

SARAH CAROLINE RIBEIRO DE SOUZA

**Alagamento do sistema radicular em soja:
metabolismo de N no nódulo durante o estresse e a
capacidade de recuperação**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SARAH CAROLINE RIBEIRO DE SOUZA

“Alagamento do sistema radicular em soja: metabolismo de N no nódulo durante o estresse e a capacidade de recuperação”

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida pela candidata

Sarah Caroline Ribeiro de Souza

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Doutora em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So89a Souza, Sarah Caroline Ribeiro, 1986-
Alagamento do sistema radicular em soja : metabolismo de N no nódulo durante o estresse e a capacidade de recuperação / Sarah Caroline Ribeiro de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ladaslav Sodek.

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

1. Aminoácidos. 2. Asparagina. 3. Ácido gama-aminobutírico. 4. Nitrogenase. 5. Expressão gênica. I. Sodek, Ladaslav, 1941-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Flooding of the root system in soybean : N metabolism in the nodule during stress and recovery

Palavras-chave em inglês:

Aminoacids

Asparagine

Gamma-aminobutyric acid

Nitrogenase

Gene expression

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Ladaslav Sodek [Orientador]

Halley Caixeta de Oliveira

Gilberto Costa Justino

Ione Salgado

Claudia Regina Baptista Haddad

Data de defesa: 26-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 26 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

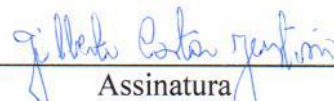
Prof. Dr. Ladaslav Sodek (orientador)


Assinatura

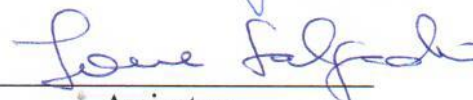
Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira


Assinatura

Prof. Dr. Gilberto Costa Justino


Assinatura

Profa. Dra. Ione Salgado


Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad


Assinatura

Dra. Salete Aparecida Gaziola

Assinatura

Dra. Sara Adrián López de Andrade

Assinatura

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro

Assinatura

1.0 RESUMO

A soja é uma leguminosa amplamente utilizada para estudos envolvendo a fixação biológica de Nitrogênio (N), seja por sua grande importância econômica, seja por sua elaborada capaz de obter todo N necessário para seu desenvolvimento através da e bem sucedida relação simbiótica com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, sendo fixação do N₂ atmosférico. Todavia, o metabolismo de N em plantas de soja noduladas é sensível à hipóxia provocada pelo alagamento do sistema radicular. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo, avaliar os efeitos do alagamento sobre o metabolismo de N em nódulos de soja em diferentes períodos de inundação e recuperação após a drenagem. Para isto, plantas de soja noduladas com o *B. elkanii* foram submetidas aos experimentos de inundação e recuperação, sendo tais períodos variáveis de acordo com o experimento. As alterações no metabolismo foram avaliadas através da análise da composição de aminoácidos por HPLC e avaliação da incorporação de ¹⁵N₂ nos aminoácidos dos nódulos. Também foi avaliada a atividade da nitrogenase e a expressão dos genes *nifH* e *nifD* (nitrogenase), e dos genes que codificam as enzimas glutamato descarboxilase (GAD) e asparagina sintetase (AS) em nódulos de soja. Verificamos que asparagina (ASN) é o aminoácido mais abundante em nódulos de soja (aprox. 50%), seguido por glutamato (GLU), serina (SER) e ácido gama-aminobutírico (GABA). Com a inundação observou-se, uma redução acentuada de ASN, e aumento de GABA, após 4 dias (quando ASN reduziu a quase 1%), além de pequenas alterações na composição de outros aminoácidos. Nos tratamentos de recuperação, verificou-se que ASN recuperou-se lentamente e quanto maior o período de exposição ao estresse mais lento o período de recuperação. Aparentemente a redução de ASN nos nódulos foi compensada pelo aumento de GABA. A atividade da nitrogenase foi fortemente

inibida pela inundação, mas se recuperou totalmente. Quanto à incorporação de $^{15}\text{N}_2$, verificamos que GLN foi o aminoácido marcado em grau mais elevado, seguido respectivamente por GLU, ASP, ALA e SER. A marcação dos aminoácidos ASN e GABA foi baixa, e isso pode ser devido ao grande “pool” destes aminoácidos no nódulo, ou pela entrada destes aminoácidos a partir de uma fonte não-marcada como o floema. Com relação à inundação, observou-se uma redução na incorporação de $^{15}\text{N}_2$ em ASN, e a recuperação também foi lenta, além disso houve redução na incorporação em outros aminoácidos como ASP e GLN. A hipóxia afetou a expressão dos genes avaliados nos nódulos. Houve uma redução na expressão dos genes *AS1* e *AS2*, o que condiz com a redução nos teores de ASN. O gene que codifica a GAD também foi menos expresso em nódulos submetidos à inundação o que não explica o aumento de GABA no nódulo durante o estresse. A expressão dos genes *nifH* e *nifD* também diminuíram com a inundação, mas se recuperaram, e condizem com o observado para atividade da nitrogenase. Dessa forma, verificamos que a inundação afeta o metabolismo de N nos nódulos de soja, em diversos aspectos, como a composição de aminoácidos, a atividade da nitrogenase e na expressão de genes envolvidos na assimilação do N em aminoácidos nos nódulos.

2.0 ABSTRACT

Soybean has been widely used in studies of biological nitrogen fixation, not only because of its economic importance, but in view of its highly efficient symbiotic relationship with rhizobia of the genus *Bradyrhizobium*, which can supply all the N needed for full development of the plant. However, the process is highly sensitive to oxygen deficiency provoked by waterlogging of the root system, resulting in a rapid and strong inhibition of nitrogen fixation since the availability of oxygen for nitrogenase activity is tightly controlled in the nodule and close to limiting under normal conditions. Thus, this study aimed to evaluate the effects of flooding on the N metabolism in nodules of soybean in different periods of flooding and recovery after drainage. For this, soybean plants nodulated with *B. elkanii* were subjected to flooding and recovery experiments at stages V7/V8. The flooding/recovery duration was where the flooding/recovery periods were variable according to the experiment. Changes in metabolism were evaluated by analyzing the amino acid composition by HPLC and by assessing the amino acid incorporation of $^{15}\text{N}_2$ of the nodules. Nitrogenase activity and expression of *nifH* and *nifD* (nitrogenase) genes, and genes encoding GAD and AS in soybean were also evaluated. The most abundant amino acid in soybean nodules was asparagine (ASN) (50%), followed by glutamate (GLU), serine (SER) and gamma-aminobutyric acid (GABA). On flooding, there was a marked decrease of ASN, and increased GABA, mainly after 4 days when ASN dropped to near 1%, as well as smaller alterations in the composition of other amino acids. With the recovery treatments, ASN recovered slowly and the longer the period of exposure to the stress the longer the recovery period. It appears that the reduction of the ASN in nodules is compensated by the increase of GABA. The nitrogenase activity was strongly

inhibited by flooding, but full recovery was possible. Regarding the incorporation of $^{15}\text{N}_2$, it was found that GLN is the amino acid labelled to the highest degree, followed respectively by GLU, ASP, ALA and SER. The labelling of the amino acids GABA and ASN was low, which may be due either to the large pool of these amino acids in the nodule, or to the entry of these amino acids from a non-labelled source such as the phloem. Flooding resulted in a reduction of the incorporation of $^{15}\text{N}_2$ in ASN, and recovery was also slow. There was also reduction in the incorporation of $^{15}\text{N}_2$ in other amino acids, such as Asp and GLN. Hypoxia affected the expression of all genes evaluated in nodules. There was a reduction in the expression of the AS1 and AS2 genes, which is consistent with the fall in levels of ASN. Recovery of expression was slow and gradual. Expression of the gene encoding the enzyme GAD was also strongly suppressed in nodules under flooding which does not therefore explain the increase of GABA in the nodule during stress. The expression of nifH and nifD genes were also strongly decreased on flooding, but recovered fully, consistent with the observed data for nitrogenase activity. In conclusion, it was found that flooding affects the metabolism of N in soybean nodules, in diverse ways, such as the amino acid composition, nitrogenase activity, and the expression of genes involved in N assimilation of nodule amino acids.

SUMÁRIO

1.0 RESUMO	vii
2.0 ABSTRACT	ix
3.0 ABREVIATURAS	xxi
4.0 INTRODUÇÃO GERAL	23
5.0 REVISÃO DE LITERATURA	25
5.1 Soja.....	25
5.2 Assimilação de N pelas plantas.....	26
5.3 Fixação de N e atividade dos nódulos nas leguminosas.....	27
5.4 Assimilação do N a partir da FBN e formação dos compostos nitrogenados nos nódulos de soja	28
5.5 Alagamento dos solos e efeito sobre o metabolismo de N e sobre a FBN	31
6.0 JUSTIFICATIVA.....	35
7.0 OBJETIVO GERAL.....	35
8.0 CAPÍTULO I: EFEITOS DE DIFERENTES PERÍODOS DE INUNDAÇÃO E RECUPERAÇÃO NO PERFIL DE AMINOÁCIDOS EM PLANTAS DE SOJA NODULADA	37
8.1 INTRODUÇÃO.....	37
8.2 OBJETIVOS.....	40
8.2.1 Objetivo geral.....	40
8.2.2 Objetivos específicos.....	40

8.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
8.3.1 Condições de cultivo	41
8.3.2 Montagem dos experimentos e coleta do material vegetal.....	42
8.3.3 Experimentos.....	42
8.3.3.1 Expto. I: Inundação por períodos curtos (5 minutos a 6 horas).....	42
8.3.3.2 Expto. II: Inundação em períodos prolongados (4 horas a 5 dias)	43
8.3.3.3 Expto. III: Inundação por períodos prolongados e recuperação.....	43
8.3.3.4 Expto. IV: Inundação por períodos prolongados (1 a 5 dias) e recuperação, análise do xilema.....	44
8.3.3.5 Expto. V: Inundação por períodos prolongados (1 a 8 dias) e recuperação, análise dos nódulos e floema	44
8.3.3.6 Expto. VI: Inundação e recuperação em solução com e sem NO_3^-	46
8.3.3.7 Expto. VII: Atividade da nitrogenase, após inundação e recuperação	47
8.3.4 Coleta da seiva do xilema.....	48
8.3.5 Coleta da seiva do floema	48
8.3.6 Coleta dos nódulos	49
8.3.7 Solução nutritiva	49
8.3.8 Replicação e manutenção dos rizóbios.....	50
8.3.9 Análises bioquímicas.....	51
8.3.9.1 Extração dos nódulos	51
8.3.9.2 Determinação do teor de aminoácidos livres totais	52
8.3.9.3 Determinação do teor de açúcares solúveis totais (AST) e amido	52
8.3.9.4 Determinação do teor de sacarose	53
8.3.9.5 Determinação do teor de ureídeos	54
8.3.10 Análise do perfil de aminoácidos por HPLC.....	54
8.3.11 Atividade da nitrogenase.....	56
8.3.12 Delineamento experimental e análise dos dados.....	58

8.4 RESULTADOS	59
8.4.1 Experimento I: Aminoácidos do nódulo após inundação por períodos curtos (até 6 horas)	59
8.4.2 Experimento II: Aminoácidos do nódulo após inundação por períodos prolongados (até 5 dias).....	60
8.4.3 Experimento III: Aminoácidos do nódulo após inundação por períodos prolongados e recuperação	62
8.4.4 Experimento IV: Aminoácidos do xilema após inundação por períodos prolongados (1 a 5 dias) e recuperação	64
8.4.5 Experimento V: Aminoácidos dos nódulos e floema após inundação por períodos prolongados (1 a 8 dias) e recuperação	68
8.4.6 Experimento VI: Aminoácidos do nódulo, raiz e xilema após inundação e recuperação na presença e ausência de NO ₃ ⁻	74
8.4.7 Experimento VII: Atividade da nitrogenase após inundação e recuperação	82
8.5 DISCUSSÃO	83
8.6 CONCLUSÕES	93
9.0 CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS PRODUZIDOS NO NÓDULO A PARTIR DA FBN EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO DO SISTEMA RADICULAR E RECUPERAÇÃO PÓS ESTRESSE ATRAVÉS DA ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO DO ¹⁵ N.....	95
9.1 INTRODUÇÃO.....	95
9.2 OBJETIVOS.....	97
9.2.1 Objetivo geral.....	97
9.2.2 Objetivos específicos.....	97
9.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	98

9.3.1 Montagem dos experimentos: incubação com $^{15}\text{N}_2$ em vasos Qubit®	98
9.3.2 Experimentos.....	100
9.3.2.1 Expto. I: Avaliação do tempo de incubação com $^{15}\text{N}_2$ em plantas controle (não-inundadas):	100
9.3.2.2 Expto. II: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo após inundação e recuperação em plantas incubadas posteriormente com $^{15}\text{N}_2$:.....	100
9.3.2.3 Expto. III: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo em plantas previamente incubadas com $^{15}\text{N}_2$ e submetidas à inundação	101
9.3.2.4 Expto. IV: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos em plantas incubadas com $^{15}\text{N}_2$ após tratamento de inundação e recuperação, aperfeiçoando o método de incubação	101
9.3.2.5 Expto. V: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos e na seiva do xilema de plantas incubadas em diferentes tempos com $^{15}\text{N}_2$	102
9.3.3 Análises bioquímicas.....	103
9.3.3.1 Extração em ácido sulfosalicílico a 2% e eluição dos aminoácidos em coluna Dowex 50Wx8 H ⁺	103
9.4 RESULTADOS	107
9.4.1 Expto. I: Avaliação do tempo de incubação com $^{15}\text{N}_2$ em plantas controle (não-inundadas):	107
9.4.2 Expto. II: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo após inundação e recuperação em plantas incubadas posteriormente com $^{15}\text{N}_2$	109
9.4.3 Expto. III: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo em plantas previamente incubadas com $^{15}\text{N}_2$ e submetidas à inundação	112
9.4.4 Expto. IV: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos em plantas incubadas com $^{15}\text{N}_2$ após tratamento de inundação e recuperação, aperfeiçoando o método de incubação	115
9.4.5 Expto. V: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos e na seiva do xilema de plantas incubadas em diferentes tempos com $^{15}\text{N}_2$	116
9.5 DISCUSSÃO	119
9.6 CONCLUSÕES	127

10.0 CAPÍTULO III: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS ASPARAGINA SINTETASE, GLUTAMATO DESCARBOXILASE E NITROGENASE EM NÓDULOS DE PLANTAS DE SOJA DURANTE A INUNDAÇÃO E RECUPERAÇÃO	129
10.1 INTRODUÇÃO.....	129
10.2 OBJETIVO.....	131
10.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	132
10.3.1 Montagem do experimento e coleta dos nódulos	132
10.3.2 Análise da expressão gênica por qRT-PCR	133
10.3.2.1 Obtenção das sequências e desenho dos iniciadores (primers):	133
10.3.2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA	138
10.3.2.3 qRT-PCR e teste de eficiência dos primers.....	138
10.3.3 Delineamento experimental e análise dos dados	139
10.4 RESULTADOS	140
10.5 DISCUSSÃO	144
10.6 CONCLUSÕES	149
11.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
12.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

DEDICATÒRIA

Aos meus pais Elio e Geralda, que não pouparam esforços para que hoje eu pudesse completar este trabalho, e ao Tomás pelo amor, companheirismo e por toda ajuda e suporte na execução deste trabalho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, fé, força, sabedoria e por estar sempre presente em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

À Universidade Estadual de Campinas, ao Instituto de Biologia e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para a realização deste curso.

