1979). Porém, AVG a $0,1 \mu\text{M}$ e na ausência de NO_3^- , alterou o metabolismo da planta (nódulos e/ou raízes), o que sugere que nessa concentração não é tão específico. A alteração do metabolismo pelo AVG é evidenciada por: diminuição nos teores de ureídeos totais (figura 8A) e de aminoácidos livres totais (figura 8B) na ausência de NO_3^- , e diminuição das de asparagina e glutamina e aumento de aspartato nos exsudatos (tabela 20).

Por outro lado, AIA que teria modo de ação oposto ao de AVG (o primeiro estimula a síntese de etileno e o segundo inibe, via ACCsintase) apresentaram efeitos semelhantes na ausência de NO_3^- , diminuindo asparagina e glutamina e aumentando aspartato, dificultando ainda mais o entendimento.

RIGAUD & PUPPO (1975) verificaram que preparações de bacteróides são hábeis em degradar aerobicamente AIA, o que levanta a possibilidade de isto ter ocorrido no nosso trabalho. Porém em baixa pO_2 , que seria a situação que ocorre dentro do nódulo, os bacteróides não são eficientes em degradar AIA. Mesmo que tenha ocorrido a degradação pelos bacteróides, do AIA aplicado, ainda é difícil de se fazer analogia com o aumento de aspartato e diminuição de asparagina e glutamina pelo AIA aplicado.

5.3. ESTRESSE POR NO_3^- , HIPOXIA OU ANOXIA EM PLANTAS ADULTAS NODULADAS:

Tratamentos de estresse por NO_3^- , ou pela transferência de plantas para hidroponia com ou sem NO_3^- , mantendo ou não o borbulhamento da solução nutritiva, e ainda a recuperação dessas plantas ao suspender o tratamento de estresse, provocaram grandes alterações no metabolismo dos nódulos (e/ou raízes) dessas plantas, principalmente manifestadas pelos solutos nitrogenados transportados nos exsudatos do xilema. Por essa razão, a discussão referente a esses tratamentos de estresse foi feita em três partes: a) efeito de estresse nos teores de ureídeos totais, aminoácidos livres totais e de NO_3^- nos exsudatos do xilema; b) efeito de estresse na composição dos aminoácidos livres presentes nos exsudatos do xilema; c) efeito de estresse na atividade de asparaginase e no teor de Lb e de proteína total em nódulos. Para facilitar o entendimento dos tratamentos de estresse de O_2 , adotamos as seguintes denominações: hidroponia com borbulhamento de ar = hipoxia; hidroponia sem borbulhamento algum = anoxia parcial e hidroponia com borbulhamento de gás N_2 = anoxia total.

Efeito dos tratamentos de estresse nos teores de ureídeos totais, aminoácidos livres totais e de NO_3^- nos exsudatos do xilema:

Tratamentos de NO_3^- - em hidroponia ou em vermiculita - (figuras 10, 14 e 19), e de hidroponia, tanto hipoxia quanto

anoxia (figuras 10, 13A, 14 e 19), inibiram a atividade fixadora de N_2 dos nódulos, diminuindo grandemente o teor de ureídeos totais presentes nos exsudatos do xilema.

O fato da hidroponia, mesmo com borbulhamento de ar, ter inibido a N_2 ase, sugere que o borbulhamento da solução não foi suficiente o bastante para manter o metabolismo respiratório do nódulo e o fornecimento de O_2 necessário para sustentar, com energia e poder redutor, a atividade fixadora de N_2 da N_2 ase do bacteróide. Evidência disso é que plantas que estavam em hidroponia, ao serem transferidas novamente para vermiculita (figura 14-t9 a t12) apresentaram recuperação na atividade fixadora de N_2 , apresentando maiores valores de ureídeos do que plantas que permaneceram em hidroponia e que passaram a receber o borbulhamento da solução nutritiva com ar (figura 14-t5,t7). Além disso, os teores de ureídeos totais nos exsudatos do xilema de plantas em hidroponia borbulhadas com ar, embora numericamente maiores, não diferiram significativamente daqueles de plantas que não receberam borbulhamento da solução nutritiva (figura 14-t1 a t4). A indicação mais forte é que os teores de ureídeos nos exsudatos do xilema de plantas em hidroponia submetidas ao borbulhamento com N_2 (anoxia total), não apresentaram grandes diferenças daqueles de plantas borbulhadas com ar (hipoxia) ou daqueles que não receberam borbulhamento algum (anoxia parcial) da solução nutritiva (figura 19).

Apesar da alta afinidade da citocromo-oxidase do bacteróide pelo O_2 (VANCE & HEICHEL, 1991), e da difusão de O_2 dentro do nódulo ser facilitada pela Lb (APPLEY, 1984; VANCE & HEICHEL, 1991), mesmo sob condições ambientes (21% de O_2), o O_2 parece ser limitado para a atividade da N_2 ase de nódulos de soja (DREVON et al., 1988A; HUNT et al., 1989), uma vez que, nessas condições, a ARA é aumentada pela elevação da pO_2 (HUNT et al., 1989). Além disso, o processo da fermentação pode ser detectado em nódulos, mesmo em presença de O_2 no ambiente externo (TAJIMA & LARNE, 1982; HECKMAN & DREVON, 1987). Em hidroponia a situação se agravaria ainda mais, uma vez que a velocidade de difusão de O_2 é cerca de 100 vezes menor em água do que em ar (THOMSON & GREENWAY, 1991, citado por RICARD et al., 1994).

A baixa difusão de O_2 em água faz com que muitos tecidos circundados por água, como raízes em solos alagados, estejam sob hipoxia (RICARD et al., 1994). Em hidroponia, mesmo com borbulhamento constante da solução nutritiva, o sistema radicular e os nódulos, possivelmente estariam com grande parte da sua superfície envolta por uma película de água, o que, segundo estes autores, caracterizaria uma situação de hipoxia. Isso explicaria o menor teor de ureídeos nos exsudatos do xilema de plantas em hidroponia, mesmo com borbulhamento de ar, comparado àqueles de plantas em vermiculita.

Além disso, não deve ser descartada a possibilidade de danos causados em células do nódulo e de raiz por formas de O_2

ativado (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$) geradas por tratamentos de estresse (BECANA & KLUCAS, 1992; DALTON, 1995, citado por ESCUREDO et al., 1996).

O efeito inibitório da hidroponia na atividade fixadora de N_2 do nódulo foi contínuo até o 9º dia, porém com menor intensidade à partir do 3º/5º dia (figuras 10 e 13A), demonstrando certa adaptação às condições de estresse. O prolongamento da sobrevivência de estruturas vegetais (de menos de 10 horas para mais de um dia) sob anoxia, tem sido obtido por pré-tratamento de hipoxia, o que leva à menor produção de ácido láctico e consequentemente menor acidificação do citoplasma (RICARD et al., 1994). Porém, pouco é conhecido a respeito do mecanismo de aclimatação à anoxia. Em raízes de milho a presença de ABA durante pré-tratamento de hipoxia e a síntese de proteínas, incluindo álcool desidrogenase, parece estar envolvida na aquisição de tolerância à anoxia (RICARD et al., 1994).

Plantas adultas noduladas ao serem expostas ao NO_3^- , tanto em hidroponia quanto em vermiculita, apresentaram, nos exsudatos do xilema, acentuada diminuição no teor de ureídeos totais (figuras 10, 14 e 19) e aumento no teor de NO_3^- (figuras 12 e 16). Esses resultados evidenciam que o NO_3^- é um potente inibidor da atividade da N_2 ase (GIBSON & HARPER, 1985; DREVON et al., 1988B; STREETER, 1988; EAGLESHAM, 1989), e que ao ser suprida com N combinado a planta nodulada substitui a fixação de N_2 pelo N combinado (OGHOGHORIE & PATE, 1971).