Ao meu orientador Ladaslav Sodek, pela oportunidade, pela valiosa orientação, pela amizade, por sua serenidade e confiança que em muitos momentos foram fundamentais. Por sua gentileza, humildade, e muitos outros adjetivos que fazem com que seja, para mim, um exemplo de ser humano.

Aos membros da pré-banca, Cláudia Baptista Haddad, Halley Caixeta Oliveira e Gilberto Costa Justino, pelas valiosas e fundamentais críticas e sugestões a este trabalho, e pelo carinho e dedicação.

Aos membros da banca, Ione Salgado, Cláudia Baptista Haddad, Halley Caixeta Oliveira e Gilberto Costa Justino, pela disposição e por participarem da banca examinadora.

Ao professor Paulo Mazzafera, pela confiança e por disponibilizar do laboratório para realização das análises moleculares.

A todos os professores do Departamento, pelos ensinamentos e experiência.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pelo auxílio na realização dos experimentos, principalmente ao Luciano Pereira que me ajudou bastante na

realização deste trabalho, e a Dulcinéia, pela ajuda e disposição, especialmente com as análises de laboratório.

A todos os colegas e amigos do Departamento, pela ajuda, companheirismo e amizade.

Ao Adilson e a Flávia, pelos ensinamentos e pela ajuda fundamental nas análises moleculares, e pela amizade.

À toda minha família, em especial aos meus pais Elio e Geralda, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelo exemplo, e por sempre estarem presentes.

Ao Tomás pelo companheirismo, amor, compreensão, por estar sempre presente partilhando os bons e maus momentos e pela ajuda essencial na realização dos experimentos.

A todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

3.0 ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

ALA - Alanina

AlaAT – Alanina aminotransferase

ARG- Arginina

AS – Asparagina sintetase

ASN - Asparagina

ASP - Aspartato

ATP – Adenosina trifosfato

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

g.MF- grama de massa fresca

GABA - Ácido gamma-aminobutírico

GAD – Glutamato descarboxilase

GC/MS – Cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas

GLN – Glutamina

GLU - Glutamato

GLY – Glicina

GOGAT – Glutamato sintase

GS – Glutamina sintetase

HIS – Histidina

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho

ILE - Isoleucina

LEU - Leucina

LYS - Lisina

MET - Metionina

N – Nitrogênio

NADH/NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

O₂ – Oxigênio molecular

PHE - Fenilalanina

RN – Redutase do nitrato

SER - Serina

TCA- Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

THR – Treonina

TYR – Tirosina

URE – Ureídeos

VAL - Valina

4.0 INTRODUÇÃO GERAL

O Nitrogênio (N) é o nutriente mineral requerido em maior quantidade pelas plantas, sendo um constituinte importante em diversas moléculas essenciais ao desenvolvimento vegetal, como aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila e proteínas (Mengel *et al.*, 2001). Por este fato, é também um dos principais fatores que limitam o desenvolvimento vegetal. Assim, mecanismos de captura e assimilação de nitrogênio devem ser eficientes. Neste sentido, muitas espécies de plantas da família Leguminosae, são capazes de se associar simbioticamente a bactérias do grupo *Rhizobia* e fixar o N₂ atmosférico.

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa de origem asiática amplamente difundida pelo mundo, devido ao seu potencial uso na alimentação humana e animal, sendo o Brasil e os Estados Unidos os maiores produtores desta cultura (Food And Agricultural Organization of United Nations, 2013). Plantas de soja têm sido usadas como modelo nos estudos que envolvem o metabolismo de N, por seu rápido crescimento, sua grande importância econômica, elevado conteúdo proteico, e pela sua elaborada e bem sucedida relação simbiótica com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, sendo capaz de obter todo N necessário para seu desenvolvimento através fixação biológica do N atmosférico (FBN)(Hungria *et al.*, 2001; Alves, *et al.*, 2003).

O alagamento do solo é um fenômeno frequente, principalmente em solos compactados ou com deficiência de drenagem natural. Nesta situação, a troca gasosa entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo fica bastante prejudicada, devido à baixa taxa de difusão de gases no meio aquoso (Armstrong *et al.*, 1994). A baixa disponibilidade de

O₂ para o sistema radicular num campo alagado faz com que o processo de respiração das raízes consuma todo o O₂ presente no solo, tornando o meio anaeróbico (Huang *et al.*, 1994).

Plantas noduladas, sob condições de alagamento apresentam taxas de fixação de N₂ muito baixas, o que é atribuído principalmente à baixa disponibilidade de O₂ para os nódulos (Pugh *et al.*, 1995; Amarante & Sodek, 2006).

Dessa forma, o foco deste trabalho foi avaliar as alterações metabólicas relacionadas à FBN causadas pelo estresse por alagamento (baixo O₂).

5.0 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa da subfamília Faboideae que é capaz de se associar a bactérias fixadoras de N. Esta espécie é originária da Ásia, e atualmente é cultivada em grandes quantidades nas Américas, principalmente nos Estados Unidos e no Brasil, maiores produtores desta cultura que hoje movimentam milhões no mercado de grãos. Atualmente o Brasil é o maior produtor de grãos desta leguminosa (Food And Agricultural Organization of United Nations, 2013). Das plantas de soja são obtidos diversos produtos, dentre eles a farinha e o óleo que é o principal destino dos grãos. Por ser rica em proteínas, a soja é bastante utilizada na alimentação humana (grãos) e também na alimentação animal. Leguminosas como a soja são usadas como adubo verde, quando plantadas em consórcio com outras espécies não fixadoras de N como milho, em rotação de culturas e na forragem animal. No caso do cultivo da soja no Brasil, a fixação de nitrogênio é explorada ao máximo (Dobereiner, 1990; Hungria *et al.*, 2001) com enormes benefícios econômicos, resultando numa grande economia, devido a não utilização de adubos nitrogenados, os quais são extremamente custosos para a produção (Dobereiner, 1997; Hungria *et al.*, 2001).

A simbiose existente entre plantas de soja e as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (*B. elkanii* e *B. japonicum*) é uma das mais eficientes de que se tem conhecimento. No Brasil, plantas de soja noduladas não necessitam de adubação nitrogenada e podem fixar de 109 a 250 Kg de N₂/ha.ano representando de 70% a 85% do N total acumulado pelas plantas (Hungria *et al.*, 2001).

O uso do adubo nitrogenado no cultivo da soja, utilizando-se nitrato, amônio ou ureia, representa um grande desperdício de recursos, tendo em vista a forte inibição exercida pelo nitrato sobre o processo de formação do nódulo e a sua principal atividade metabólica, a fixação do N_2 (Streeter, 1988). Em algumas situações, entretanto, o uso do nitrato pode ser benéfico, por exemplo, em campos alagados, pois o nitrato aumenta a tolerância da planta ao encharcamento do sistema radicular (De Sousa & Sodek, 2002).

5.2 Assimilação de N pelas plantas

O N é um fator limitante ao desenvolvimento das plantas, por ser requerido em grandes quantidades pelas mesmas. A maioria do N que existe está na forma molecular na atmosfera (Kneip *et al.*, 2007). As plantas só adquirem N na forma mineral (nitrato - NO_3^- e amônia - NH_4^+), ou na forma orgânica [ureia - $(NH_2)_2CO$ e aminoácidos] (Williams & Miller, 2001). No caso de plantas simbióticas, os bacterióides formados nos nódulos são capazes de fixar o N molecular (N_2) e convertê-lo em NH_4^+ , que então será assimilado (Liu *et al.*, 2011). Desde a absorção à assimilação e transporte do N para as folhas, algumas etapas são necessárias, as quais vão depender da fonte de N e da espécie em estudo.

As fontes inorgânicas, nitrato e amônia, podem ser prontamente absorvidas e assimiladas. A amônia absorvida é assimilada na raiz e nódulos via glutamina sintetase (GS), já o nitrato absorvido pode ser assimilado via redutase do nitrato (RN) tanto nas raízes, quanto pode ser transportado para a parte aérea via xilema e então ser assimilado também pela RN (Miller & Cramer, 2004).

Quanto às formas orgânicas, aminoácidos também são prontamente absorvidos e assimilados. No caso da ureia, ainda no solo a maior parte é transformada em nitrato e/ou amônia por bactérias, e estas formas inorgânicas são absorvidas e assimiladas como descrito anteriormente (White, 2011).

Na FBN, o N₂ atmosférico é convertido à amônia que logo é incorporada em aminoácidos e ureídeos (em sua maior parte), que são transportados pelo xilema para a parte aérea (Shubert, 1986).

5.3 Fixação de N e atividade dos nódulos nas leguminosas

As raízes de muitas leguminosas, como por exemplo a soja, são capazes de formar nódulos radiculares por estabelecerem uma associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes ao grupo *Rhizobium* (Udvardi *et al.*, 1992; Balestrasse *et al.*, 2006).

No processo para a formação dos nódulos, ocorre inicialmente uma complexa troca de sinais entre as raízes das plantas hospedeiras e as bactérias fixadoras. As raízes liberam compostos, como os flavonóides, os quais ativam genes das bactérias conhecidos como fatores de nodulação (D'Haese & Hosters, 2002). Esses fatores de nodulação são essenciais durante a invasão das células através dos pelos radiculares pelas bactérias e para a indução da divisão das células do córtex da raiz, que iniciarão a formação do nódulo (Dakora, 2000; Geurts & Bisseling, 2002; Broughton, 2003). Dentro dos nódulos as bactérias sofrem um processo de transformação dentro das membranas peribacteróides (Day *et al.*, 1989) e passam então a ser chamadas de bacteróides (Gage, 2004). As células infectadas são

rodeadas por tecido radicular não infectado que contém tecido vascular (xilema e floema), que mantem o fluxo de metabólitos nos nódulos (Atkins, 1987).

A nitrogenase atua no interior dos bacterióides dentro dos nódulos radiculares num ambiente de baixa concentração de O_2 , uma vez que esta enzima é extremamente sensível à presença de O_2 (Layzell & Hunt, 1990; Lucinski *et al.*, 2002). Esta condição é obtida graças à presença de uma camada de células que forma uma barreira de difusão ao O_2 (Minchin, 1997) e também à presença da leghemoglobina que tem uma alta afinidade com o O_2 e realiza o transporte do mesmo dentro das células, reduzindo a concentração de O_2 livre (Appleby, 1984). O controle do fluxo de O_2 é tão fortemente regulado nas células infectadas que chega a limitar a respiração no bacterióide (Hunt & Layzell, 1993). Entretanto esta condição cria um paradoxo, já que a nitrogenase utiliza níveis elevados de ATP durante a fixação do N_2 , o qual é obtido através do processo de respiração aeróbica. A planta precisa manter ao mesmo tempo um alto fluxo de O_2 para a síntese do ATP e evitar que a nitrogenase seja inativada pela presença de O_2 criando um ambiente livre deste elemento (Downie, 2005).

5.4 Assimilação do N a partir da FBN e formação dos compostos nitrogenados nos nódulos de soja

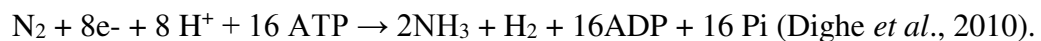
Na FBN o N_2 atmosférico é convertido a amônia pela ação da enzima nitrogenase presente nos bacterióides dos nódulos radiculares, que é a enzima chave para que este processo ocorra.

A enzima nitrogenase é um complexo enzimático formado por dois tipos de subunidades ou componentes (proteínas), o componente I, a nitrogenase propriamente dita,

também é denominada proteína ferro-molibdênio (FeMo), a qual catalisa a redução do N₂, e o componente II, a dinitrogênio redutase, também denominada Fe-proteína a qual transfere os elétrons de um doador para a proteína de FeMo. A enzima só é ativa quando as duas subunidades encontram-se associadas (Kim & Rees, 1994; Andrews *et al.*, 2009).

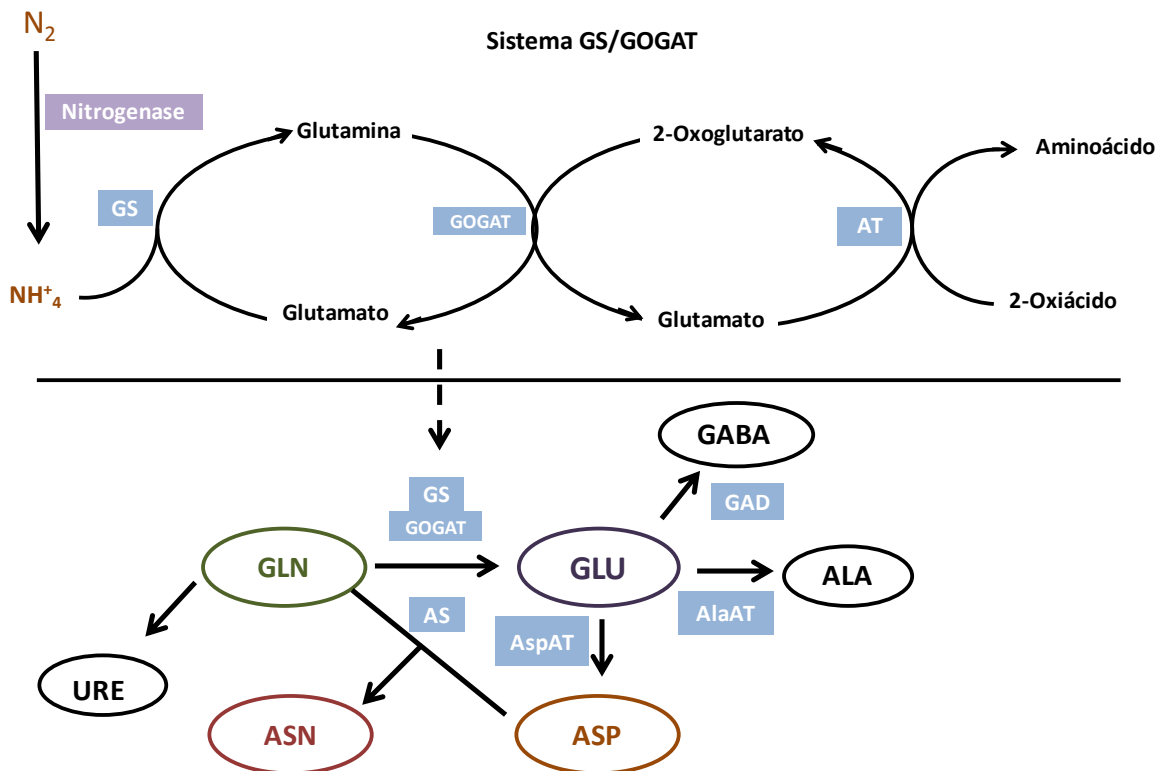
A proteína FeMo ou componente I é uma proteína tetramérica do tipo $\alpha_2\beta_2$ (quatro cadeias polipeptídicas com duas sequências diferentes). Cada dímero $\alpha\beta$ liga um centro FeMo (que é o local onde o N₂ é reduzido) a um centro de FeS. As subunidades α e β do componente I são produtos dos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente. A Fe-proteína ou componente II é um homodímero, que se liga a um centro de FeS, e é codificada pelo gene *nifH*. A nitrogenase clássica é, dessa maneira, codificada pelo complexo gênico *nifHDK* (Kim & Rees, 1994; Marin *et al.*, 1998; Andrews *et al.*, 2009).