O efeito negativo de NO_3^- na atividade fixadora de N_2 do nódulo foi mais pronunciado em hidroponia do que em vermiculita (figuras 10, 14 e 19). Conforme discutido anteriormente, hidroponia limita O_2 para o funcionamento do nódulo; isso sugere que NO_3^- limita ainda mais a disponibilidade de O_2 para os nódulos e consequentemente a atividade da N_2 ase. Evidência a esse respeito é que plantas em hidroponia + NO_3^- com aeração (figura 14-t4), mesmo absorvendo e transportando mais NO_3^- do que sem aeração (figura 16-t3,t4), apresentaram teor de ureídeos no xilema um pouco acima daqueles de plantas em hidroponia + NO_3^- sem aeração (figura 14-t3). Além disso, ocorreu a recuperação da atividade fixadora de N_2 do nódulo ao introduzir aeração em hidroponia (figura 14-t7) ou transferindo as plantas para vermiculita (figura 14-t11,t12), mesmo apresentando altos teores de NO_3^- nos exsudatos do xilema (figura 16-t7,t11,t12). A maior evidência é que a atividade de fixação de N_2 em hidroponia com aeração, quer seja durante 4 (figura 14-t2,t4) ou 5 dias (figura 19-t1,t2), quer seja pela suspensão do estresse de O_2 por 2 dias finais, introduzindo aeração (figura 14-t5,t7) ou transferindo as plantas para vermiculita (figura 14-t9 a t12), sempre foi maior na ausência do que na presença de NO_3^- , comprovando HECKMANN & DREVON (1987), de que a atividade da N_2 ase é menos estimulada pelo O_2 externo em presença de NO_3^- .

A capacidade de recuperação da atividade de fixação de N_2 , demonstrada com a introdução de aeração em hidroponia ou com a

transferência de plantas para a vermiculita, evidencia e confirma observações de outros pesquisadores de que o efeito adverso de NO_3^- na fixação de N_2 pode ser minorado pelo aumento da $p\text{O}_2$ (DREVON et al., 1988A; HUNT et al., 1989; DAKORA & ATKINS, 1990A,B) ou pela adição de oxyLb à suspensão de bacteróides expostos previamente ao NO_3^- (BECANA & SPRENT, 1987). Todavia, a capacidade de recuperação da atividade fixadora de N_2 do nódulo, da inibição proporcionada pelo NO_3^- , é dependente da concentração de NO_3^- e do tempo de exposição (BECANA et al., 1989; MINCHIN et al., 1989).

Esses resultados sugerem que o efeito de NO_3^- inibindo a atividade de fixação de N_2 da N_2 ase possivelmente esteja associado mais com a limitação de O_2 para os bacteróides do que com o metabolismo de NO_3^- no nódulo, acrescentando evidências à hipótese de uma possível barreira à difusão de O_2 no nódulo induzida pelo NO_3^- (LAYZELL et al., 1990; VESSEY & WATERER, 1992; HUNT & LAYZELL, 1993; DENISON & HARTER, 1995).

Contudo, não deve ser descartada a possibilidade do efeito adverso do metabolismo de NO_3^- dentro do nódulo, levando sobretudo à conversão de Lb à forma nitosil (LbNO) (KANAYAMA et al., 1990; HUNT & LAYZELL, 1993), ou mesmo do efeito direto de NO_3^- na PBM, causando desestabilização dessa, alterando o transporte de ácidos dicarboxílicos (malato e succinato) através da membrana, proporcionado acúmulo de PHB, o qual atua inibindo a N_2 ase (BLUMWALD et al., 1985; UDVARDI & DAY, 1989; BERGERSEN & TURNEER, 1993, citado por VASSILEVA & IGATOV,

1996). Danos às células, causados por formas de O_2 ativado em resposta aos tratamentos de estresse são possibilidades que também não devem ser descartadas (BECANA & KLUCAS, 1992; DALTON, 1995, citado por ESCUREDO, 1996).

O teor de aminoácidos livres totais nos exsudatos do xilema não apresentou resposta muito precisa aos tratamentos de estresse. De maneira geral, o teor de aminoácidos livres diminuiu em resposta aos tratamentos de hidroponia (figuras 11, 13B, 15 e 20), o que pode ser atribuído aos fatores anteriormente discutidos para ureídeos totais. Porém, estresse de O_2 e NO_3^- juntos (anoxia parcial + NO_3^- e anoxia total + NO_3^-) proporcionaram aumento de aminoácidos livres totais nos exsudatos do xilema, como evidenciado pelos tratamentos de hidroponia + NO_3^- sem aeração (figuras 15-t3,t8 e 20-t6) e hidroponia + NO_3^- borbulhando gás N_2 (figura 20-t4). Contudo, o aumento de aminoácidos livres totais não se relacionou positivamente com o NO_3^- absorvido (figura 16), nem negativamente com o teor de ureídeos totais (figuras 14 e 19); apenas apresentaram em comum aumento muito grande nas proporções de ALA e SER (tabelas 45-t3,t8 e 46-t4,t6). Todavia, tratamentos de estresse de O_2 , mas sem NO_3^- , também apresentaram valores elevados de ALA e SER (tabelas 45-t1,t6 e 46-t3,t5) sem contudo apresentarem teores de aminoácidos livres totais elevados (figuras 15-t1,t6 e 20-t3,t5), dificultando fazer conjeturas a esse respeito.

Efeito de tratamentos de estresse na composição (mol %) de aminoácidos livres presentes nos exsudatos do xilema:

Os tratamentos de estresse impostos às plantas provocaram alterações na composição dos aminoácidos livres presentes nos exsudatos do xilema, comparados ao controle (vermiculita -N). Embora tivéssemos uma diversidade de tratamentos de estresse impostos às plantas, com conseqüente grande diversidade de alterações ocorridas na composição desses aminoácidos, cinco aminoácidos se destacaram em resposta a esses tratamentos, que foram: asparagina, glutamina, aspartato, alanina e serina.

Dentre os cinco aminoácidos acima citados, asparagina foi o único que apresentou acentuadas variações (para cima ou para baixo, em relação ao controle vermiculita -N) em resposta a todos os tratamentos. Asparagina apresentou aumento em resposta ao NO_3^- , mas somente em aerobiose. Assim, comparado ao controle (vermiculita -N), plantas em vermiculita $+\text{NO}_3^-$ (tabelas 38, 45-t14 e 46) e em hidroponia $+\text{NO}_3^-$ com aeração (tabelas 38, 45-t4,t7 e 46) apresentaram elevação de asparagina nos exsudatos do xilema. Também a suspensão do tratamento de estresse de O_2 em plantas em hidroponia $+\text{NO}_3^-$ pela introdução de aeração (tabela 45-t7) ou transferência para a vermiculita (tabela 45-t11,t12), elevou também asparagina. Por outro lado, hidroponia $+\text{NO}_3^-$ sem aeração (tabelas 45-t3,t8 e 46) assim como hidroponia -N, independente de aeração (tabelas 38, 39, 45-t1,t2,t5,t6 e 46), causaram diminuição acentuada na participação de asparagina.

Esses resultados evidenciam que o efeito estimulador de NO_3^- , elevando asparagina, é dependente de O_2 . Além disso, sugerem que em hidroponia -N, mesmo com aeração, há uma situação de hipoxia suficiente para inibir a síntese de asparagina, a qual parece ser muito sensível ao estresse de O_2 . Evidência a esse respeito é que a participação de asparagina em hipoxia -N (H +AR) não diferiu de anoxia parcial -N (H -AR) ou de anoxia total -N (H + N_2) (tabela 46). A diminuição da síntese de asparagina em hidroponia -N pode ser uma consequência de déficit de NH_4^+ para ser incorporado. Evidência disso é que como nesse sistema o N é exclusivamente dependente do N_2 da fixação, e em hidroponia, mesmo com aeração, essa apresenta diminuição acentuada (figuras 10, 13A, 14 e 19), não diferindo inclusive da anoxia parcial ou total (figura 19), poderia haver um déficit de N para ser acumulado em asparagina em razão da queda da fixação de N_2 . Da mesma maneira, uma diminuição na redução e assimilação de NO_3^- em condições de anoxia parcial ou total (+ NO_3^- sem ar), pode explicar a queda no nível de asparagina nessas condições, ou seja, a sensibilidade de asparagina ao O_2 ocorre em função da sensibilidade dos processos de assimilação de N, quer vindo da fixação de N_2 e/ou de NO_3^- .

Esses resultados nos leva a supor que o efeito de NO_3^- estimulando o aumento de asparagina ocorre em razão de: 1) da inibição da fixação de N_2 e 2) da absorção de NO_3^- e da sua assimilação pela raiz e/ou nódulo (BECANA & SPRENT, 1987). Evidências são: a absorção de NO_3^- é aumentada grandemente em

aerobiose (figura 16); NO_3^- somente em aerobiose é que proporciona aumento de asparagina; NO_3^- reduz (inibe) a atividade fixadora de N_2 do nódulo (teor de ureídeos cai grandemente). Dessa forma, o N que provocou o aumento de asparagina deve ter tido como origem o N do NO_3^- fornecido à planta. Isso nos leva a supor que a queda na atividade fixadora de N_2 dos nódulos pelo NO_3^- em vermiculita e/ou em hidroponia com aeração pode ter sido devida ao metabolismo de NO_3^- dentro do próprio nódulo (BECANA & SPRENT, 1987; DREVON et al., 1988B; BECANA et al., 1989) e/ou na raiz.

O aspartato apresentou grande aumento somente em resposta ao tratamento de hidroponia com aeração (tabelas 38, 39, 45-t2,t4,t5,t7 e 46). Ao contrário da asparagina, o aumento de aspartato em hidroponia com aeração (tabelas 38, 45-t4,t7 e 46) foi sensivelmente menor na presença de NO_3^- , comparado ao aumento em hidroponia sem NO_3^- (tabelas 38, 39, 45-t2,t5,t10 e 46). Esses resultados sugerem que em hidroponia -N com aeração, o N da fixação de N_2 é preferencialmente acumulado em aspartato. Quando NO_3^- é fornecido em hidroponia com aeração, o N (nesse caso, é basicamente do NO_3^- fornecido, uma vez que nessa situação a fixação de N_2 é inibida) é preferencialmente utilizado na síntese de asparagina (conforme discutido acima). A presença de O_2 (aeração) em hidroponia -N é imprescindível para que possa ocorrer acúmulo de aspartato; evidências são: aumento de aspartato em hidroponia ocorre grandemente na ausência de NO_3^- mas somente com aeração (tabelas 38, 39, 45-t2

e 46); plantas com estresse de O_2 , ao receberem aeração (tabela 45-t5) ou transferidas novamente para vermiculita (tabela 45-t10), aumentaram grandemente aspartato; plantas em anoxia, parcial ou total, apresentaram grande diminuição de aspartato (tabela 46).

Tendo em vista que o aumento em aspartato é acompanhado por uma queda em asparagina, os eventos metabólicos que levam ao acúmulo de aspartato podem ser ou uma maior degradação da asparagina pela asparaginase ou uma menor utilização de aspartato pela asparagina sintetase. Tanto asparaginase (STREETER, 1977) quanto asparagina sintetase (HUBER & STREETER, 1985), foram detectadas em nódulos de soja. Além disso, VINCZE et al. (1994) observaram atividade de asparaginase bastante alta em nódulos inefetivos de tremço, enquanto que em nódulos ativos, fixando N_2 , a atividade era reduzida; todavia essa última aumentou após tratamento com NO_3^- . Portanto, uma mudança na atividade de asparaginase no nódulo poderia estar envolvida no aumento em aspartato encontrado nos exsudatos do xilema.

Assim como ocorreu com aspartato, o N da glutamina tem como origem basicamente o N da fixação de N_2 , uma vez que a sua concentração na seiva do xilema é diminuída drasticamente pela hidroponia e/ou pela presença de NO_3^- , e se acentua ainda mais com o estresse de O_2 . O NO_3^- diminuiu glutamina em vermiculita (tabelas 38, 45-t14 e 46) e esse efeito inibitório é aumentado em hidroponia + NO_3^- (tabelas 38, 45-t3,t4,t7,t8 e 46). O estresse de O_2 é o principal responsável pela diminuição de

glutamina em hidroponia, o que é evidenciado pela diminuição da participação de glutamina em tratamentos de hipoxia (tabelas 38, 39, 45-t2,t4,t5,t7 e 46), se acentuando com a anoxia parcial (tabelas 45-t1,t3,t6,t8 e 46) ou com anoxia total (tabela 46). Reforça essa evidência a recuperação, aumentando glutamina, ao suspender o estresse de O_2 , quer introduzindo aeração (tabela 45-t5,t7), quer transferindo as plantas novamente para vermiculita (tabela 45-t9 a t12). A prova mais forte é que sob anoxia total (tabela 46), glutamina praticamente deixou de ser acumulada.

Tais mudanças podem ser um reflexo da retomada da fixação N_2 , uma vez que esse é um processo sensível à falta de O_2 (LAYZELL et al., 1990; HUNT & LAYZELL, 1993; DENISON et al., 1995), resultando em aumento da produção de glutamina. De fato, a presença de glutamina nos exsudatos do xilema parece ser uma característica de soja nodulada, pois o nível cai bastante quando a planta passa a depender de NO_3^- como fonte de N. Além do presente trabalho, tal fenômeno foi observado para soja (PATE et al., 1980; McCLURE & ISRAEL, 1979) e para outras leguminosas, porém com menor intensidade de variação (PATE et al., 1980). O efeito parece não depender da presença de NO_3^- no meio, mas mais da atividade do nódulo, pois plantas noduladas onde a fixação de N_2 foi inibida pelo Al^{3+} (NO_3^- ausente), também apresentaram queda em glutamina (SILVA & SODEK, 1997).

Alanina e serina são os dois principais aminoácidos cujas concentrações no exsudato correlacionam positivamente com o

estresse de O_2 . Evidência da relação de alanina e serina com o estresse de O_2 é o grande aumento ocorrido sob condições de anoxia parcial (tabelas 45-t1,t3,t6,t8 e 46) e anoxia total (tabela 46), normalmente se acentuando quando associada ao NO_3^- .

Alanina é considerada o terceiro maior produto da fermentação em plantas (SMITH & ap REES, 1979; REGGIANI *et al.*, 1988), talvez como uma forma de evitar a perda de carbono que ocorre via etanol durante o processo fermentativo (GOOD & CROSBY, 1989). Trabalhos empregando ^{14}C demonstraram que os carbonos da alanina são derivados dos carbonos de piruvato (SMITH & ap REES, 1979), como são dos outros produtos principais da fermentação, etanol e lactato. O N da alanina pode originar do grupo amida da asparagina e glutamina (REGGIANI *et al.*, 1988; MENEGUS *et al.*, 1989) ou da deaminação de aspartato ou outros aminoácidos (ROBERTS *et al.*, 1992). Isso demonstra a estreita relação metabólica entre alanina e os outros principais aminoácidos aqui abordados (asparagina, glutamina e aspartato). Destes, apenas aspartato, por transaminação à partir de piruvato, poderá servir como doador de N na formação de alanina. Seria necessária a deaminação de asparagina e glutamina (por exemplo via asparaginase e GOGAT) para que o N amida pudesse chegar no grupo α -amino de outro aminoácido e assim participar na formação de alanina via transaminação. Quais dessas vias metabólicas estão envolvidas não é conhecido, apenas há evidência na literatura para a participação da transaminase de alanina, uma vez que a mesma é

induzida por tratamento anaeróbico de raízes de cevada (GOOD & CROSBY, 1989).

Serina também pode acumular sob condições anaeróbicas (GUINN & BRINKEROFF, 1970, citado por STEWART & LARHER, 1980). Em nódulos, a biossíntese de serina envolve 3PGA (Gliceraldeído 3-P) como precursor (SCHUBERT, 1986). Possivelmente, pelo mesmo motivo que a alanina remove o excesso de piruvato gerado durante a fermentação, a serina poderia resultar de um acúmulo de 3PGA gerado pelo acúmulo de piruvato e pela maior atividade da fosfofrutoquinase. Por outro lado, a principal rota de formação de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) é via catabolismo oxidativo de purinas, das quais serina atua como um precursor em nódulos (SCHUBERT, 1986). Assim sendo, o acúmulo de serina observado sob anoxia poderia ser em consequência da queda na biossíntese de ureídeos.