A nitrogenase catalisa a quebra da tripla ligação altamente estável do nitrogênio molecular (N₂). Nesse processo muita energia é consumida e a amônia é produzida como descrito na seguinte reação:



A amônia produzida é protonada (NH₄⁺) e rapidamente assimilada pela enzima glutamina sintetase (GS) acoplada à glutamato sintase (GOGAT) (Lam *et al.*, 1996). A GS catalisa a aminação do aminoácido GLU produzindo GLN com gasto de ATP. A GLN sintetizada pode ser transportada para a parte aérea pelo xilema, ou pode ser utilizada para a síntese de outros aminoácidos como ASN ou na síntese dos URE dentro do nódulo. A GOGAT catalisa a transferência do grupo amino da GLN para o 2-oxoglutarato produzindo duas moléculas de GLU (Lancien *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2009).

O GLU pode ser utilizado para a síntese de outros aminoácidos por transaminação (Forde & Lea, 2007), como ASP através da enzima aspartato aminotransferase, GABA pela enzima glutamato descarboxilase, e ALA pela enzima alanina aminotransferase (Lea & Azevedo, 2007). ASP junto com GLN (doador do grupo amino) são utilizados para síntese de ASN pela asparagina sintetase (AS) (Lea & Fowden, 1975; Lea & Azevedo, 2007).



Esquema 01: Fixação do N₂ atmosférico em amônia pela nitrogenase e assimilação da amônia em glutamina (GLN) pelo sistema GS/GOGAT (glutamina sintase/glutamato sintetase) e formação dos demais aminoácidos. ASN= asparagina; GLU= glutamato; ASP= aspartato; ALA= alanina; SER= serina; GABA= ácido-gama-amino butírico; URE= ureídeos. AT= aminotransferase; AS= asparagina sintetase; AspAT= aspartato aminotransferase; AlaAT= alanina aminotransferase; GAD= glutamato descarboxilase.

Os ureídeos alantoína e alantoato (ácido alantóico) são as principais moléculas transportadoras de N em plantas fixadoras de N nas regiões tropicais (da tribo *Phaseoleae*),

como a soja (Atkins, 1987). Apresentam uma alta proporção N:C = 1:1, sendosintetizados nos nódulos e enviados à parte aérea via xilema, e considerados indicadores da fixação biológica (McClure *et al.*, 1980). A produção destes compostos é complexa e começa a partir da inosina monofosfato (IMP) e guanina proveniente da degradação das purinas. A IMP é convertida pela xantina oxidase a xantina, que é então convertida a ácido úrico, também pela xantina oxidase. O ácido úrico formado é convertido a alantoína via ácido úrico oxidase (uricase). Alantoína pode ser transformada em alantoato, via alantoinase (Smith & Atkins, 2002; Zrenner, *et al.*, 2006).

A natureza do transporte de N é variável entre plantas simbióticas e não simbióticas e com a fonte de nitrogênio utilizada. Plantas de soja simbióticas transportam mais de 80% dos compostos nitrogenados na forma de ureídeos (Atkins, 1987; Schubert *et al.*, 1995), enquanto que a versão não-simbiótica da soja transporta principalmente ASN e outros aminoácidos e o nitrato (Amarante *et al.*, 2006). Apesar da predominância dos ureídeos na soja simbiótica, a quantidade de aminoácidos transportados no xilema é significativa, sendo próxima da quantidade transportada na soja não-simbiótica (Amarante & Sodek, 2006).

5.5 Alagamento dos solos e efeito sobre o metabolismo de N e sobre a FBN

A baixa disponibilidade de O₂ devida ao alagamento dos solos é bastante comum, principalmente em solos muito compactados, com deficiência natural de drenagem, ou pelo excesso de irrigação, e afeta a maioria das plantas em algum estágio de vida (Jackson *et al.*, 1982; Kennedy *et al.*, 1992). Nesta situação, as trocas gasosas entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo ficam bastante prejudicadas, devido à baixa taxa de difusão de O₂ por exemplo, que é cerca de 10⁴ vezes menor na água do que no ar (Armstrong *et al.*, 1994)

e a sua concentração 30 vezes menor (Thomson & Greenway, 1991). O esgotamento do O₂ nos solos pode ocorrer dentro de 24 horas de inundação, devido ao consumo por microorganismos e pelas raízes das plantas (Armstrong *et al.*, 1994).

Quando a concentração de O₂ presente se torna insuficiente para manter a taxa normal de respiração do sistema radicular o sistema entra no estado de hipóxia. A hipóxia prejudica a respiração da raiz e nódulos gerando declínio na taxa de ATP/ADP, restringindo a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a produção de ATP (Dennis *et al.*, 2000; Irfan *et al.*, 2010).

Plantas noduladas sob condições de alagamento apresentam taxas de fixação muito baixas, o que é atribuído principalmente à baixa disponibilidade de O₂ para os nódulos devido à redução das taxas respiratórias que conseqüentemente leva à redução de ATP e da atividade da nitrogenase (Pugh *et al.*, 1995; Justino & Sodek, 2013). Alterações morfológicas (Thomas *et al.*, 2005), bioquímicas (Lima & Sodek, 2003; Justino & Sodek, 2013), metabólicas (Rocha *et al.*, 2010a) e moleculares (Antunes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2010a) ocorrem em decorrência do estresse hipóxico nas raízes e nódulos, provavelmente na tentativa do sistema planta-rizóbio atenuar os efeitos do estresse.

Em soja não-nodulada foram observadas alterações na composição de aminoácidos nas raízes havendo, principalmente, redução de ASP e aumento acentuado de ALA (De Souza & Sodek, 2002; Oliveira & Sodek, 2013), além de a atividade da alanina aminotransferase nas raízes (AlaAT) ser altamente ativada sob hipóxia (De Sousa & Sodek, 2003; Limami *et al.*, 2008, Rocha *et al.*, 2010b), o que corrobora o alto teor de ALA, que está diretamente ligado aos processos fermentativos na raiz.

Rocha *et al.* (2010a) mostraram que o acúmulo de ALA pela AlaAT em raízes de *Lotus japonicum* nodulada sob hipóxia ocorre independentemente da habilidade da planta em fixar N₂ pela interação com o rizóbio, uma vez que estes autores também demonstraram que a expressão do gene *nifH*, responsável pela síntese da Fe-proteína do complexo enzimático nitrogenase no rizóbio é fortemente reduzida sob hipóxia. Além disso, estes mesmos autores verificaram redução na expressão do gene que codifica a GS nos nódulos de *L. japonicum*, demonstrando junto com a redução da expressão do *nifH* a influência negativa da hipóxia sobre a FBN.

Atkins *et al.* (1990) trabalhando com efeito da baixa pressão de O₂ sobre nódulos e FBN de feijão-de-corda, não verificaram alterações na atividade da GS em hipóxia, sugerindo que a assimilação de amônia em GLN permanece elevada. No entanto, observaram redução da atividade de GOGAT, o que indica redução na eficiência da transferência do grupo amina de GLN para o GLU. Também observaram diminuição no teor de URE sob baixa concentração de O₂ (1%), apesar de não terem sido observadas alterações nas atividades das enzimas uricase e alantoinase envolvidas na síntese destes compostos.

Estudos com plantas de soja noduladas sob condições de hipóxia, também demonstraram alterações bioquímicas, enzimáticas e moleculares. Na seiva do xilema de soja nodulada em hidroponia, também foi observada a redução dos teores de URE e redução nos teores de GLN, alterações fortemente associadas à redução na FBN (Amarante & Sodek 2006), devido à diminuição da atividade da nitrogenase sob hipóxia (Justino & Sodek, 2013). Além disso, plantas de soja em hidroponia apresentaram menor atividade de enzimas AS nos nódulos quando comparadas às plantas mantidas em vermiculita (Lima &

Sodek, 2003), e a expressão da isoforma *SAS1* que codifica a AS foi reduzida em nódulos de plantas de soja, também em condições de hidroponia (Antunes *et al.*, 2008).

Apesar dos dados sobre hipóxia em soja nodulada relatados acima, são escassos os estudos que avaliem os efeitos da hipóxia sobre a FBN e sobre o metabolismo de N nos nódulos desta leguminosa.

6.0 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância do metabolismo de N para as plantas em geral, da relevância agrônômica da soja no contexto mundial, além da importância da FBN principalmente nesta leguminosa, estudos que avaliem os efeitos de estresses sobre o metabolismo de N, são de extremo interesse. No que diz respeito ao estresse por alagamento avaliado neste trabalho, existem alguns estudos, muitos desenvolvidos neste laboratório, que avaliaram seu efeito sobre a soja. Contudo, poucos avaliaram os efeitos nos nódulos, estruturas onde ocorre a FBN. Assim sendo, este trabalho visa contribuir para o melhor entendimento dos efeitos do alagamento ao metabolismo de N nos nódulos de soja e conseqüentemente sobre FBN.

7.0 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a resposta do metabolismo de nitrogênio nos nódulos em plantas de soja com o sistema radicular alagado e após drenagem e recuperação.

8.0 CAPÍTULO I: EFEITOS DE DIFERENTES PERÍODOS DE INUNDAÇÃO E RECUPERAÇÃO NO PERFIL DE AMINOÁCIDOS EM PLANTAS DE SOJA NODULADA

8.1 INTRODUÇÃO

O alagamento dos solos é um fenômeno comum em diversos tipos de solos, sendo que na maioria das vezes o alagamento ocorre por um curto período de tempo, em função das chuvas ou irrigação excessiva combinadas com solos compactos (Sairam *et al.*, 2008). Raízes e nódulos ficam sujeitos à baixa disponibilidade de O₂, a hipóxia, o que leva à diminuição da atividade respiratória e conseqüentemente da produção de ATP (Dennis *et al.*, 2000).

As conseqüências da deficiência de O₂ vão depender de diversos fatores tais como: o tipo de tecido, o estágio de desenvolvimento, a duração do estresse e da interação com outros fatores ambientais (luz, temperatura) (Fukao & Serres, 2004).

A FBN é bastante sensível às condições de deficiência de O₂ provocadas pela inundação (Amarante & Sodek, 2006). Ao inundar o sistema radicular nodulado, a FBN parece ser prejudicada quase imediatamente. Isto provavelmente se deve ao fato de o O₂ ser o fator limitante da enzima nitrogenase em condições normais (Layzell *et al.*, 1990). Após o alagamento do sistema radicular a disponibilidade de O₂ para o nódulo é muito mais baixa do que em condições não-alagadas, o que provoca uma queda na atividade da nitrogenase.

Uma vez que o processo respiratório é afetado pela ausência do O₂, o qual é o aceptor final de elétrons, há um acúmulo dos intermediários do ciclo de Krebs, e o processo fermentativo é estimulado, a planta então reduz o piruvato produzido na glicólise a lactato e em maior proporção a etanol (que se difunde para exterior celular) oxidando NADH a NAD⁺ (Dennis *et al.*, 2000; Sairam *et al.*, 2008). O processo fermentativo é fundamental para regeneração do NAD⁺ que é usado na glicólise, mantendo assim a produção anaeróbica de ATP (Dennis *et al.*, 2000).

O estresse causado pela deficiência de O₂ provoca uma série de mudanças em toda planta. Com a redução do processo respiratório aeróbio há uma queda acentuada na produção de ATP e aumento do processo fermentativo (Fukao & Serres, 2004). A redução de energia disponível para as reações, contribui para a redução drástica da atividade da enzima nitrogenase nos nódulos, pois o processo realizado pela mesma requer bastante energia (Shubert, 1986).

Com a redução da atividade da nitrogenase e conseqüentemente redução da FBN em soja, há redução imediata no teor do aminoácido glutamina (GLN) na seiva do xilema, pois a glutamina é produto direto da FBN e pode ser usada como indicador do processo (Justino & Sodek, 2013). Também é observada, em proporção similar, a redução dos ureídeos, conhecidos produtos específicos da FBN (McClure *et al.*, 1980; McNeil & LaRue, 1984; Herridge *et al.*, 1990).

Nas raízes de soja, sabe-se que a hipóxia leva a um aumento no teor do aminoácido alanina (ALA), principalmente, o qual se acumula nessas condições (De Sousa & Sodek, 2003). Também há aumento de ALA nos nódulos, mas em menor proporção (Amarante &

Sodek, 2006). Na seiva do xilema é observado aumento de ALA, assim como na raiz (De Sousa & Sodek, 2003; Justino & Sodek, 2013).

A adição de nitrato durante o alagamento tem sido descrita como um fator de tolerância em plantas de soja noduladas (Thomas, *et al.*, 2005) e não-noduladas (Lanza *et al.*, 2013), contribuindo para maior proporção de biomassa além do aumento dos níveis de ALA nas raízes, uma vez que o nitrato é absorvido pelas raízes mesmo em condições de hipóxia (Antunes, 2007; Lanza *et al.*, 2013; Oliveira, *et al.*, 2013b). Contudo, pouco se sabe sobre o efeito do nitrato nos nódulos (Thomas, *et al.*, 2005), ou sobre a FBN durante o alagamento.

Diversos estudos têm demonstrado o efeito do alagamento sobre o metabolismo de nitrogênio em soja (De Sousa & Sodek, 2003; Amarante & Sodek, 2006; Justino & Sodek, 2013; Lanza *et al.*, 2013; Oliveira, *et al.*, 2013b). No entanto poucos estudos enfatizam o efeito da deficiência de O₂ nos nódulos, principalmente em relação ao metabolismo de nitrogênio em consequência do conhecido impedimento da FBN.

8.2 OBJETIVOS

8.2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do alagamento sobre o metabolismo de aminoácidos em plantas de soja em diferentes períodos de inundação e recuperação após a drenagem.

8.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade de recuperação do metabolismo após remoção do estresse
- Determinar o efeito do alagamento sobre a atividade da nitrogenase.
- Verificar se possíveis alterações no transporte de aminoácidos pelo xilema e floema estão relacionados às alterações do metabolismo de N no nódulo provocadas pelo alagamento.
- Verificar a resposta metabólica, em função da presença do nitrato durante o alagamento.

8.3 MATERIAL E MÉTODOS

8.3.1 Condições de cultivo

Sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. IAC-17) foram germinadas diretamente em vasos com 1L de capacidade contendo vermiculita de granulação fina como substrato. As sementes foram mergulhadas em solução aquosa com meio de cultura contendo rizóbios da espécie *Bradyrhizobium elkanii* estirpe SEMIA 5019, imediatamente antes da semeadura. Foram colocadas entre 3 e 4 sementes por vaso. Após aproximadamente uma semana ocorreu a germinação. Aproximadamente 15 dias após a semeadura, um desbaste foi feito para manter apenas uma planta por vaso. As plantas foram então novamente “inoculadas” com solução aquosa contendo rizóbios (5mL/vaso). Este procedimento foi realizado novamente uma semana depois para garantir a nodulação. Também após esta primeira quinzena as plantas começaram a ser tratadas duas vezes na semana com 100 mL por vaso de solução de Hoagland & Arnon (1950) sem fonte de N mineral (solução -N), e com água quando necessário.

Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições naturais de temperatura e luminosidade, e os experimentos conduzidos nas mesmas condições. A temperatura média mínima foi em torno de 18°C e a média da máxima foi de 37°C, a partir de dados coletados por termômetros mantidos neste ambiente durante os anos de experimento. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados entre o início da primavera e final do verão, para garantir a predominância do estado vegetativo até a montagem dos experimentos, uma vez que a soja tem o florescimento induzido por dias curtos durante os meses de menor número de horas de luz, as plantas foram mantidas em

fotoperíodo de dias longos durante o primeiro mês de desenvolvimento. Para isso, lâmpadas incandescentes permaneciam acesas das 17:00 às 22:00 horas (16 horas de luz/8 horas de escuro).

8.3.2 Montagem dos experimentos e coleta do material vegetal

Todos os experimentos foram montados dentro da casa de vegetação quando as plantas estavam entre os estádios V7 aV9 (Fehr *et al.*, 1971) em que a nodulação era plena e a quantidade de nódulos era satisfatória para as análises.

Para o procedimento de inundação os vasos com capacidade de 1L contendo as plantas foram submersos (em água, solução -N ou solução +N, dependendo do experimento) dentro de vasos com capacidade de 3L mantendo uma lâmina de água cerca de 2 cm acima do substrato. Após os períodos de inundação os vasos foram drenados conforme o experimento.

8.3.3 Experimentos

8.3.3.1 Expto. I: Inundação por períodos curtos (5 minutos a 6 horas)

Este experimento foi o primeiro realizado para se observar o efeito do alagamento sobre o metabolismo nos nódulos. Períodos curtos (minutos a horas) foram determinados, a saber: Controle (não inundado), 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora (1H), 2 horas (2H), 4 horas (4H) e 6 horas (6H) com o sistema radicular inundado. Por se tratar de um experimento curto (5 minutos a 6 horas, todos os pontos coletados num mesmo dia), neste experimento e somente neste, as plantas foram inundadas em água de torneira.

Após os períodos de inundação, as plantas foram drenadas, e os nódulos foram coletados como descrito posteriormente no item 8.3.6. Em seguida os nódulos foram submetidos à extração em MCW (item 8.3.9.1). Foi feita análise do perfil de aminoácidos em HPLC e determinação dos aminoácidos livres totais (item 8.3.9.2).

8.3.3.2 Expto. II: Inundação em períodos prolongados (4 horas a 5 dias)

Neste experimento, os períodos de inundação das plantas foram aumentados, passando de horas a dias. Os períodos de inundação foram: Controle (não inundado), 4 horas (4H), 8 horas (8H), 1 dia (1D), 2 dias (2D), 3 dias (3D), 4 dias (4D) e 5 dias (5D). Uma vez que o período de inundação foi mais longo, em todos os experimentos nos quais as plantas permaneceram por mais de 1 dia inundadas foi usada solução -N.

Após os períodos de inundação descritos acima, as plantas foram drenadas, e os nódulos foram coletados. Após extração em MCW foi feita análise do perfil de aminoácidos do nódulo em HPLC.

8.3.3.3 Expto. III: Inundação por períodos prolongados e recuperação

As plantas deste experimento foram submetidas à inundação por 8 horas (8H), 1 dia (1D) e 3 dias (3D). Plantas sob estes mesmos períodos de inundação foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1 dia (--1D), 3 dias (--3D) e 5 dias (--5D). Por exemplo, uma planta que ficou inundada por 1 dia e ficou em recuperação pós-drenagem durante 1 dia (1D1D), durante 3 dias (1D3D) e 5 dias (1D5D). Além disso, plantas controle foram coletadas em diferentes tempos durante o experimento. Foram coletados controles no início (dia 2) e no meio do tempo total do experimento (dia 5), uma vez que o experimento teve um tempo máximo de 8 dias.

As plantas também foram inundadas em solução –N. As plantas sob recuperação após drenagem foram tratadas apenas com água comum, quando necessário. Após os períodos de inundação e recuperação descritos, os nódulos foram coletados. Após a extração em MCW foi feita análise do perfil de aminoácidos do nódulo em HPLC.

8.3.3.4 Expto. IV: Inundação por períodos prolongados (1 a 5 dias) e recuperação, análise do xilema

As plantas deste experimento foram submetidas aos seguintes períodos de inundação: 1 dia (1D), 3 dias (3D) e 5 dias (5D). Plantas sob estes mesmos períodos de inundação foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1 dia (--1D) e 3 dias (--3D).

No momento da coleta a parte aérea foi seccionada e a seiva do xilema coletada. Posteriormente uma alíquota de seiva do xilema devidamente diluída (normalmente 1:1) foi utilizada para análise do perfil de aminoácidos em HPLC.

8.3.3.5 Expto. V: Inundação por períodos prolongados (1 a 8 dias) e recuperação, análise dos nódulos e floema

Neste experimento as plantas foram submetidas à inundação por 1 dia (1D), 3 dias (3D), 5 dias (5D) e 8 dias (8D). Plantas sob estes mesmos períodos de inundação foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1 dia, 3 dias, 5 dias e 8 dias. Plantas controle (não-inundadas) também foram coletadas em diferentes tempos, uma vez que o experimento teve um tempo total de 16 dias. Os controles foram coletados no dia 0 (dia em que as demais foram inundadas) (C1), dia 8 (C8) e dia 16 (C16), como descrito abaixo:

Tabela 1: Descrição das siglas utilizadas para descrever os tratamentos do experimento V.

Sigla	Descrição dos tratamentos
1D	Inundado por 1 dia
1D1D	Inundado por 1 dia, drenado e coletado após 1 dia
1D3D	Inundado por 1 dia, drenado e coletado após 3 dias
1D5D	Inundado por 1 dia, drenado e coletado após 5 dias
1D8D	Inundado por 1 dia, drenado e coletado após 8 dias
3D	Inundado por 3 dias
3D1D	Inundado por 3 dias, drenado e coletado após 1 dia
3D3D	Inundado por 3 dias, drenado e coletado após 3 dias
3D5D	Inundado por 3 dias, drenado e coletado após 5 dias
3D8D	Inundado por 3 dias, drenado e coletado após 8 dias
5D	Inundado por 5 dias
5D1D	Inundado por 5 dias, drenado e coletado após 1 dia
5D3D	Inundado por 5 dias, drenado e coletado após 3 dias
5D5D	Inundado por 5 dias, drenado e coletado após 5 dias
5D8D	Inundado por 5 dias, drenado e coletado após 8 dias
8D	Inundado por 8 dias
8D1D	Inundado por 8 dias, drenado e coletado após 1 dia
8D3D	Inundado por 8 dias, drenado e coletado após 3 dias
8D5D	Inundado por 8 dias, drenado e coletado após 5 dias
8D8D	Inundado por 8 dias, drenado e coletado após 8 dias
C1	Controle 01 do dia 0, dia em que as plantas foram inundadas
C8	Controle 02, 8 dias após o dia 0
C16	Controle 03, 16 dias após o dia 0

Após os períodos de alagamento e recuperação, a parte aérea foi seccionada e a seiva do floema e os nódulos foram coletados. Após extração em MCW foi feita análise do perfil de aminoácidos do nódulo em HPLC.

8.3.3.6 Expto. VI: Inundação e recuperação em solução com e sem NO₃⁻

Neste experimento as plantas foram inundadas e recuperadas em solução -N (sem fonte de N mineral) ou em solução +N (com KNO₃), com o intuito de avaliar o efeito do nitrato no alagamento e recuperação. Controles em diferentes períodos do experimento foram coletados, e os mesmos também foram “tratados” com solução -N ou +N.

Para o procedimento de recuperação as plantas foram drenadas após o estresse e imediatamente mergulhadas na solução (também na concentração 1/3 do normal como as soluções de inundação, item 8.3.7) a qual seria “tratada”. No caso das plantas que foram inundadas em solução +N e seriam “recuperadas” em solução -N, os vasos das mesmas foram, imediatamente após a drenagem da solução de inundação, mergulhados duas vezes em água destilada, drenados e então mergulhados em solução -N e drenados novamente. Após estes procedimentos iniciais, a cada 3 dias as plantas recebiam 100 mL de solução -N ou +N diretamente nos vasos. Nos demais dias, foram irrigadas com água comum.

Os tratamentos foram os seguintes:

Tabela 2: Descrição das siglas utilizadas para descrever os tratamentos do experimento VI.

Sigla	Descrição dos tratamentos
C4 -N	Controle 4 dias após início do exp. Tratado com Sol -N
4D -N	Inundada durante 4 dias em Sol -N
4D3D -N-N	Inundada durante 4 dias em Sol -N e recuperada em Sol -N durante 3 dias
4D3D -N+N	Inundada durante 4 dias em Sol -N e recuperada em Sol +N durante 3 dias
C7 -N	Controle 7 dias após início do exp. Tratado com Sol -N
4D9D -N-N	Inundada durante 4 dias em Sol -N e recuperada em Sol -N durante 9 dias
4D9D -N+N	Inundada durante 4 dias em Sol -N e recuperada em Sol +N durante 9 dias
C13 -N	Controle 13 dias após início do exp. Tratado com Sol -N
C4 +N	Controle 4 dias após início do exp. Tratado com Sol +N
4D +N	Inundada durante 4 dias em Sol +N
4D3D +N-N	Inundada durante 4 dias em Sol +N e recuperada em Sol -N durante 3 dias
4D3D +N+N	Inundada durante 4 dias em Sol +N e recuperada em Sol +N durante 3 dias
C7 +N	Controle 7 dias após início do exp. Tratado com Sol +N
4D9D +N-N	Inundada durante 4 dias em Sol +N e recuperada em Sol -N durante 9 dias
4D9D +N+N	Inundada durante 4 dias em Sol +N e recuperada em Sol +N durante 9 dias
C13 +N	Controle 13 dias após início do exp. Tratado com Sol +N

Foram coletados os nódulos, raízes e a seiva do xilema. Foram feitas as extrações em MCW e NaOH a 0,1 M, das raízes e nódulos. Foram analisados o perfil de aminoácidos em HPLC, açúcares solúveis totais, sacarose, URE e proteínas totais em todas as amostras.

8.3.3.7 Expto. VII: Atividade da nitrogenase, após inundação e recuperação

Para o experimento de atividade da enzima nitrogenase, as plantas foram retiradas dos vasos com vermiculita (onde eram cultivadas) e colocadas em vasos especiais os quais podem ser vedados hermeticamente para a análise da nitrogenase. Cada vaso continha uma planta, numa mistura de 1:2 (vermiculita fina: argila expandida). Os tratamentos foram:

Controle, 3 (3D) e 5 dias (5D) de inundação e 1 (--1D) e 2 (--2D) dias de recuperação. Foram feitas três repetições em cada tratamento. Todas as plantas usadas neste experimento ficaram um dia sob “aclimatação” nos vasos com o novo substrato antes de se iniciarem os tratamentos.

A atividade da nitrogenase foi determinada “*in situ*”, pelo acompanhamento da evolução do H₂. O método está detalhado mais adiante no tópico 8.3.11.

8.3.4 Coleta da seiva do xilema

A coleta da seiva do xilema foi realizada entre as 10:00 e 13:00 horas, segundo McClure & Israel (1979). As plantas foram seccionadas com auxílio de um bisturi abaixo do nó cotiledonar. Para melhor uniformidade no corte, e saída do exsudato do xilema, após a secção com bisturi, o tecido foi uniformizado com auxílio de lâmina de barbear. A seiva foi coletada por meio de micro-capilares de 50 µL de capacidade. A seiva coletada foi imediatamente transferida para tubos tipo “*ependorf*” de 1,5 mL de capacidade, mantidos em isopor com gelo. A coleta durou entre 30 a 40 minutos (min.), uma vez que quase sempre, os nódulos nas raízes também seriam coletados posteriormente. A seiva coletada era armazenada em freezer -20°C até as análises.

8.3.5 Coleta da seiva do floema

A seiva do floema foi coletada segundo método proposto por Neo & Layzell, (1997). As plantas foram seccionadas da mesma maneira descrita para a coleta do xilema. Neste caso, a parte aérea era o material vegetal de interesse. A parte aérea seccionada era borrifada com água destilada, coberta com sacos plásticos pretos e colocada em recipiente contendo solução de EDTA a 5 mM preparada em tampão de fosfato de sódio

($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) a 5 mM, pH = 6,0 onde os caules foram novamente seccionados, em região imersa neste tampão. Imediatamente as plantas foram transferidas para tubos (tipo “*falcon*”) com capacidade de 13 mL, de modo que a porção cortada dos caules ficava imersa em 5 mL do tampão. Os tubos com a parte aérea das plantas foram imediatamente armazenados no escuro em câmaras com temperatura constante de 22°C, com elevada umidade durante 3 horas. Decorridas as 3 horas a parte aérea foi descartada, os tubos foram coletados e armazenados em freezer -20°C até as análises. Para as análises a solução coletada foi concentrada e levemente acidificada com HCl a 0,1 M (1:10) para a precipitação do EDTA.

8.3.6 Coleta dos nódulos

Para a coleta dos nódulos, depois de serem submetidas aos tratamentos, as raízes foram lavadas para a retirada da vermiculita em água de torneira, logo em seguida em água destilada e imediatamente imersas em banho de gelo, em recipiente contendo gelo e água destilada. Em seguida, os nódulos foram destacados do sistema radicular, “secos” em papel absorvente para retirar o excesso de água e imediatamente congelados em N_2 líquido e armazenados em freezer a -20°C até a extração.

8.3.7 Solução nutritiva

As plantas foram cultivadas todo o período até a montagem dos experimentos com solução de Hoagland & Arnon (1950) sem fonte de N mineral como descrito abaixo:

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

Para o experimento em que solução com nitrato (NO_3^-) foi utilizada (Solução +N), somente KNO_3 a 15 mM (concentração final) foi acrescentado à solução anteriormente descrita.

Todos os macronutrientes e micronutrientes foram adicionados no preparo das soluções nutritivas, exceto o ferro, que foi acrescentado apenas no momento de irrigar as plantas com a solução nutritiva. Dessa forma, acrescentou-se à solução -N, 1 mL.L^{-1} , de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ($33,2 \text{ g.L}^{-1}$); $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (25 g.L^{-1}) e NaOH ($3,65 \text{ g.L}^{-1}$).

Para a montagem dos experimentos, as soluções utilizadas para inundar as plantas foram diluídas três vezes em relação à força iônica original.

8.3.8 Replicação e manutenção dos rizóbios

Os rizóbios utilizados neste trabalho, foram os da espécie *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe SEMIA 5019 (SMS 463), os quais foram replicados e mantidos em meios de cultura segundo método proposto por Norris & Date (1976), com pH 6,8 - 7,0.

Os meios foram preparados utilizando os seguintes reagentes: K_2HPO_4 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$), NaCl ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$), extrato de levedura ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$), manitol (10 g.L^{-1}) e 5 mL de azul de bromotimol a 0,5% (p/v) em metanol. O meio sólido foi obtido adicionando-se 15 g.L^{-1} de ágar ao meio líquido.

Após serem autoclavados a 120°C por 20 minutos, os meios foram inoculados em câmara de fluxo laminar e incubados à temperatura ambiente em torno de $28\text{-}30^\circ\text{C}$. Os tubos com meio sólido foram mantidos em repouso e os frascos com meio líquido, após

terem sido inoculados foram incubados sob agitação, por um período de 3 a 4 dias, quando a suspensão de bactérias atingiu uma quantidade em torno de 10^9 células viáveis.mL⁻¹ de UFC - unidades formadoras de colônias.

Para inoculação nas plantas e sementes foram utilizados os meios de cultura líquidos, os quais foram diluídos 10 vezes com água destilada, antes de serem aplicados.