Em síntese: plantas de soja em vermiculita -N, bem noduladas, fixando ativamente N_2 apresentam nos exsudatos do xilema asparagina e glutamina (amidas) e aspartato como os principais aminoácidos exportados, estando numa proporção ao redor de 5:2:1. Nessa situação, o N oriundo da fixação de N_2 (desconsiderando os ureídeos), é incorporado e transportado preferencialmente em asparagina, seguido de glutamina e aspartato, conforme relação acima. Quando NO_3^- é fornecido em vermiculita, asparagina continua sendo exportada em maior proporção, ocorrendo inclusive incremento na proporção de asparagina. Esse incremento pode ser devido a diminuição do

acúmulo de glutamina (aspartato às vezes cai um pouco) e/ou pelo aumento do acúmulo em asparagina em razão da inibição da fixação de N_2 (queda de ureídeos). Quando NO_3^- é fornecido em hidroponia com aeração, a situação é idêntica a NO_3^- em vermiculita, somente que o incremento de asparagina é um pouco menor, em parte, em razão de uma pequena parcela de N ser acumulada em aspartato, embora a diminuição de glutamina seja um pouco mais acentuada do que no caso anterior. Quando as plantas são transferidas para hidroponia -N com aeração, a síntese de asparagina e de glutamina diminuem grandemente; por outro lado, a síntese de aspartato é muito intensificada, chegando inclusive, em tratamento de longa duração (9 dias), a ultrapassar a concentração de asparagina. Quando plantas são transferidas para hidroponia -N ou hidroponia $+NO_3^-$ sem aeração (anoxia parcial) ou borbulhando N_2 (anoxia total), o acúmulo de glutamina, asparagina e às vezes aspartato (nessa ordem), diminuem drasticamente, aumentando a diversidade de aminoácidos nos quais o N é incorporado. Dentre esses, alanina e serina são os principais. Quando o estresse de O_2 (hidroponia -ar/2dias) é aliviado (aeração/2dias restantes ou transferência para vermiculita), a recuperação da síntese de aminoácidos ocorre elevando suas concentrações a níveis semelhantes aos observados em plantas que foram mantidas naquele tratamento durante todo o período. Isso sugere que, uma vez o tratamento de estresse não tenha causado danos severos, a recuperação da atividade do nódulo ocorrerá (BECANA et al., 1989)

Efeito de tratamentos de estresse na atividade de asparaginase e nos teores de Lb e de proteína total em nódulos.

Como observado anteriormente, tratamento de hidroponia-N com aeração levou a diminuição drástica de asparagina, e em menor proporção, de glutamina; ocorreu, concomitantemente, aumento muito grande de aspartato, chegando em tratamentos prolongados (≥ 4 dias) a ultrapassar asparagina (tabelas 38, 39, 45-t2 e 46). Esses resultados nos levou a supor do envolvimento de ASNase a nível de nódulo, levando ao catabolismo de asparagina.

A atividade de asparaginase em extratos de nódulos de soja foi observada por STREETER (1977), o que, segundo esse autor, é um fator complicador a mais para o entendimento da síntese de asparagina nessas estruturas, uma vez que é sabido serem os nódulos exportadores de grandes quantidades de asparagina. Por outro lado, em tremoço a asparaginase só apresenta atividade em nódulos até 12 dias de idade (SCOTT & FARNDEN, 1976). VINCZE et al. (1994) demonstraram que a atividade de asparaginase é controlada por uma proteína repressora do gene de asparaginase em nódulos de tremoço. Esta proteína está presente em nódulos ativos, mas ausente em nódulos inativos, jovens ou tratados com NO_3^- . Evidentemente, a atividade da enzima pode mudar sob condições diferentes.

A remoção do N-amida (deaminação), liberando NH_3 e aspartato, pela ação catalítica da asparaginase, é uma das rotas possíveis do catabolismo de asparagina (LEA & MIFLIN,

1980; MIFLIN, 1977). Apesar da enzima ter alto K_m para asparagina, a concentração de asparagina em nódulos também é elevada (STREETER, 1977).

Todavia no nosso trabalho, a atividade de asparaginase em nódulos (tabelas 40 e 47) não se relacionou positivamente com o tratamento que levou ao aumento de aspartato (hidroponia -N com aeração). Apesar disso, a atividade de asparaginase apresentou-se bastante elevada em alguns tratamentos, especificamente naqueles sob anoxia parcial ou total (tabela 47). Assim sendo, o aumento de aspartato em exsudatos do xilema de plantas em hidroponia -N com aeração, deve ter ocorrido por outra rota que não seja por meio da metabolização de asparagina à aspartato via ação de asparaginase no nódulo. Torna-se difícil, também, explicar o aumento de aspartato por meio da rota inversa à da biossíntese de asparagina (asparagina + glutamina \rightarrow aspartato + glutamina), como proposto por LEE & FOWDEN (1975, citado por MAZELIS, 1980), uma vez que, por essa rota deveria ocorrer também aumento de glutamina, porém, o inverso foi verificado (tabelas 39 e 46).

Todavia, embora a atividade de asparaginase no nódulo não tenha relacionado com aumento de aspartato no exsudato do xilema, a possibilidade da asparaginase ter atuado a nível de raiz não deve ser descartada. Uma outra possibilidade para o aumento de aspartato seria a inibição da asparagina sintetase em hidroponia -N com aeração. Dessa forma, o NH_4^+ oriundo da fixação de N_2 seria incorporado até glutamato via GS/GOGAT, e

esse, juntamente com oxalacetato, pela ação da aspartato aminotransferase, sintetizaria aspartato. Nessa rota glutamina estaria sempre sendo metabolizada a glutamato, não se acumulando, e asparagina deixaria de ser sintetizada. A dosagem desses produtos e dessas enzimas em nódulos e raízes de plantas de soja em hidroponia -N com aeração se constitui numa abertura para futuros trabalhos.

Embora Lb tenha correspondido, em média, a 44%, 57% e 81% do teor de proteína solúvel total dos nódulos, nos três experimentos onde foram avaliadas (figuras 17, 18 e 21 e tabelas 42 e 43), a variação no teor de Lb dos nódulos, dentro de cada tratamento, esteve bem relacionada com a variação no teor de proteína solúvel total, o que possivelmente pode ser devido a grande participação de Lb no nódulo (BECANA et al., 1986).

Valores de Lb de 20-30% da proteína solúvel total em nódulos, têm sido relatado para diversas espécies (VERNA & BAL, 1976, citado por BECANA et al., 1986). Em nódulos de alfafa, Lb representa cerca de 30% da proteína solúvel total durante o período vegetativo (BECANA et al., 1986). Apesar de nódulos de soja serem uma exceção, apresentando valores elevados de Lb, podendo alcançar acima de 40% (NASH & SCHULMAN, 1976, citado por BECANA et al., 1986), o valor de 81%, aqui encontrado para um experimento, é extremamente elevado e difícil de explicar, embora as plantas estivessem no início do estágio R3, com 45 dias da instalação do experimento.

Plantas mais velhas (estádio R5 e com 65 dias) foram aquelas que apresentaram menor teor de Lb nos nódulos (44%) em relação à proteína solúvel total. Isso pode ser devido ao estágio mais avançado do ciclo, no qual muitos nódulos já poderiam estar num estágio avançado de senescência apresentando degradação de Lb (BECANA et al., 1986).

Hidroponia +NO₃⁻ sem aeração durante 4 ou 5 dias (figuras 17-t3 e 21-t6), ou mesmo por apenas 2 dias seguido da suspensão do estresse de O₂ (figura 17-t7,t9), foram os tratamentos onde o teor de Lb (também de proteína solúvel total) apresentou maiores reduções. Torna-se difícil associar limitação de O₂ (anoxia parcial) com diminuição no teor de Lb, uma vez que em anoxia total (H +N₂) a diminuição no teor de Lb não se acentuou (figura 21).

A suspensão do tratamento de estresse de O₂ transferindo plantas para vermiculita (dois dias finais), após terem permanecido por dois dias em hidroponia sem aeração (figura 17-t7,t9), promoveu incremento muito pequeno em Lb. Isso evidencia que, no caso da Lb, a recuperação é um processo mais lento do que a recuperação da atividade fixadora de N₂ (medida pelo teor de ureídeos totais nos exsudatos do xilema), como visto anteriormente, apesar de que, teoricamente, a atividade fixadora de N₂ do nódulo ser dependente da Lb. Por outro lado sugere que Lb no nódulo pode não ser tão limitante à atividade fixadora de N₂, como afirmado por ROBERTSON & FARDEN (1980) de que "a Lb, antes de ser absolutamente essencial pode ser parte

de um sistema no qual cria um ambiente mais satisfatório para o processo de fixação de N_2 e assimilação de NH_4^+ em nódulos de leguminosas".

6. RESULTADOS PRINCIPAIS E CONCLUSÕES

- 1) NO_3^- inibe a nodulação (número de nódulos/planta) e a atividade de fixação de N_2 do nódulo, e à mesma concentração, esse efeito inibitório é mais fortemente manifestado em plantas em hidroponia do que em plantas em vermiculita;
- 2) A atividade fixadora de N_2 do nódulo parece ser mais sensível que a nodulação à inibição pelo NO_3^- , enquanto que a massa específica de nódulo é a menos afetada pelo NO_3^- ;
- 3) A inibição da atividade fixadora de N_2 do nódulo pelo NO_3^- relaciona-se positivamente com o teor de NO_3^- presente nos exsudatos do xilema e negativamente com o teor de ureídeos totais; todavia o teor de aminoácidos livres totais presente nos exsudatos do xilema demonstrou não ser uma característica associada à atividade fixadora de N_2 do nódulo;
- 4) NO_3^- (4,0 mM) em hidroponia com aeração, aumentou asparagina e diminuiu aspartato e glutamina nos exsudatos do xilema, independentemente da presença de AVG (0,1 μM), porém somente na ausência de AIA (1,0 μM);
- 5) Co não foi eficaz em prevenir a nodulação nem a atividade fixadora de N_2 do nódulo do efeito inibitório de NO_3^- . Além disso, em hidroponia, Co acima de 300 $\mu\text{g/L}$ inibiu o crescimento de planta (parte aérea e raiz) e a nodulação, porém, em vermiculita, Co até 900 $\mu\text{g/L}$ não apresentou nenhum efeito inibitório;
- 6) AVG também não foi eficaz em prevenir a nodulação nem a atividade fixadora de N_2 de nódulos, do efeito inibitório de

NO_3^- . Além disso, AVG, até $0,1 \mu\text{M}$, não afetou o crescimento de plantas, a nodulação e o transporte de solutos nitrogenados no xilema; todavia, AVG ($0,1 \mu\text{M}$), na ausência de NO_3^- diminuiu asparagina e glutamina e aumentou aspartato nos exsudatos do xilema, enquanto que na presença de NO_3^- AVG não exerceu alteração na composição dos aminoácidos nos exsudatos;

7) AIA ($1,0 \mu\text{M}$), mantido na solução nutritiva durante as duas semanas iniciais ou até a frutificação, exerceu pequenos estímulos no crescimento das plantas e preveniu, parcialmente, a nodulação do efeito inibitório de NO_3^- , sugerindo o seu envolvimento no processo; todavia AIA não foi eficaz em prevenir a atividade fixadora de N_2 do efeito inibitório de NO_3^- . Além disso, AIA ($1,0 \mu\text{M}$) impediu o aumento de asparagina, pelo NO_3^- ($4,0 \text{ mM}$), nos exsudatos do xilema, e diminuiu asparagina e glutamina, aumentando grandemente o aspartato;

8) Etileno, em função da resposta aos inibidores da sua síntese (AVG e Co), parece não exercer controle direto sobre a nodulação em soja; todavia, em função da resposta ao indutor da sua síntese (AIA), a sua participação, como um dos componentes atuantes no processo, não deve ser descartada;

9) Hidroponia, mesmo com borbulhamento da solução nutritiva com ar, inibiu a atividade de fixação de N_2 dos nódulos; além disso, a inibição da atividade de fixação de N_2 em hidroponia +aeração não diferiu de anoxia parcial (hidroponia sem aeração) ou anoxia total (hidroponia com borbulhamento com N_2), e a transferência de plantas da hidroponia com aeração para

vermiculita proporcionou um grande aumento da atividade de fixação de N_2 , sugerindo que o efeito inibitório de hidroponia é devido a baixa pO_2 proporcionada pelo sistema limitando O_2 para a atividade da N_2 ase do bacteróide;

10) Asparagina, seguida de glutamina (amidas) e de aspartato, são os principais aminoácidos exportados pelo sistema radicular em plantas de soja noduladas cultivadas em vermiculita -N, estando numa relação média aproximada de 5:2:1. Quando NO_3^- é fornecido em aerobiose (vermiculita ou em hidroponia com aeração), a fixação de N_2 é inibida (cai o teor de ureídeos nos exsudatos do xilema), porém, asparagina continua sendo sintetizada, ocorrendo, inclusive, incremento do transporte dessa em vermiculita $+NO_3^-$, enquanto que ocorre diminuição da participação de glutamina nos exsudatos do xilema; todavia em anaerobiose, NO_3^- proporcionou diminuição de asparagina, glutamina e aspartato e o aumento muito grande de alanina e serina, evidenciando a relação desses aminoácidos com tratamentos de estresse de O_2 ;

11) A inibição da atividade de fixação de N_2 pelo NO_3^- é maior em hidroponia do que em vermiculita; além disso, a resposta ao O_2 (recuperação do estresse pela introdução de aeração ou transferência para vermiculita), sempre foi maior em plantas na ausência de NO_3^- , sugerindo que o efeito inibitório de NO_3^- na atividade de fixação de N_2 está relacionado com a limitação na O_2 do nódulo;

12) Hidroponia -N com aeração promoveu grande aumento de aspartato e diminuição de asparagina e glutamina; todavia a atividade da ASNase em nódulos não se relacionou com o aumento de aspartato, evidenciando que o aumento de aspartato nesse tratamento ocorreu por outra via que não a do catabolismo de asparagina pela asparaginase. Todavia, elevada atividade de ASNase foi observada em nódulos de plantas sob estresse de O_2 (anoxia parcial ou total);

13) O teor de Lb em nódulos, dentro de cada tratamento, variou proporcionalmente ao teor de proteína solúvel total (possivelmente em razão da elevada participação de Lb), observando-se menores teores de Lb em nódulos de plantas submetidas ao tratamento de hidroponia $+NO_3^-$ sem aeração. Todavia a resposta da Lb aos tratamentos de estresse não foi tão expressiva quanto a da atividade de fixação de N_2 , sugerindo que Lb pode não ser um dos principais fatores limitantes do processo de fixação de N_2 e assimilação de NH_4^+ em nódulos de soja.

7. LITERATURA CITADA

- AHMED, S. & EVANS, H., 1960. Cobalt: a micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions. *Soil Sci.* 90:205-210.
- AKAO, S., NAKATA, S., YONEYAMA, T., 1991. Formation of nodules on non-nodulating soybean T201 after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Plant Soil* 138:207-212.
- APPLEBY, C.A., 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Plant Physiol.* 35:443-478.
- ATKINS, C.A., SHELP, B.J., STORER, P.J., PATE, J.S., 1984. Nitrogen nutrition and the development of biochemical functions associated with nitrogen fixation and ammonia assimilation of nodules on cowpea seedlings. *Planta* 162:327-333.
- BECANA, M. & KLUCAS, R.V., 1992. Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8958-8962.
- BECANA, M. & SPRENT, J.I., 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiol. Plant.* 70:757-765.
- BECANA, M., APARICIO-TEJO, P.M., SANCHEZ-DIAS, M., 1985A. Nitrate and nitrite reduction by alfafa root nodules: accumulation of nitrite in *Rhizobium meliloti* bacteroids and senescence of nodules. *Physiol. Plant.* 64:353-358.

- BECANA, M., APARICIO-TEJO, P.M., SANCHEZ-DIAS, M., 1985B. Nitrate and nitrite reduction in plant fraction of alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 65:185-188.
- BECANA, M., GOGORCENA, Y., APARICIO-TEJO, P.M., SÁNCHEZ-DÍAZ, M., 1986. Nitrogen fixation and leghemoglobin contend during vegetative growth of alfalfa. *J. Plant Physiol.* 123:117-125.
- BECANA, M., APARICIO-TEJO, P.M., SANCHEZ-DIAS, M., 1988. Nitrate and hydrogen peroxide metabolism in *Medicago sativa* nodules and possible effect on leghaemoglobin function. *Physiol. Plant.* 72:755-761.
- BECANA, M., MINCHIN, F.R., SPRENT, J.I., 1989. Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate. I. Nitrate effects on nitrate-reductase activities of bacteroids and nodule cytosol. *Planta* 180:40-45.
- BENSON, J.R. & HARE, P.E., 1975. O-phthalaldehyde fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Compararison with fluorecamine and ninhydrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 72:619-629.
- BLUMWALD, E., FORTIN, M.G., REA, P.A., VERMA, D.P.S., POOLE, R.J., 1985. Presence of host-plasma membrane type H⁺-ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiol.* 78:655-672.
- BODDEY, L.H. & HUNGRIA, M., 1994. Classificação das estirpes de soja utilizadas em estudo e/ou inoculantes brasileiros nas espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*.