8.3.9 Análises bioquímicas

8.3.9.1 Extração dos nódulos

Para extração, 1g de massa fresca (MF) de nódulos foi macerado em N₂ líquido e extraído em 10 mL de MCW (metanol:clorofórmio:agua/12:5:3) durante 3 horas, quando os tubos foram agitados entre 3 a 4 vezes. Após esse tempo os tubos foram centrifugados por 20 minutos e em seguida 8 mL desse extrato foram retirados (o volume restante foi medido e descartado) e adicionados 3 mL de água e 2 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados e deixados em repouso. Uma hora depois, os tubos foram centrifugados durante 30 minutos. Aproximadamente 8 mL foram coletados da porção aquosa (superior) e a porção clorofórmica foi descartada. Para concentrar o extrato e remover resíduo de clorofórmio o extrato foi mantido em banho-maria a 40°C por 18 horas perdendo cerca de 20 a 25% do volume inicial. Posteriormente as amostras foram retiradas do banho, e os tubos em que estavam contidas foram vedados e armazenados em freezer -20°C até as análises. No extrato MCW foram analisados, aminoácidos, açúcares solúveis totais, sacarose e ureídeos.

Para análise de amido e proteínas totais, 1g de MF de nódulos foi extraído em 5 mL de, ácido perclórico (PCA) a 30% (30 minutos) e NaOH a 0,1 M (24 horas), ambos sob

agitação. Após o período de extração o extrato foi centrifugado durante 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado em freezer até as análises e o *pellet* descartado.

8.3.9.2 Determinação do teor de aminoácidos livres totais

O teor de aminoácidos nas amostras foi determinado com ninhidrina pelo método de Yemm & Cocking (1955), usando leucina como padrão. Extratos das amostras MCW de nódulos, foram devidamente diluídos em água para volume de 1 mL, em tubos de ensaio, aos quais foram acrescentados 0,5 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0); 0,2 mL do reagente de ninhidrina a 5% [ninhidrina - Merck® 5% em metil-celulose (éter monoglicólico de etilenoglicol - Merck®) reagentes específicos para determinação de aminoácidos] e 1 mL de KCN a 2% (v/v) em metilcelulose (preparada a partir de uma solução a 0,01 M de KCN com água).

Os tubos foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, acrescentou-se 1,0 mL de etanol a 60% e os tubos foram agitados. O mesmo procedimento foi realizado para leitura do branco para calibração (zero) do espectrofotômetro e para curva padrão de leucina (20 a 100 nmol.mL⁻¹). A densidade óptica foi determinada espectrofotometricamente a $\lambda = 570$ nm.

8.3.9.3 Determinação do teor de açúcares solúveis totais (AST) e amido

A dosagem dos açúcares solúveis totais e amido foi feita segundo método proposto por Graham & Smydzuc, (1965) com reagente de antrona, usando glicose como padrão. Neste procedimento o reagente de antrona é preparado utilizando-se 150 mg de antrona (Sigma®) e 100 mL de ácido sulfúrico [H₂SO₄ (95%)]. Após a dissolução da antrona no

ácido sulfúrico, o reagente foi mantido em freezer a -20°C . Para a reação os tubos foram mantidos em bandeja com gelo. Foi utilizado 1 mL de amostra, ao qual foi acrescido 3 mL do reagente de antrona gelado. Os tubos foram vedados com bolas de vidro, e mantidos em repouso por 15 minutos. Em seguida foram colocados em banho-maria a 90°C durante 20 minutos. Após resfriarem no escuro à temperatura ambiente, a densidade óptica foi determinada espectrofotometricamente ($\lambda = 620 \text{ nm}$). Foram realizados simultaneamente a dosagem do branco e da curva padrão de glicose que foi de 0,14 a $1,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

8.3.9.4 Determinação do teor de sacarose

A dosagem de sacarose foi feita segundo método proposto por Van Handel (1968) usando sacarose como padrão. Para o preparo do reagente de antrona, foram usados 150 mg de antrona (Sigma®), 76 mL de $[\text{H}_2\text{SO}_4 (95\%)]$ e 30 mL de água deionizada. A solução de KOH a 30% foi preparada em água deionizada. Para a reação foram utilizados 100 μL de amostra, aos quais foram acrescidos 100 μL de KOH a 30% (para destruir açúcares redutores). Os tubos foram então vedados, homogeneizados e mantidos em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. Após resfriarem à temperatura ambiente foram acrescentados 3 mL do reagente de antrona. Em seguida os tubos foram novamente vedados, homogeneizados e aquecidos a 40°C por 15 minutos. Após resfriarem no escuro à temperatura ambiente, foi feita a leitura nas mesmas condições usadas para AST e amido. Foram realizadas simultaneamente a dosagem do branco e da curva padrão de sacarose que foi de 0,07 a $1,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

8.3.9.5 Determinação do teor de ureídeos

A quantificação de ureídeos totais foi baseada no método de Vogels & van der Drift (1970) utilizando alantoína como padrão. A reação se dá inicialmente pela hidrólise alcalina da alantoína em alantoato, na qual se utilizaram 250 μL de amostra, branco ou padrões (13 a 80 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ de alantoína), 500 μL de água deionizada e 250 μL de NaOH a 0,5 M. Em seguida, os tubos foram vedados com bolas de vidro e mantidos em banho-maria a 100°C por 8 minutos. Após resfriarem à temperatura ambiente, foram acrescentados 250 μL de HCl a 0,65 M para a hidrólise ácida. Os tubos foram novamente vedados, mantidos em banho-maria a 100°C por 4 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados novamente à temperatura ambiente. Foram então acrescentados 250 μL de tampão fosfato [0,4 M pH 7,0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}/\text{KH}_2\text{PO}_4$)] e 250 μL de fenilhidrazina a 0,33%. Os tubos foram em seguida agitados e mantidos em repouso por 5 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo, onde permaneceram até a adição de 1,25 mL de HCl concentrado e gelado. Em seguida foram adicionados 250 μL de ferricianeto de potássio [K_3FeCN_6] a 1,65%. Os tubos foram agitados e mantidos no escuro à temperatura ambiente durante 15 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 535 \text{ nm}$).

8.3.10 Análise do perfil de aminoácidos por HPLC

A separação e análise de aminoácidos foi conduzida com base no sistema OPA (*o*-ftaldialdeído) (Benson & Hare 1975; Jarrett *et al.*, 1986) modificado no nosso laboratório (Marur *et al.*, 1994). De acordo com este método, os aminoácidos são primeiro transformados nos respectivos derivados OPA e separados em seguida por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

A concentração de aminoácidos (totais) foi ajustada, quando necessário, para a faixa de 0,2 a 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ por diluição com água. Uma alíquota de 20 μL foi misturada com 60 μL do reagente OPA (50 mg de OPA dissolvidos inicialmente em 1 mL de metanol, depois acrescidos de 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 e, no dia de uso, mais 10 μL de 2-mercaptoetanol para cada 1,25 mL de OPA-Borato). Após 2 minutos de reação com OPA, uma alíquota de 10 μL foi injetada na coluna do HPLC. A coluna (ODS-2 Superpac, tipo C18, 250 x 4,6 mm) foi eluída, com fluxo de 0,8 mL/min. por um gradiente formado por quantidades crescentes de metanol a 65% (Tampão “B”) em relação ao tampão fosfato, pH 7,25 (Tampão “A” - Na_2HPO_4 a 50 mM, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ a 50 mM, 1,5 mL de ácido acético glacial, 20 mL de tetrahidrofurano, e 20 mL de metanol em 1 L de solução). O gradiente foi programado para aumentar a proporção de “B” em relação a “A” de 20 a 58% nos primeiros 35 minutos, seguidos por 58 a 95% durante o período de 35 e 60 min. e de 95 a 100% entre 60 e 61 min.

A saída da coluna foi monitorada por um detector de fluorescência (Shimadzu modelo RF10AxL) ajustado em 265 nm (luz de excitação) e 450 nm (emissão de fluorescência).

A concentração de cada aminoácido nas amostras foi determinada pela relação entre a área dos picos integrados das amostras, aos picos integrados de um padrão Sigma® AAS-18, com os aminoácidos (ASP, GLU, SER, HIS, GLY, THR, ARG, ALA, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS), aos quais foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos à concentração de 50 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$.

8.3.11 Atividade da nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase foi determinada “*in situ*”, pelo acompanhamento da evolução do H₂, em um sistema com um fluxo de 500 mL.min⁻¹ de uma mistura de gases (80% N₂: 20% O₂ – Ar sintético), livre de H₂, e regulado por um controlador de fluxos. Neste sistema, um volume conhecido do gás passa por um vaso contendo, neste caso, uma mistura de vermiculita fina e argila expandida (1:2) em que está o sistema radicular da planta intacta (Fig. 1). Em seguida o fluxo de gás segue por uma coluna mergulhada em gelo e depois passa por um agente dessecante [perclorato de magnésio - Mg(ClO₄)₂] cujo objetivo é condensar o vapor de água para evitar possíveis danos aos detectores. Um volume de 200 mL deste gás foi desviado para o detector de H₂ (Qubit systems, Inc., Kingston, Ontário, Canadá) com o auxílio de uma bomba e o restante foi descartado. Este detector foi previamente calibrado utilizando-se uma mistura padrão 80%N₂: 20%O₂ com teor de H₂ conhecido (a partir de um padrão de 2000 ppm, White Martins). Finalmente, os gases passaram por um sensor de O₂. Durante os ensaios, variações no teor de H₂ foram acompanhadas utilizando o software “Data Logger”. Um sensor de temperatura também estava acoplado ao sistema. Este sensor era calibrado diariamente, antes do início de cada ensaio.

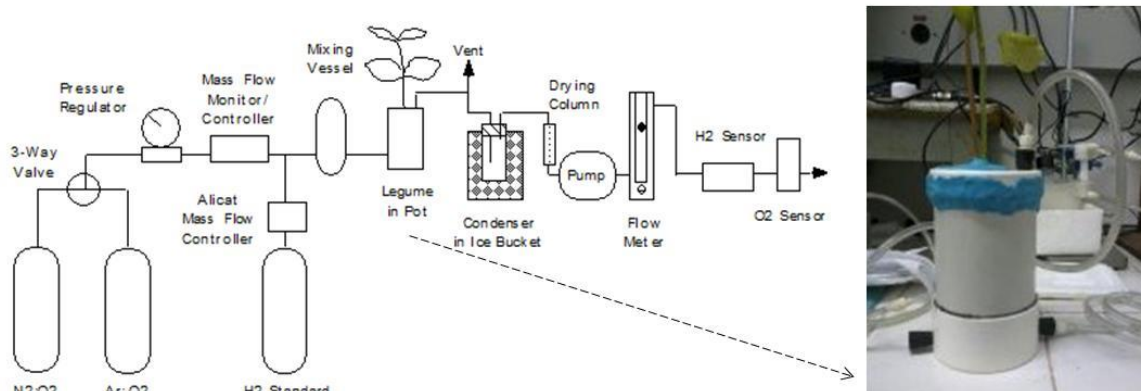
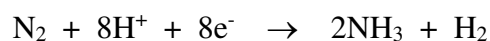


Figura 1: Esquema do equipamento de medição da atividade aparente da nitrogenase pela evolução de H₂. Vaso hermeticamente vedado com a raiz da planta intacta. O gás entra pela conexão à direita e sai pela conexão na porção superior do vaso, seguindo para os sensores.

O cálculo das concentrações foi obtido a partir da equação dos gases ideais ($PV = nRT$) em que: ($P =$ pressão; $V =$ volume; $n =$ número de moles; $R = 8,314 \text{ J/mol/K}$; $T =$ temperatura).

A determinação da atividade aparente da nitrogenase foi obtida quando um fluxo conhecido ($500 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) de N₂: O₂ foi passado pelo material vegetal. O sensor de H₂ mede a taxa de evolução de H₂ na saída do vaso em que está o sistema radicular. Esta é uma medida aparente da atividade da nitrogenase, pois, dos 8 elétrons liberados pela atividade da enzima, apenas 2 são utilizados para reduzir os H⁺, enquanto o restante é utilizado para produzir a amônia. Neste caso, a evolução do H₂ corresponde apenas a 25% da atividade total da enzima, embora seja equivalente à transformação molar de N₂ (1 mol N₂ = 1 mol H₂):



8.3.12 Delineamento experimental e análise dos dados

Todos os experimentos foram realizados com delineamento experimental inteiramente casualizado, com três ou quatro repetições, onde cada planta foi uma unidade experimental. Quando necessário, os dados foram submetidos à análise de variância e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo uso do software estatístico VARPC, desenvolvido pelo professor e orientador deste trabalho, Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas.

8.4 RESULTADOS

8.4.1 Experimento I: Aminoácidos do nódulo após inundação por períodos curtos (até 6 horas)

Este experimento foi um ensaio preliminar visando determinar a partir de que momento a inundação já interfere no perfil de aminoácidos dos nódulos. Partindo dos resultados obtidos prosseguimos para os experimentos seguintes.

Neste experimento plantas de soja noduladas ficaram inundadas entre 5 minutos até 6 horas. Conforme pode ser observado na Figura 2, em condições normais (controle), ASN é o aminoácido mais representativo no nódulo, responsável por mais de 35% do pool de aminoácidos, seguido por GLU (aproximadamente 17%) e SER (aproximadamente 12%). A análise da composição de aminoácidos no nódulo nos diferentes tempos de inundação revelou que há uma redução gradual na composição de GLN e ASP (de aproximadamente 40%) a partir de 5 minutos e de ASN (de aproximadamente 28%) a partir de 2 horas e aumento na composição de GABA (de aproximadamente 28%) a partir de 45 minutos de ALA (de aproximadamente 28%) a partir de 5 minutos de alagamento (Fig. 2). Quanto ao teor de aminoácidos totais, observou-se que não há diferença entre os tratamentos analisados (dados não apresentados).

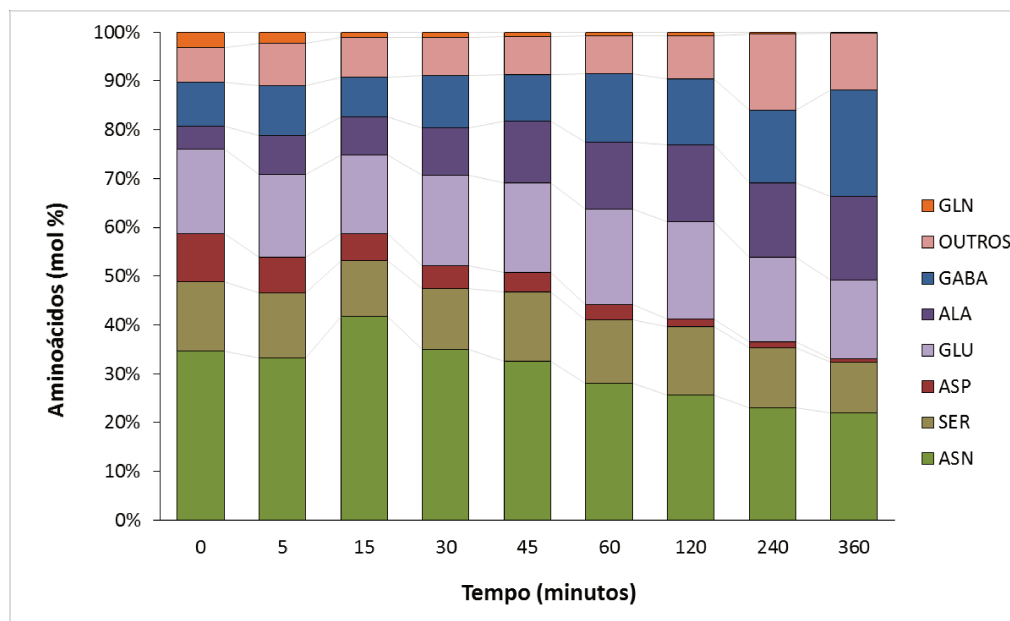


Figura 2: Composição de aminoácidos (mol %) nos nódulos de plantas de soja após 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minutos de inundação e tratamento não inundado (0 min) (controle). Os dados representam a média (n=3).