- IN: III Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo, Londrina, Brasil, p333-339.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-251.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. & GRESSHOF, P.M., 1990. Early induction of feedback regulatory responses governing nodulation in soybean. *Plant Sci.* 71:69-81.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. & GRESSHOFF, P.M., 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:345-382.
- CALVERT, H.E., PENCE, M., MALIK, N.S.A., BAUER, W.B., 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium japonicum* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.* 62:2375-2384.
- CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHADRER, L.E., YOUNGS, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6(1):71-80.
- CHEN, P.C. & PHILIPS, D.A., 1977. Induction of root nodule senescence by combined nitrogen in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 59:440-442.
- CONN, E.E. & STUMPF, P.K., 1975. *Introdução à Bioquímica*. 3ª Edição, Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 452p.
- CRISWELL, J.G., HAVELKA, U.D., QUEBEDEAUX, B., HARDY, R.W.F., 1977. Effect of rhizosphere pO_2 on nitrogen fixation by

- excised and intact nodulated soybean roots. Crop Sci. 17:39-44.
- DAKORA, F.D. & ATKINS, C.A., 1990A. Effect of pO_2 on growth and nodule functioning of symbiotic cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiol. 93:948-955.
- DAKORA, F.D. & ATKINS, C.A., 1990B. Effect of pO_2 during growth on the gaseous diffusional properties of nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant Physiol. 93:956-961.
- DAS, G., 1982. A stimulatory effect of low nitrate levels on nodulation, leghemoglobin content, nitrogenase activity, and growth of mung-bean plants (*Vigna radiata*). Can. J. Bot. 60:1907-1912.
- DAY, D.A. & COPELAND, L., 1991. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. Plant Physiol. Biochem. 29(2):185-201.
- DAZZO, F.B. & BRILL, W.J., 1978. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Plant Physiol. 62:18-21.
- DAZZO, F.B. & HRABAK, E.M., 1982. Lack of a direct nitrate-trifoliin. A interaction in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Plant Soil 69:259-264.
- DELHON, P., GOJON, A., TILLARD, P., PASSAMA, L., 1995. Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants II. Relationship with accumulation of NO_3^- and asparagine in the roots. J. Exp. Bot. 46(291):1595-1602.

- DÉNARIÉ, J., DEBELLÉ, F., PROMÉ, J-C., 1996. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65:503-535.
- DÉNARIÉ, J., DÉBELLÉ, F., ROSENBERG, C., 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:497-531.
- DENISON, R.F. & HARTER, B., 1995. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. *Plant Physiol.* 107:1355-1364.
- DIAS DEL CASTILLO, L., HUNT, S., LAYZELL, D.B., 1994. The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. *Plant Physiol.* 106:949-955.
- DILWORTH, M.J., ROBSON, A.D., CHATEL, D.L., 1979. Cobalt and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius* L. II. nodule formation and function. *New Phytol.* 83:63-79.
- DIXON, R.O.D. & WHEELER, C.T., 1986. Nitrogen Fixation in Plants. Blackie & Son Ltd, Glasgow, 157p.
- DREVON, J.J., KALIA, V.C., HECKMANN, M.O., SALSAC, L., 1987. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:610-612.
- DREVON, J.J., KALIA, V.C., HECKMANN, M.O., PEDELAHORE, P., 1988A. *In situ* open-flow assay of acetylene reduction

- activity by soybean root nodules: influence of acetylene and oxygen. *Plant Physiol. Biochem.* 26(1):73-78.
- DREVON, J.J., HECKMANN, M.O., SOUSSANA, J.F., SALSAC, L., 1988B. Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* 26(2):197-203.
- DRY, I., WALLACE, W., NICHOLAS, D.J.D., 1981. Role of ATP in nitrite reduction in roots of wheat and pea. *Planta* 152:234-238.
- EAGLESHAM, A.R.J. 1989. Nitrate inhibition of root-nodule symbiosis in doubly rooted soybean plants. *Crop Sci.* 29:115-119.
- EAGLESHAM, A.R.J., HASSOUNA, S., SEEGER, R., 1983. Fertilizer-N effects on N₂ fixation by cowpea and soybean. *Agron. J.* 75:61-66.
- ESCUREDO, P.R., MINCHIN, F.R., GOGORCENA, Y., ITURBE-ORMAETXE, I., KLUCAS, R.V., BECANA, M., 1996. Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiol.* 110:1187-1195.
- FEARN, J.C. & LARUE, T.A., 1991. Ethylene inhibitors restore nodulation to *sym* 5 mutants of *Pisum sativum* L. cv Sparkle. *Plant Physiol.* 96:239-244.
- FEHR, W.R., CAVINESS, C.E., BURMOOD, D.T., PENNINGTON, J.S., 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11:929-931.

- FRANCISCO Jr, P.B. & AKAO, S., 1993. Autoregulation and nitrate inhibition of nodule formation in soybean cv. Enrei and its nodulation mutants. *J. Exp. Bot.* 44(260):547-553.
- FRANCISCO Jr, P.B. & HARPER, J.E., 1995. Translocable leaf signal autoregulates soybean nodulation. *Plant Sci.* 107:167-176.
- FUKUHARA, H., MINAKAWA, Y., AKAO, S., MINAMISAWA, K., 1994. The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant Cell Physiol.* 35(8):1261-1265.
- GIANNAKIS, C., NICHOLAS, D.J.D., WALLACE, W., 1988. Utilization of nitrate by bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean root nodule. *Planta* 174:51-58.
- GIBSON, A.H. & HARPER, J.E., 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 25:497-501.
- GIBSON, A.H. & PAGAN, J., 1977. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta* 134:17-22.
- GIROUSSE, C., BOURNOVILLE, R., BONNEMAIN, J.L., 1996. Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.* 111:109-113.
- GOGORCENA, Y., ITURBE-ORMAETXE, I., ESCUREDO, P.R., BECANA, M., 1995. Antioxidant defenses against activated oxygen in pea

- nodules subjected to water stress. *Plant Physiol.* 108:753-759.
- GOOD, A.G. & CROSBY, W.L., 1989. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol.* 90:1305-1309.
- GOODLASS, G. & SMITH, K.A., 1979. Effects of ethylene on root extension and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Soil* 51:387-395.
- GROBBELAAR, N., CLARKE, B., HOUGH, M.C., 1971. The nodulation and nitrogen fixation of isolated roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta Soil, Special Vol.*:215-223.
- GUINEL, F.C. & LARUE, T.A., 1992. Ethylene inhibitors partly restore nodulation to pea mutant E107 (brz). *Plant Physiol.* 99:515-518.
- HARPER, D.B., 1985. Characterisation of a nitrilase from *Nocardia* sp. using *p*-hydroxybenzonitrile as sole carbon source. *Int. J. Biochem.* 17:677-683.
- HARTWELL, J., BOWSHER, C.G., EMES, M.J., 1996. Recycling of carbon in the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic plastids. *Planta* 200:107-112.
- HARTWING, U., BOLLER, B., NOSBERGER, J., 1987. Oxygen supply limits nitrogenase activity of clover nodules after defoliation. *Ann. Bot.* 59:285-291.
- HECKMANN, M.O. & DREVON, J.J., 1987. Nitrate metabolism in soybean root-nodules. *Physiol. Plant.* 69:721-725.

- HERRIDGE, D.F., 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70:1-6.
- HERRIDGE, D.F. & PEOPLES, M.B., 1990. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ^{15}N methods. *Plant Physiol.* 93:495-503.
- HINSON, K., 1975. Nodulation responses from nitrogen applied to soybean half-root systems. *Agron. J.* 67:799-804.
- HIRSCH, A.M., 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.*, 122:211-237.
- HIRSCH, M. & FANG, Y., 1994. Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol. Biol.* 26:5-9.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I., 1950. The water culture method of growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circular* 347.
- HOCKING, P.J., PATE, J.S., ATIKINS, C.A., SHARKEY, P.J., 1978. Diurnal patterns of transport and accumulation of minerals in fruting of plants of *Lupinus angustifolius* L. *Ann. Bot.* 42:1277-1290.
- HOWAARD, J.B. & REES, D.C., 1994. Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch. *Annu. Rev. Biochem.* 63:235-264.
- HUBER, T.A. & STREETER, J.G., 1985. Purification and properties of asparagine synthetase from soybean root nodules. *Plant Sci.* 42:9-17.

- HUNGRIA, M. 1994. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. R. Bras. Ciênc. Solo 18:339-364.
- HUNGRIA, M., VARGAS, M.A.T., SUHET, A.R., PERES, J.R.R., 1994. Fixação biológica de nitrogênio em soja. IN: Microrganismos de importância agrícola (R.S. Araújo e M. Hungria, eds.), EMBRAPA, Brasília, pp.9-89.
- HUNT, S. & LAYZELL, D.B., 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44:483-511.
- HUNT, S., KING, B.J., LAYZELL, D.B., 1989. Effects of gradual increases in O₂ concentration on nodule activity in soybean. Plant Physiol. 91:315-321.
- HUNTER, W.J., 1993. Ethylene production by root nodules and effect of ethylene on nodulation in *Glycine max*. Appl. Environ. Microbiol., 59:1947-1950.
- IMSANDE, J. & TOURAINÉ, B., 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol. 105:3-7.
- JARRET, H.W., COOKSY, K.D., ELLIS, B., ANDERSON, J.M., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. Anal. Biochem. 153:189-198.
- KANAYAMA, Y., WATANABE, I., YAMAMOTO, Y., 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. ii. Nitrite accumulation and formation of

- spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂. Plant Physiol. 92:1101-1107.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J., 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. IN: The Biochemistry of Plants (P.K. Stumpf and E.E. Conn, eds), Vol 5, Academic Press, New York, pp.569-607.
- LEE, K.H. & LARUE, T.A., 1992. Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv. Sparkle. Plant Physiol. 100:1759-1763.
- LIGERO, F., LLUCH, C., OLIVARES, J., 1986. Evolution of ethylene from roots of *Medicago sativa* plants inoculated with *Rhizobium meliloti*. J. Plant Physiol. 125:361-365.
- LIGERO, F., LLUCH, C., OLIVARES, J., 1987. Evolution of ethylene from roots and nodulation rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants inoculated with *Rhizobium meliloti* as affected by the presence of nitrate. J. Plant Physiol. 129:461-467.
- LIGERO, F., CABA, J.M., LLUCH, C., OLIVARES, J., 1991. Nitrate inhibition of nodulation can be overcome by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. Plant Physiol. 97:1221-1225.
- MAHON, J.D. & CHILD, J.J., 1979. Growth response of inoculated peas (*Pisum sativum*) to combined nitrogen. Can. J. Bot. 57:1687-1693.
- MALAVOLTA, E., 1980. Elementos de Nutrição Mineral de Plantas. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo, 251p.

- MALIK, N.S.A., CALVERT, H.E., BAUER, W.D., 1987. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. *Plant Physiol.* 84:266-271.
- MARSCHNER, H., 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 674p.
- MATSUMOTO, T., YATAZAWA, M., YAMAMOTO, Y., 1977. Effects of exogenous nitrogen-compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 18:613-624.
- MAZELIS, M., 1980. Amino acid catabolism. IN: The Biochemistry of Plants (P.K.Stumpf and E.E. Conn, eds), Vol. 5 , Academic Press, New York, pp.541-568
- McCLURE, P.R. & ISRAEL, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- McCLURE, P.R., ISRAEL, D.W., VOLK, R.J., 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N_2 fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- McNEIL, D.L. & LARUE, T.A., 1984. Effect of nitrogen source on ureides in soybean. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- MENEGUS, F., CATTARUZZA, L., CHERSI, A., FRONZA, G., 1989. Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol.* 90:29-32.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J., 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:299-329.

- MILLER, K. & WOOD, J.M., 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbil.* 50:101-136.
- MINAMISAWA, K., 1989. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Cell Physiol.* 30(6):877-884.
- MINAMISAWA, K. & FUKAI, K., 1991. Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. *Plant Cell Physiol.* 32(1):1-9.
- MINCHIN, F.R. & PATE, J.S., 1974. Diurnal functioning of legume root nodule. *J. Exp. Bot.* 25(85):295-308.
- MINCHIN, F.R., MINGUEZ, M.I., SHEEHY, J.E., WITTY, J.F., SKOT, L. 1986. Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *J. Exp. Bot.* 37(181):1103-1113.
- MINCHIN, F.R., BECANA, M., SPRENT, J.I., 1989. Short-term inhibition of legume N₂ fixation by nitrate II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. *Planta* 180:46-52.
- MIZUKOSHI, K., NISHIWAKI, T., OHTAKE, N., 1995. Nitrate transport pathway into soybean nodules traced by tungstate and ¹⁵NO₃⁻. *Soil Sci. Plant Nutri.* 41(1):75-88.
- MUNNS, D.N., 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil* 29:33-47.

- MURRAY, D.R. & KENNEDY, I.R., 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen metabolism in seed coats and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66:782-786.
- NEVES, M.C.P. & FRANCO, A.A., 1990. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. IN: I Simpósio Brasileiro Sobre Nitrogênio em Plantas, Rio de Janeiro, Brasil, resumos, p29.
- NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M., 1987. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6(3):267-321.
- NORRIS, D.O. & DATE, R.A., 1976. Legume bacteriology. IN: *Tropical Pastures Research; Principles and Methods* (N.H. Shaw and W.W. Bryan, eds), Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Bull. 51 Hurley, England, pp. 134-174.
- OGHOGHORIE, C.G.O. & PATE, J.S., 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.) *Plant Soil Special Vol.*, 185-202.
- OJI, Y., WATANABE, M., WAKIUCHI, N., OKAMOTO, S., 1985. Nitrite reduction in barley root plastids; dependence on NADPH coupled with glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases, and possible involvement of an electron carrier and a diaphorase. *Planta* 165:85-90.
- OZAWA, T. & TSUJI, T., 1993. A possible role for polyamines in the repression of growth of *Bradyrhizobium japonicum*

- bacteroids in soybean nodules. *Plant Cell Physiol.* 34(6):899-904.
- PANKHUST, C.E. & SPRENT, J.I., 1975A. Effects of water of stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. *J. Exp. Bot.* 26:287-304.
- PANKHUST, C.E. & SPRENT, J.I., 1975B. Surface features of soybean root nodules. *Protoplasma* 85:85-98.
- PARSONS, R. & DAY, D.A., 1990. Mechanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant Cell Environ.* 13:501-512.
- PATE, J.S., 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:313-340.
- PATE, J.S., ATKINS, C.A., HAMEL, K., MCNEIL, D.L., LAYZELL, D.B. 1979. Transport of organic solutes in phloem and xylem of a nodulated legume. *Plant Physiol.* 63:1082-1088.
- PATE, J.S., ATKINS, C.A., WHITE, S.T., RAINBIRD, R.M., WOO, K.C., 1980. Nitrogen, nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* 65:961-965.
- PATTERSON, T.G. & LARUE, T.A., 1983. N_2 fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans: Environmental effects and source sink manipulations. *Crop Sci.* 23:819-824.
- PEAT, J.R., MINCHIN, F.R., JEFFCOAT, B., SUMMERFIELD, R.J., 1981A. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soya bean. *Ann. Bot.* 48:177-182.

- PEAT, J.R., SUMMERFIELD, R.J., JEFFCOAT, B., MINCHIN, F.R., 1981B. The role of cotyledons in vegetative growth and nitrogen assimilation by soya bean. *Ann. Bot.* 48:183-187.
- PETERS, N.K. & CRIST-ESTES, D.K., 1989. Nodule formation is stimulated by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. *Plant Physiol.* 91:690-693.
- PIMENTEL-GOMES, F., 1990. *Curso de Estatística Experimental*. 13^a Edição, Livraria Nobel, Piracicaba, 467p.
- PLADYS, D., BARTHE, P., RIGAUD, J. 1988. Changes in intracellular pH in French-bean nodules induced by senescence and nitrate treatment. *Plant Sci.* 56:99-106.
- PUPPO, A. & HALLIWELL, B., 1988. Generation of hydroxyl radicals by soybean nodule leghaemoglobin. *Planta* 173:405-410.
- RAINBIRD, R.M., ATKINS, C.A., PATE, J.S., 1983 Diurnal variation in the functioning of cowpea nodules. *Plant Physiol.* 72:308-312.
- RALSTON, E.J. & IMSAND, J., 1982. Entry of oxygen and nitrogen in intact sybean nodules. *J. Exp. Bot.* 33:208-214.
- RALSTON, E.J. & IMSAND, J., 1983. Nodulation of hydroponically grown soybean plants and inhibition of nodule development by nitrate. *J. Exp. Bot.*, 34:1371-1378.
- REGGIANI, R., CANTÚ, C.A., BRAMBILLA, I., BERTANI, A., 1988. Accumulation and interconversion of amino acids in rice under anoxia. *Plant Cell Physiol.* 29(6):981-987.