8.4.2 Experimento II: Aminoácidos do nódulo após inundação por períodos prolongados (até 5 dias)

Neste experimento no qual as plantas ficaram inundadas de 4 horas até 5 dias, observaram-se as mesmas alterações na composição de aminoácidos do nódulo observadas no experimento anterior, mas em maior grau. Já com 4 horas houve redução do ASP (86%) e GLN e aumento da ALA e GABA. Também foi observado aumento de ILE, LEU, VAL e PHE. Estes quatro últimos aminoácidos, contudo, representam menos de 3% dos aminoácidos totais, e estão incluídos em outros aminoácidos no gráfico (Fig. 3). A principal alteração observada foi a redução acentuada da ASN que no controle corresponde a 47 mol%, a partir de 4 horas diminuiu para 28 mol% e para menos de 3 mol% em 4 dias, ou seja uma redução de 93% e aumento de GABA de 10 para 40%. Claramente, o nível de

ASN no nódulo foi altamente prejudicado pela inundação. Não houve diferença significativa entre o teor de aminoácidos livres totais entre os tratamentos avaliados (Fig. 4), portanto as variações na composição (Fig. 3) representam alterações no perfil destes aminoácidos.

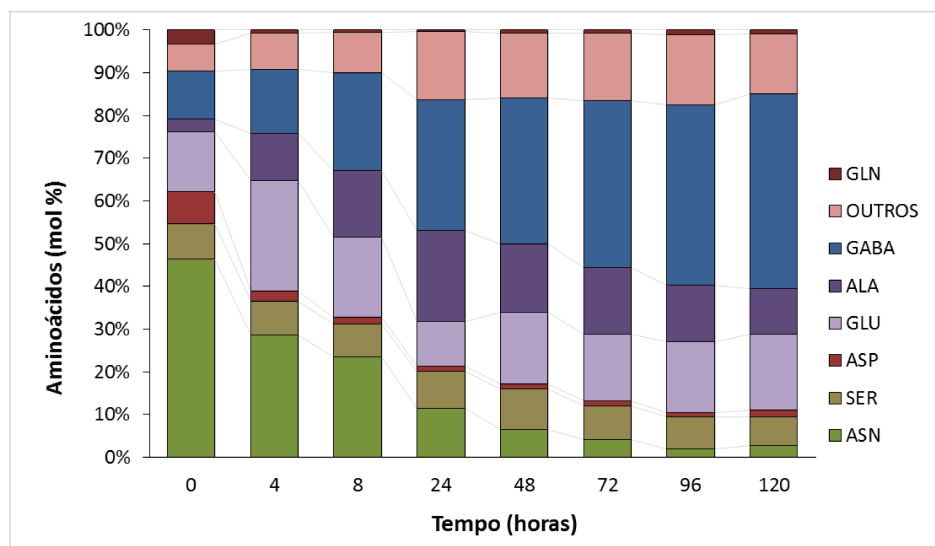


Figura 3: Composição de aminoácidos (mol %) nos nódulos de plantas de soja após 4, 8, 24, 48, 72, 96, e 120 horas de inundação e tratamento não inundado (0). Os dados representam a média (n=3).

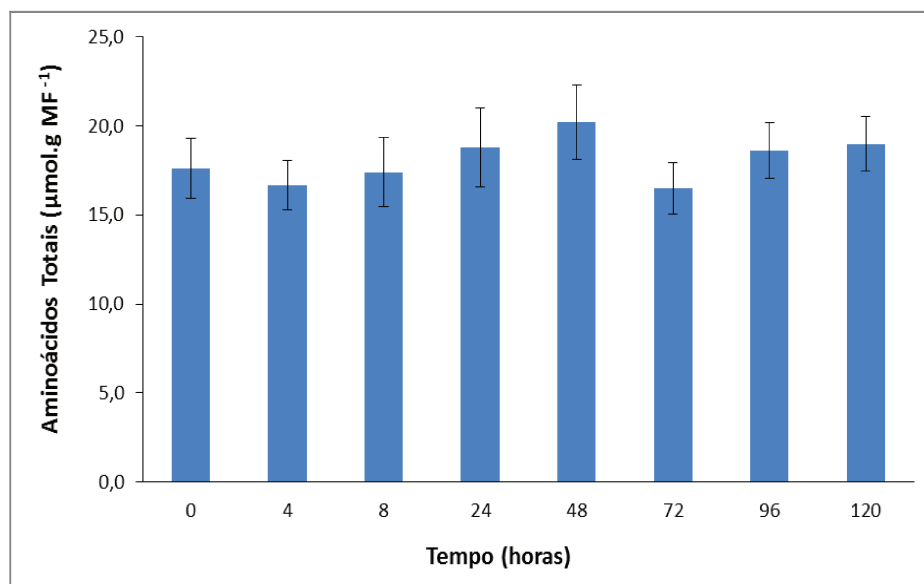


Figura 4: Teor de aminoácidos totais ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 4, 8, 24, 48, 72, 96, e 120 horas de inundação e tratamento não-inundado (0). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão.

8.4.3 Experimento III: Aminoácidos do nódulo após inundação por períodos prolongados e recuperação

No experimento III, onde as plantas foram inundadas entre 8 horas e 3 dias e mantidas em recuperação por 1, 3 e 5 dias, através da análise da composição de aminoácidos nos nódulos, observou-se nos tratamentos de inundação as mesmas alterações encontradas nos experimentos anteriores. Com relação aos tratamentos de recuperação, observou-se que o grau de recuperação variou conforme o aminoácido. As alterações pós recuperação foram avaliadas nos aminoácidos afetados pela inundação, GLN, ASP, ASN que diminuíram com a inundação e GABA e ALA que aumentaram.

A composição de GABA diminuiu após 3 dias de recuperação nos três tratamentos de inundação aplicados. Ou seja, mesmo após 3 e 5 dias de inundação a porcentagem de

GABA recuperou-se após 3 dias de drenagem. A ALA também volta aos valores normais (diminuiu) com 3 dias de recuperação após os 3 dias de inundação aplicados. Para ASP a recuperação é mais rápida, o aumento às porcentagens normais, encontradas em plantas não-inundadas já ocorreu com 1 dia de recuperação em todos os 3 tratamentos de inundação (Fig. 5). Para a GLN a recuperação variou com o tempo em que a planta permaneceu inundada, sendo que com 8 horas (8H) e 1 dia (1D) ela retorna aos valores observados no controle. Entretanto, após 3 dias de inundação a recuperação foi mais lenta, e a GLN só recuperou-se após 3 dias de recuperação. Já para a ASN para a qual a recuperação também variou segundo o tempo de inundação, as plantas que ficaram 8H e 1D inundadas, retornaram às porcentagens normais semelhantes às encontradas em plantas não inundadas, somente após 3 dias de recuperação (Fig, 5). Contudo, plantas submetidas a 3 dias de inundação não apresentaram uma recuperação total e começam a se recuperar com 5 dias de drenagem, mas os valores não alcançaram aqueles encontrados em plantas controle. Por exemplo, numa planta controle a porcentagem de ASN nos nódulos que é de aproximadamente 42%, em 8H, 1D e 3D diminuiu respectivamente para 27%, 15%, 15%. Plantas inundadas por 1 dia e drenadas por 3 dias apresentam 38% de ASN e plantas inundadas por 3 dias e drenadas por 3D e 5D apresentam respectivamente 25% e 30% de ASN. O aminoácido ASN, que é o principal aminoácido presente no nódulo, não se recuperou aos valores iniciais mesmo após 5 dias de drenagem (Fig. 5).

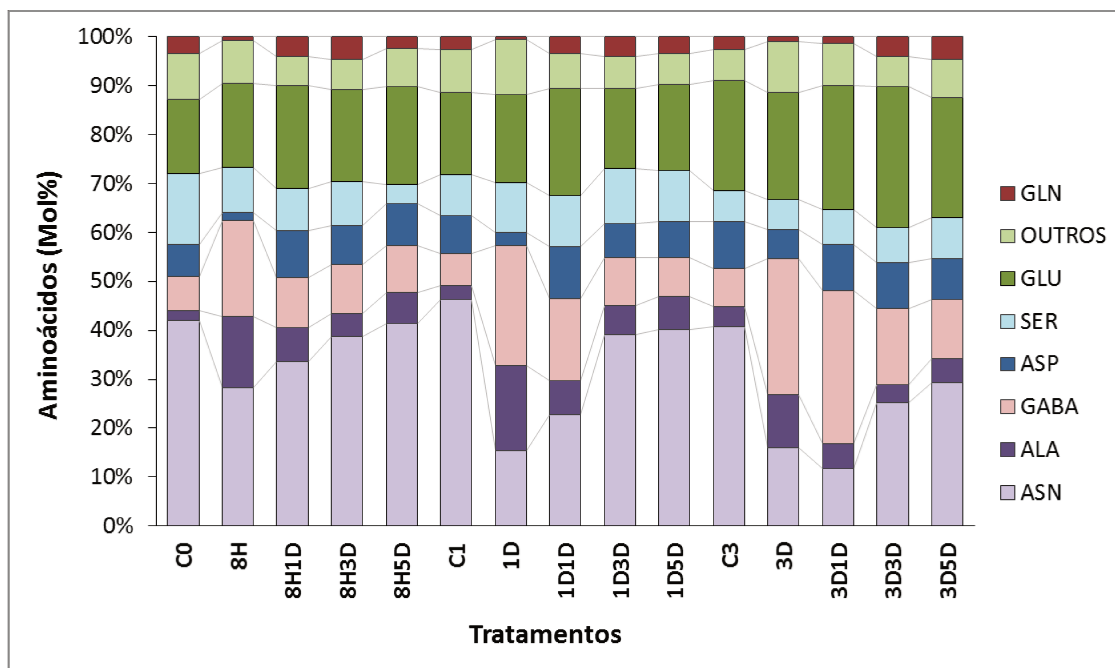


Figura 5: Composição de aminoácidos (mol %) nos nódulos de plantas de soja após 8 horas (8H), 1 (1D) e 3 dias (3D) de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1 dia (8H1D, 1D1D, 3D1D), 3 dias (8H3D, 1D3D, 3D3D) e 5 dias (8H5D, 1D5D, 3D5D) e tratamento não-inundado (C) analisado em 0, 1 e 3 dias. Os dados representam a média (n=3).

8.4.4 Experimento IV: Aminoácidos do xilema após inundação por períodos prolongados (1 a 5 dias) e recuperação

Neste experimento foi avaliada a composição de aminoácidos apenas na seiva do xilema. Foi observado um padrão diferente do observado para os nódulos, começando pela proporção de aminoácidos na seiva do xilema nos tratamentos controle que é bem diferente daquela encontrada em nódulos. Na seiva do xilema, GLN representa em torno de 14% dos aminoácidos (Fig. 6), enquanto no nódulo pouca GLN é detectada (em torno de 3%) (Fig. 5). Ainda no controle observa-se que ASN representa 46% seguida de ASP (12%) e GLU (6%).

Considerando as plantas inundadas em relação ao controle, observa-se que com 1 dia de inundação há redução na composição de GLN (14% para 3%) e de ASN (46% para 23%), e em contrapartida há aumento de ASP (12% para 29%), SER (2,5% para 13%) e ALA (1,2% para 6,4%).

A quantidade de ASN e GLN diminuiu com a inundação, e a recuperação ocorreu conforme o tempo de inundação, quanto mais longo o tempo de inundação, mais lenta a recuperação. Com 1 e 3 dias de inundação e após 3 dias de recuperação, a ASN retornou aos valores iniciais (controle). Contudo, o mesmo não foi observado após 5 dias de inundação, quando a ASN não se recuperou, sendo este mesmo efeito observado nos nódulos (Fig. 5).

A composição de ASP ainda é alta com 1 dia de recuperação, após os três períodos de inundação. Este aminoácido começa a atingir seu valor original (semelhante ao tratamento não inundado), somente com 3 dias de recuperação para as plantas que ficaram inundadas por 1 e 3 dias e não retornou nas plantas inundadas por 5 dias, mesmo 3 dias após a drenagem (5D3D) (Fig. 6).

Com relação à recuperação (diminuição) de ALA, nas plantas que ficaram inundadas por 1 dia, a recuperação já ocorre com 1 dia (1D1D). Entretanto, um efeito reverso é observado nos tratamentos de 3D1D e 5D1D (plantas inundadas por 3 e 5 dias e drenadas após 1 dia) onde a composição de ALA é ainda maior do que a observada nos tratamentos de inundação em relação ao tratamento controle. Nestes tratamentos (3D1D e 5D1D), ALA correspondia a respectivamente 23 e 29 mol%, sendo que no tratamento controle correspondia apenas a 1,2 mol% e com 3 e 5 dias de inundação, correspondia a 5,1

e 6,4 mol%, respectivamente. Mas após 3 dias de recuperação, a composição de ALA começa a diminuir, sendo que nas plantas que permaneceram inundadas por 3 dias, houve recuperação total deste aminoácido, mas nas plantas que permaneceram 5 dias inundadas ALA diminuiu, mas não alcançou os valores encontrados no tratamento controle. Isto mostra que a recuperação de ALA na seiva do xilema é variável e ocorre de acordo com o período em que as plantas permanecem inundadas.

Com relação ao teor de aminoácidos totais na seiva do xilema, observa-se que houve algumas variações entre os tratamentos (Fig. 7). Nas plantas inundadas por 3 e 5 dias os teores de aminoácidos totais foram maiores em relação aos demais. Mas também foi verificado um aumento no tratamento de 1D3D. Em relação ao controle, observa-se que o teor de aminoácidos totais é reduzido nos tratamentos 3D1D, 5D1D e 5D3D, conforme se observa na Figura 7. As demais variações não foram significativas ($p > 0,05$).

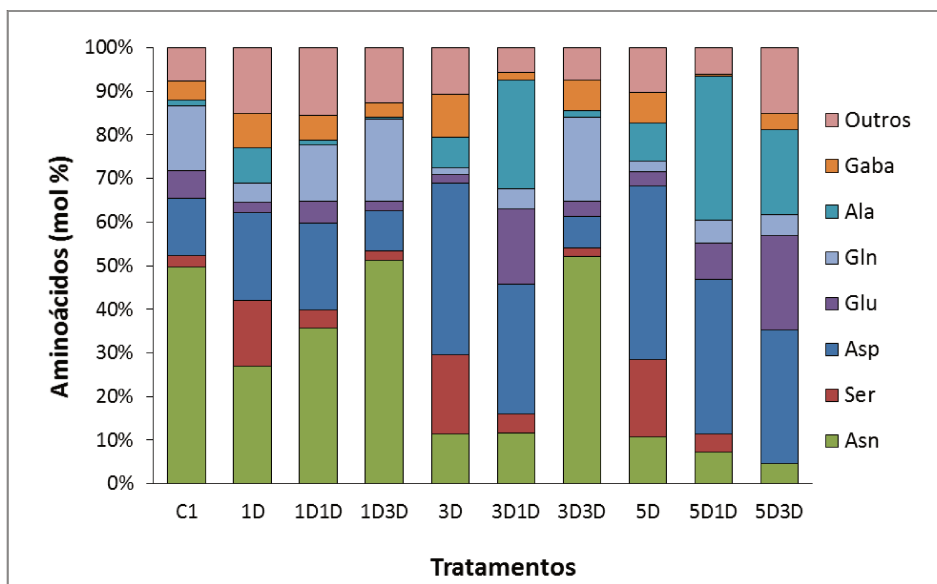


Figura 6: Composição de aminoácidos (mol %) na seiva do xilema de plantas de soja após 1 (1D), 3 dias (3D) e 5 dias (5D) de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse após 1 dia (1D1D, 3D1D, 5D1D) e 3 dias (1D3D, 3D3D, 5D3D) e tratamento não-inundado (C1). Os dados representam a média (n=3).

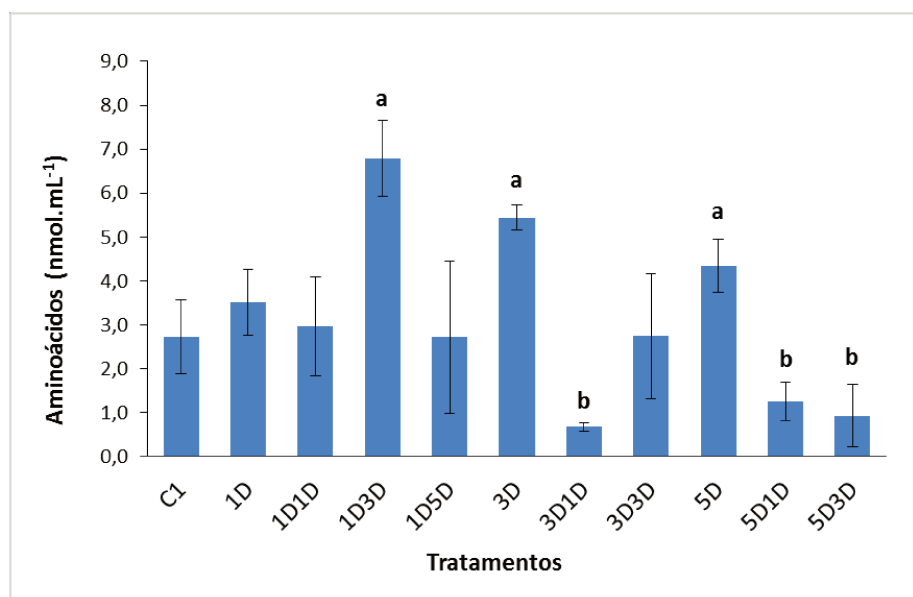


Figura 7: Teor de aminoácidos (nmol.mL⁻¹) na seiva do xilema de plantas de soja após 1 (1D), 3 dias (3D) e 5 dias (5D) de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse após 1 dia (1D1D, 3D1D, 5D1D) e 3 dias (1D3D, 3D3D, 5D3D) e tratamento não-inundado (C1). Os dados representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas (p<0,05).

8.4.5 Experimento V: Aminoácidos dos nódulos e floema após inundação por períodos prolongados (1 a 8 dias) e recuperação

Neste experimento de inundação e recuperação, em que as plantas ficaram 1, 3, 5 e 8 dias inundadas, e mantidas em recuperação por períodos iguais (1, 3, 5 e 8 dias), foi avaliado o perfil de aminoácidos da seiva do floema e dos nódulos. Em relação à composição de aminoácidos (mol%) na seiva do floema, observou-se que os principais aminoácidos em plantas controle foram, respectivamente, GABA, SER, ALA, ASN e ASP.

Para os períodos de inundação 5 e 8 dias, observou-se que SER aumentou (Fig. 8). Mas voltou a diminuir após 3 ou 5 dias de drenagem (Fig. 8). A composição de ASN não diferiu entre o tratamento controle e inundado nos tratamentos de 1, 3 e 8 dias de inundação, apenas no tratamento de 5 dias. Porém, a composição de ASN foi variável entre os tratamentos de recuperação após 1, 3 e 8 dias de inundação (Fig. 8). Nos tratamentos de recuperação efetuados após 1 dia de inundação (1D3D, 1D5D e 1D8D), o nível de ASN aumenta em relação aos demais (Fig. 8 A). O mesmo é observado no tratamento 3D5D (Fig. 8 B), e o oposto é observado nos tratamentos de 8D5D e 8D8D, em que ASN diminui em relação aos demais (Fig. 8 D).

O teor de GABA é maior nos tratamentos de recuperação 1D3D, 3D5D, 3D8D, 5D5D, 5D8D e nos tratamentos controle C8 e C16. Verificou-se que o teor de GABA diferiu entre controle e inundado somente com 5 dias de inundação, quando o teor de GABA é maior no controle. Os níveis de GLU, ASP e ALA não variaram de maneira considerável entre os tratamentos (Fig. 8).

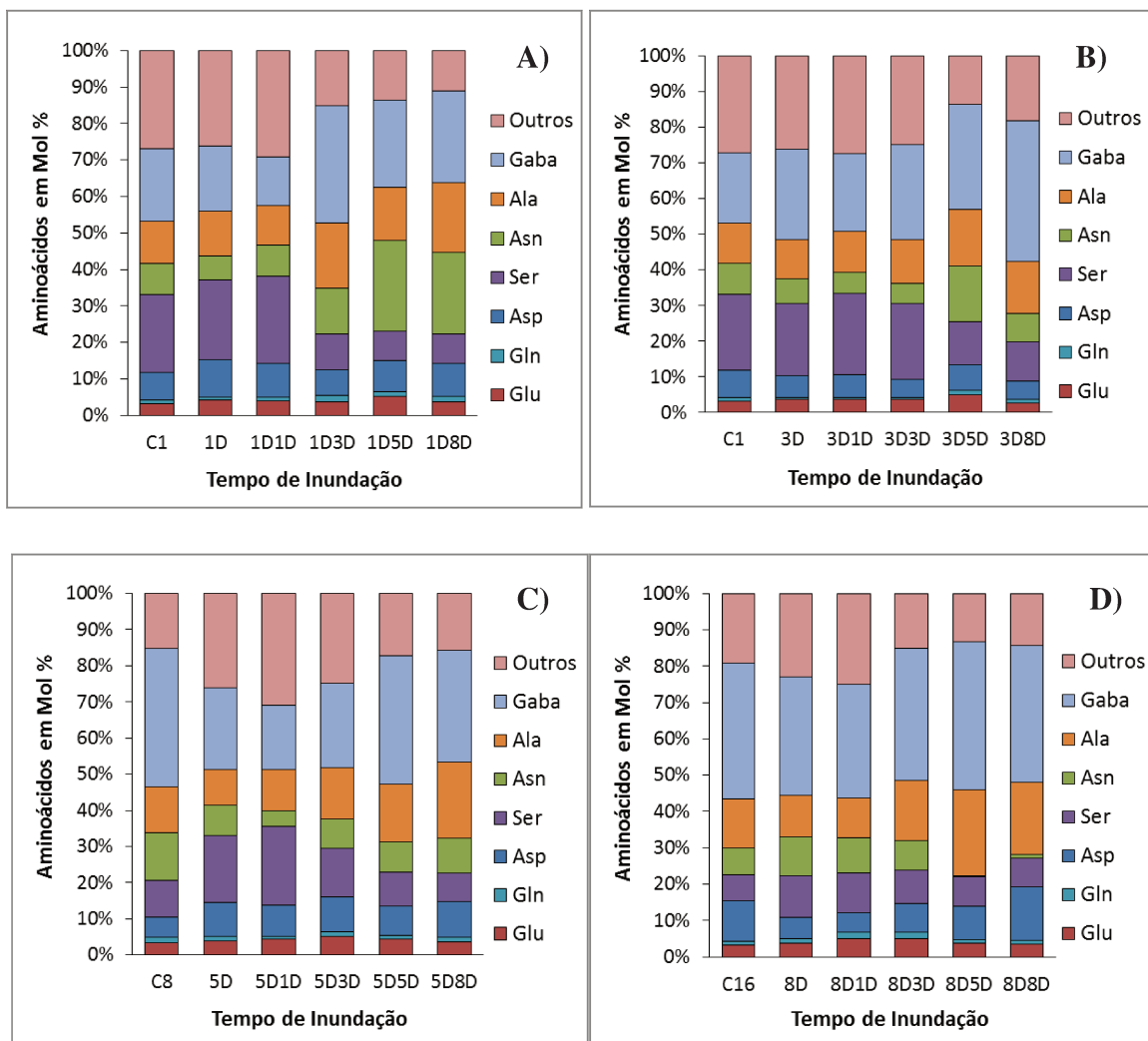


Figura 8: Composição de aminoácidos (mol %) na seiva do floema de plantas de soja após 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 8 dias (D) de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1, 3, 5 e 8 dias; Tratamentos controle não-inundado coletados após, 1, 8 e 16 dias. Os dados representam a média (n=3).

Quanto ao perfil de aminoácidos nos nódulos (Fig. 9), observa-se o mesmo padrão encontrado nos experimentos 2 e 3, uma redução acentuada de ASN e um aumento de GABA na inundação. Com os tratamentos de recuperação, ASN recupera-se lentamente e

quanto maior o período de exposição ao estresse mais longo o período de recuperação. Com exceção do experimento em que as plantas ficaram inundadas por 8 dias, em todos os demais ASN retornou aos valores “iniciais” correspondentes àqueles encontrados no controle, ou seja, recuperou-se totalmente após 8 dias de recuperação. Entretanto, nos experimentos anteriores onde o tempo máximo de recuperação foi 5 dias, os valores de ASN não foram restabelecidos. Observa-se que, com o decorrer dos dias de recuperação, ao mesmo tempo em que ASN aumentou e atingiu os valores semelhantes aos observados no tratamento controle, GABA diminuiu e também retornou aos valores das plantas não inundadas após 8 dias de recuperação. Quanto à GLN que normalmente representa em torno de 1% dos aminoácidos do nódulo, esta praticamente desapareceu nos tratamentos de inundação, mas a recuperação é mais rápida que a da ASN, sendo observada já com 1 dia de recuperação após todos os períodos de inundação observados. Quanto ao ASP, assim como GLN, que teve grande redução no tratamento de inundação em relação ao controle e a recuperação também foi rápida.

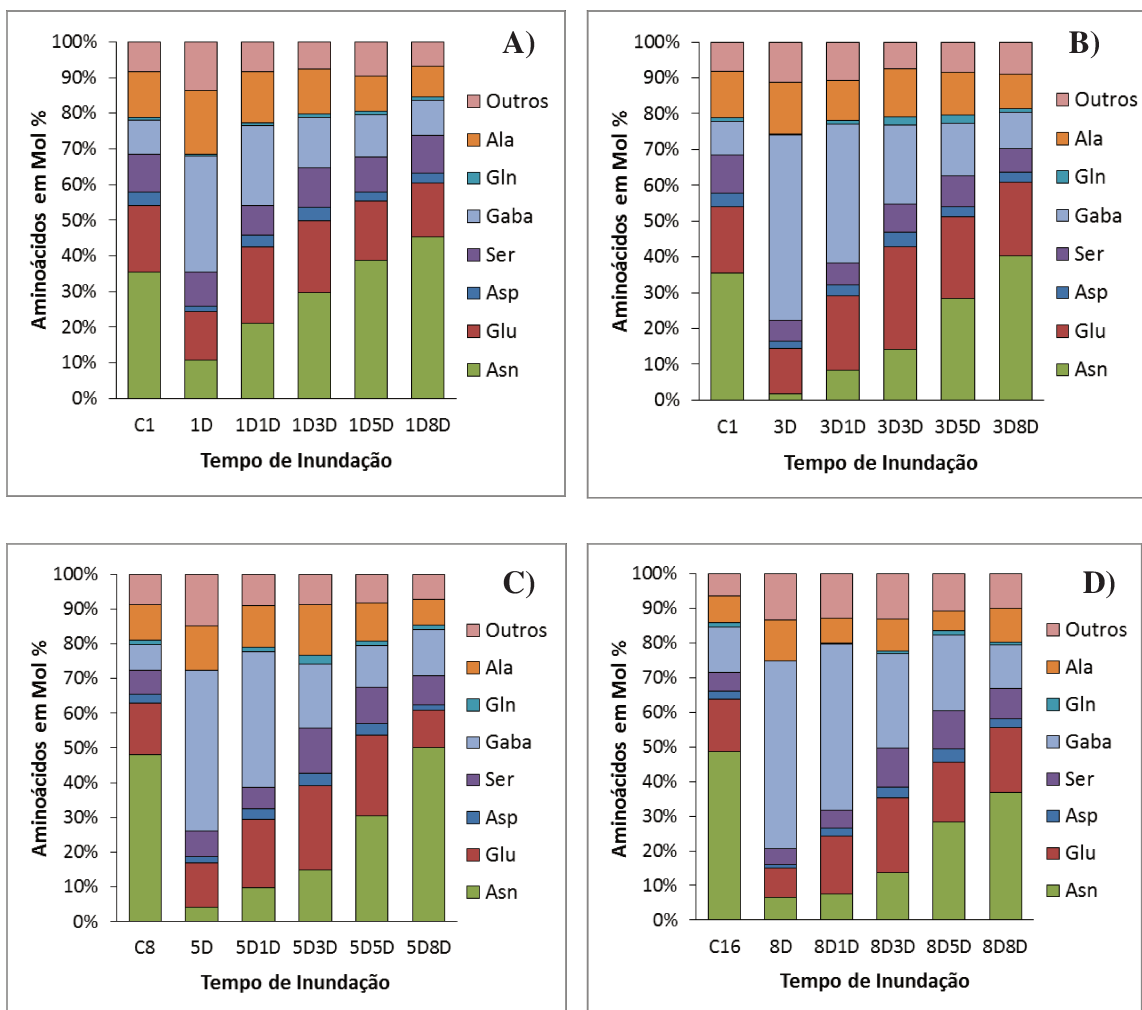


Figura 9: Composição de aminoácidos (mol %) nos nódulos de plantas de soja após 1 (A), 3 (B), 5 (C) e 8 dias (D) de inundações e plantas sob estes mesmos regimes de inundações, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1, 3, 5 e 8 dias; Tratamentos controle não-inundado coletados após, 1, 8 e 16 dias. Os dados representam a média (n=3).

Quanto aos aminoácidos totais, não houve uma diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) em que o valor médio foi $18,9 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$ (Fig. 10).