- REILLY, M.L., 1990. Nitrate assimilation and grain yield. IN: Nitrogen in Higher Plants (Y.P. Abrol, ed), John Wiley & Sons Inc., New York, pp.335-366.
- RICARD, B., COUÉE, I., RAYMOND, P., SAGLIO, P.H., SAINT-GES, V., PRADET, A., 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* 32(1):1-10.
- RIGAUD, J. & PUPPO, A., 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88:223-228.
- RIGAUD, J. & PUPPO, A., 1977. Effect of nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta* 497:702-706.
- ROBERTS, J.K.M., HOOKS, M.A., MIAULLIS, A.P., EDWARDS, S., WEBSTER, C., 1992. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 98:480-487.
- ROBERTSON, J.G. & FARNDEN, K.J.F., 1980. Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. IN: *The Biochemistry of Plants* (P.K. Stumpf and E.E. Conn, eds), Vol. 5 , Academic Press, New York, pp.65-113.
- ROSENDAHL, L., DILWORTH, M.J., GLENN, A.R., 1992. Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. *J. Plant Physiol.* 139:635-638.
- SAGANUMA, N., YAMAUCHI, H., YAMAMOTO, K., 1995. Enhanced production of ethylene by soybean roots after inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Sci.* 111:163-168.

- SALSAC, L., CHAILLOU, S., MOROT-GAUDRY, J.F., LESAINT, C., JOLIVET, E., 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25(6):805-812.
- SARKISSIAN, G.S. & FOWLER, M.V., 1978. Changes in carbohydrate flux during the induction of nitrate assimilation in plant roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 172:1-13.
- SCHUBERT, K.R., 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:539-574.
- SCOTT, D.B., FARNDEN, K.J.F., ROBERTSON, J.G., 1976. Ammonia assimilation in lupin nodules. *Nature* 263(21):703-705.
- SHERWOOD, J.E., TRUCHET, G.L., DAZZO, F.B., 1984. Effect of nitrate supply on the in-vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium trifolii*-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta* 162:540-547.
- SILVA, D.M. & SODEK, L., 1997. Effect of aluminium on soybean nodulation and nodule activity in vertical split-root system. *J. Plant Nutr.* (in press).
- SINGH, V. & LODHA, M.L., 1989. Nitrate inhibition nodule growth and activity and reversal of inhibition by indole acetic acid in mungbean (*Vigna radiata* L.) inoculated with Hup⁺ and Hup⁻ *Rhizobium* strains. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 184:377-385.
- SMALL, J.G.C. & LEONARD, O.A., 1969. Translocation of ¹⁴C-labelled photosynthates in nodulated legumes as influenced by nitrate nitrogen. *Amer. J. Bot.* 56:187-194.

- SMITH, A.M. & ap REES, T., 1979. Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. *Planta* 146:327-334.
- SMITH, G.B. & SMITH, M.S., 1986. Symbiotic and free-living denitrification by *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50:349-354.
- SODEK, L. & SILVA, D.M., 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 8(3):187-191.
- SODEK, L. & LEA, P.J., 1993. Asparaginase from the testa of developing lupin and pea seeds. *Phytochemistry* 34(1):51-56.
- SPAINK, H. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol. Biol.* 20:977-986.
- SPRENT, J.I., GIANNAKIS, C., WALLACE, W., 1987. Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. *J. Exp. Bot.* 38(192):1121-1128.
- STEPHENS, B.D. & NEYRA, C.A., 1983. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 71:731-735.
- STEWART, G.R. & LARHER, F., 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. IN: *The Biochemistry of Plants* (P.K.Stumpf and E.E. Conn, eds), Vol. 5 , Academic Press, New York, pp.609-635.

- STOKKERMANS, T.J.W. & PETERS, N.K., 1994. *Bradyrhizobium elkanii* lipo-oligosaccharide signals induced complete nodule structures on *Glycine soja* Siebold et Zucc. *Planta* 193:413-420.
- STREETER, J.G., 1972. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants. I. Seasonal variations in soil nitrogen and nitrogen composition of stem exudate. *Agron. J.* 64:311-314.
- STREETER, J.G., 1977. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. *Plant Physiol.* 60:235-239.
- STREETER, J.G., 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* 63:478-480.
- STREETER, J.G., 1981. Effect of nitrate in the rooting medium on carbohydrate composition of soybean nodules. *Plant Physiol.* 68:840-844.
- STREETER, J.G., 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.* 69:1429-1434.
- STREETER, J.G., 1985A. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiol.* 77:321-324.
- STREETER, J.G., 1985B. Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. II. Short term studies with high nitrate supply. *Plant Physiol.* 77:325-328.

- STREETER, J.G., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N_2 fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* 7:1-23.
- STREETER, J.G. & THOMPSON, J.F., 1972. In vivo studies on γ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.) *Plant Physiol.* 49:579-584.
- TAJIMA, S. & LARUE, T.A., 1982. Enzymes for acetaldehyde and ethanol formation in legume nodules. *Plant Physiol.* 70:388-392.
- TANAKA, A., FUJITA, K., TERASAWA, H., 1985. Growth and dinitrogen fixation of soybean root system affected by partial exposure to nitrate. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 31:637-342.
- TRINCHANT, J.C. & RIGAUD, J., 1980. Nitrite inhibition of nitrogenase from soybean bacteroids. *Arch. Microbiol.* 124:49-54.
- TRINCHANT, J.C. & RIGAUD, J., 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1385-1388.
- TRUCHET, G.L. & DAZZO, F.B., 1982. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in presence of combined nitrogen. *Planta* 154:132-138.
- TURGEON, B.G. & BAUER, W.D., 1985. Ultrastruture of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 163:328-349.

- UDVARD, M.K., DAY, D.A., 1989. Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L) root nodules. *Plant Physiol.* 90:982-987.
- VAN WORKUM, W.A.T., VAN BRUSSEL, A.A.N., TAK, T., WIJFFELMAN, C.A., KIJNE, J.W., 1995. Ethylene prevents nodulation of *Vicia sativa* ssp. *nigra* by exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8(2):278-285.
- VANCE, C.P. & HEICHEL, G.H., 1991. Carbon in N_2 fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:373-392.
- VASSILEVA, L. & IGNATOV, G., 1996. Effect of high nitrate concentrations on dicarboxylate transport across the peribacterial membrane of soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 149:222-224.
- VESPER, S.J. & BAUER, W.D., 1985. Studies on the attachment of rhizobia to sybean roots. *Symbiosis* 1:139-162.
- VESSEY, J.K. & WATERER, J., 1992. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant.* 84:171-176.
- VESSEY, J.K., WALSH, K.B., LAYZELL, D.B., 1988A. Oxygen limitation of N_2 fixation in stem-girdled and nitrate-treated soybean. *Physiol. Plant.* 73:113-121.
- VESSEY, J.K., WALSH, K.B., LAYZELL, D.B., 1988B. Can a limitation in phloem supply to nodules account for the

- inhibitory effect of nitrate on nitrogenase activity in soybean? *Physiol. Plant.* 74:137-146.
- VIGUE, J.T., HARPER, J.E., HAGEMAN, R.H., PETERS, D.B., 1977. Nodulation of soybeans grown hydroponically on urea. *Crop Sci.* 17:169-172.
- VINCZE, E., REEVES, J.M., LAMPING, E., FARNDEN, K.J.F., REYNOLDS, P.H.S., 1994. Repression of the L-asparaginase gene during nodule development in *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol. Biol.* 26:303-311.
- VOGELS, D.G. & VAN DER DRIFT, C., 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33:143-157.
- 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.
- WILLIMAS, L.E., DEJONG, T.M., PHILIPS, D.A., 1982. Effect of changes in shoot carbon-exchange rate on soybean root nodule activity. *Plant Physiol.* 69:432-435.
- XIE, Z.P., STAEHELIN, C., VIERHEILING, H., WIEMKEN, A., JABBOURI, S., BROUGHTON, W.J., VÖGELI-LANGE, R., BOLLER, T., 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol.* 108:1519-1525.
- YEMM, E.M. & COCKING, E.C., 1955. Estimation of amino acids by ninhidrin. *Analyst* 80:209-213.

- YU, Y.B. & YANG, S.F., 1979. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* 64:1074-1077.
- YUHASHI, K.I., AKAO, S., FUKUHARA, H., TATENO, E., CHUN, J.Y., STACEY, G., HARA, H., KUBOTA, M., ASAMI, T., MINAMISAWA, K., 1995. *Bradyrhizobium elkanii* induces outer cortical root swelling in soybean. *Plant Cell Physiol.* 36(8):1571-1577.
- ZAAT, S.A.J., Van BRUSSEL, A.A.N., TAK, T., LUGTENBERG, B.J.J., KIJNE, J.W., 1989. The ethylene-inhibitor aminoethoxyvinylglycine restores normal nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* on *Vicia sativa* subsp. *nigra* by suppressing the 'thick and short roots' phenotype. *Planta* 177:141-150.