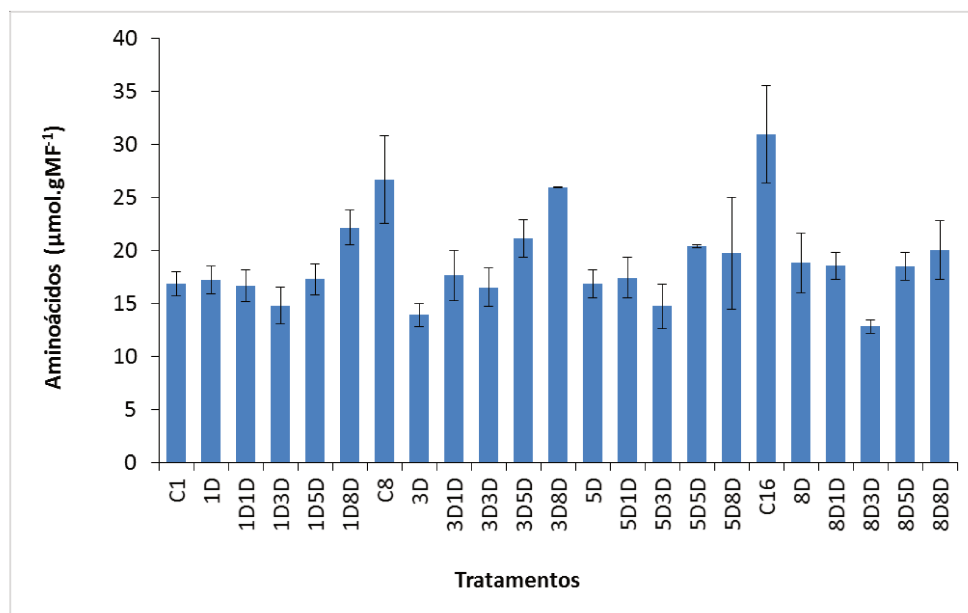


Figura 10: Teor de aminoácidos totais ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 1, 3, 5 e 8 dias de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1, 3, 5 e 8 dias; Tratamentos controle não-inundado (C) coletados após, 1, 8 e 16 dias. Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão.

Os valores encontrados na análise de açúcares livres totais e de sacarose do nódulo não diferiram significativamente entre os tratamentos de maneira geral (dados não apresentados). No entanto, o teor de amido variou de maneira significativa entre os tratamentos ($p<0,05$) sendo que os tratamentos de inundação 3D e 5D apresentaram valores mais baixos do que os demais (não inundado e recuperação) e os tratamentos de recuperação 8D3D e 8D5D apresentaram os valores mais elevados (Fig. 11). Quanto ao teor de ureídeos, o mesmo padrão foi observado. Foram encontrados menores teores de ureídeos nos tratamentos de inundação (Fig. 12).

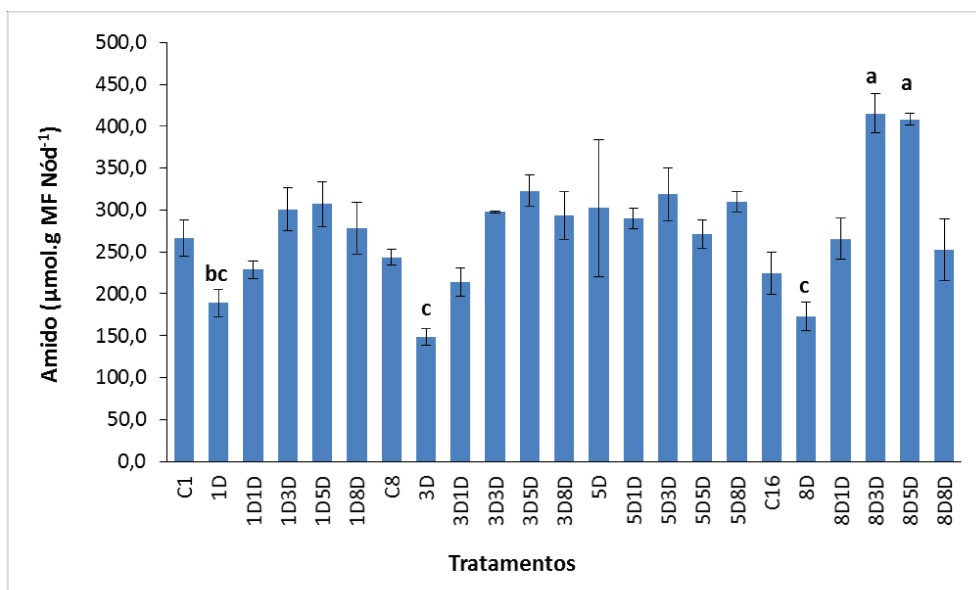


Figura 11: Teor de amido ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 1, 3, 5 e 8 dias de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1, 3, 5 e 8 dias; Tratamentos controle não-inundado (C) coletados após, 1, 8 e 16 dias. Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p<0,05$).

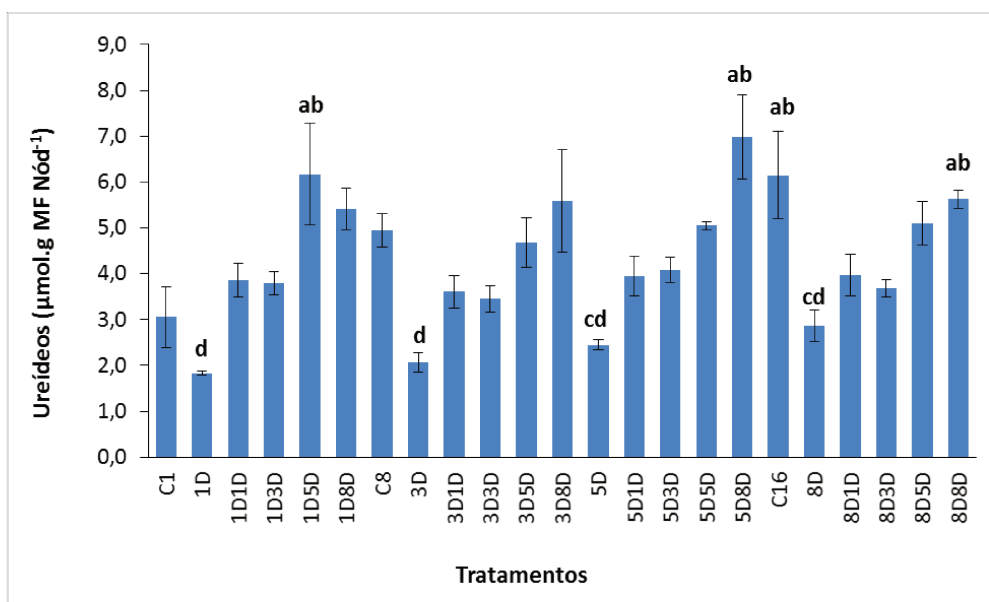


Figura 12: Teor de ureídeos ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 1, 3, 5 e 8 dias de inundação e plantas sob estes mesmos regimes de inundação, que foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 1, 3, 5 e 8 dias; Tratamentos controle não-inundado (C) coletados após, 1, 8 e 16 dias. Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p<0,05$).

8.4.6 Experimento VI: Aminoácidos do nódulo, raiz e xilema após inundação e recuperação na presença e ausência de NO₃⁻

Neste experimento em que as plantas foram inundadas tanto em solução com, quanto sem nitrato (como nos experimentos anteriores), e também nas recuperadas em solução com ou sem nitrato, foram analisados o extrato dos nódulos, das raízes e a seiva do xilema. Mudanças importantes ocorreram na composição de aminoácidos, mais fortemente ligadas à inundação que à presença do nitrato. Com relação aos tratamentos de inundação, verificou-se que as porcentagens dos aminoácidos ASN e GABA mudaram de forma acentuada em todos os três compartimentos analisados após 4 dias de inundação (Fig. 13, 14 e 15). Como observado anteriormente ASN, o aminoácido em maior proporção no xilema, nódulo e raiz, decaiu bastante e isto parece ser compensado por GABA que aumentou quase que proporcionalmente. As mudanças mais evidentes na proporção de ASN ocorreram no nódulo (Fig. 15), onde a amida praticamente desapareceu depois deste período de inundação quando os dados são comparados com a alta proporção (mais que 40% do total de aminoácidos) presente no controle não inundado, conforme observado nos experimentos anteriores. Com a remoção do estresse, ambos ASN e GABA recuperam-se no nódulo, atingindo níveis próximos aos encontrados no controle dentro de 3 dias. No entanto, mesmo após 9 dias a recuperação não foi completa. Esta recuperação parcial de ASN e GABA também foi observada na seiva do xilema. Outras mudanças importantes foram o acentuado declínio de GLN na seiva do xilema e aumento de ALA na raiz e também no xilema após a inundação. Estas mudanças foram totalmente revertidas em 3 dias de recuperação após a drenagem. Quanto à presença de nitrato, a alteração mais evidente foi com relação ao aminoácido ASN. Nos controles tratados com nitrato (C4+N,

C7+N e C13+N) houve um aumento no teor de ASN nas raízes e na seiva do xilema (Fig. 13 e 14), mas foi observado um efeito contrário nos nódulos (Fig. 15). A presença de nitrato durante os 4 dias de inundação também resultou num aumento de ASN nas raízes e na seiva do xilema e na redução de GLN na seiva do xilema. A presença de nitrato também acentuou o aumento de ALA nas raízes e na seiva do xilema.

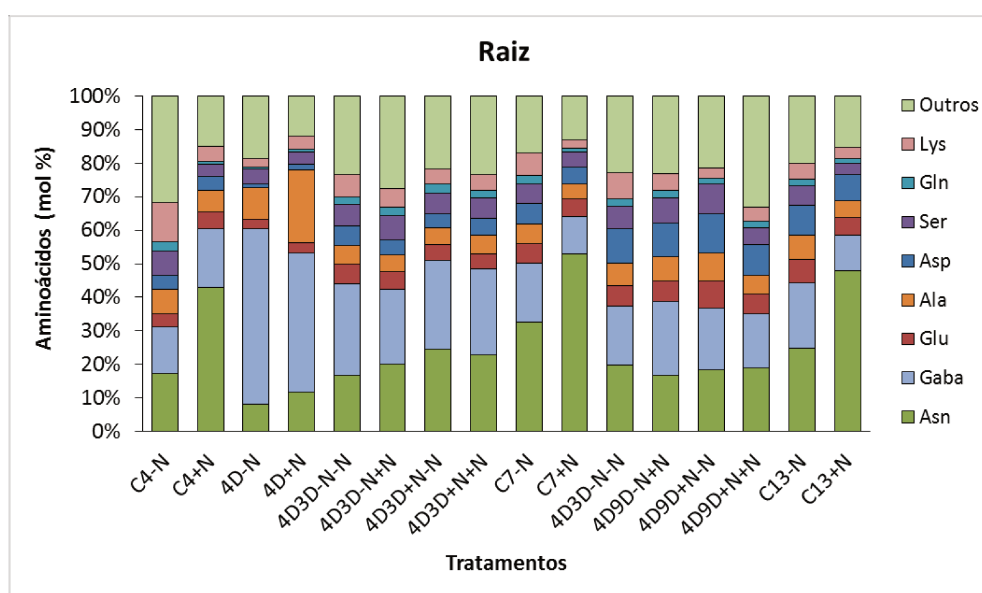


Figura 13: Composição de aminoácidos (mol %) nas raízes de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média (n=3).

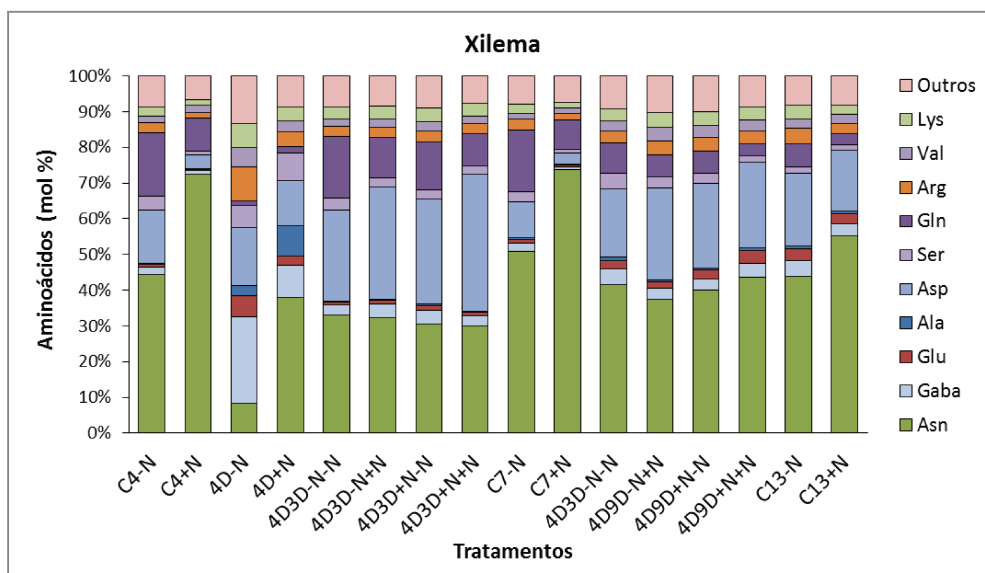


Figura 14: Composição de aminoácidos (mol %) na seiva do xilema de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média (n=3).

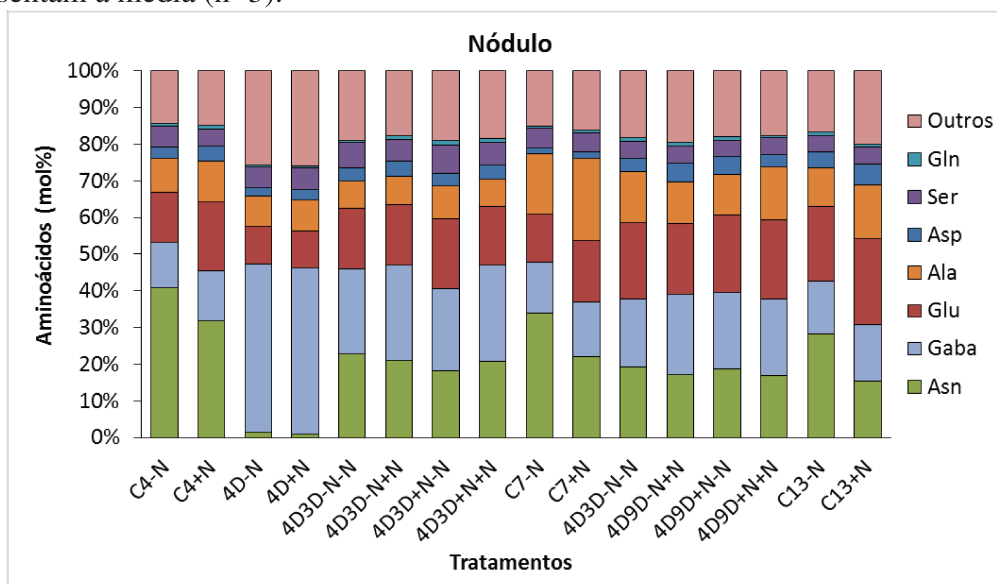


Figura 15: Composição de aminoácidos (mol %) nos nódulos de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média (n=3).

Quanto aos aminoácidos totais, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos no nódulo (Fig. 18) em que a média geral foi $17,3 \mu\text{mol.gMF}^{-1}$, semelhante à obtida no experimento anterior. Contudo, na raiz o teor de aminoácidos foi reduzido nos primeiros tratamentos controle C4-N e C4+N, e no tratamento de inundação sem nitrato (4D-N) (Fig. 16). Também foi observada alteração no teor de aminoácidos totais da seiva do xilema, sendo que o teor no tratamento de 4D-N é menor ($0,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) ($p<0,05$) que os demais tratamentos ($1,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) e maior nos tratamentos controle C4-N, C4+N e C7+N ($3,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) ($p<0,05$) como observado na Figura 17.

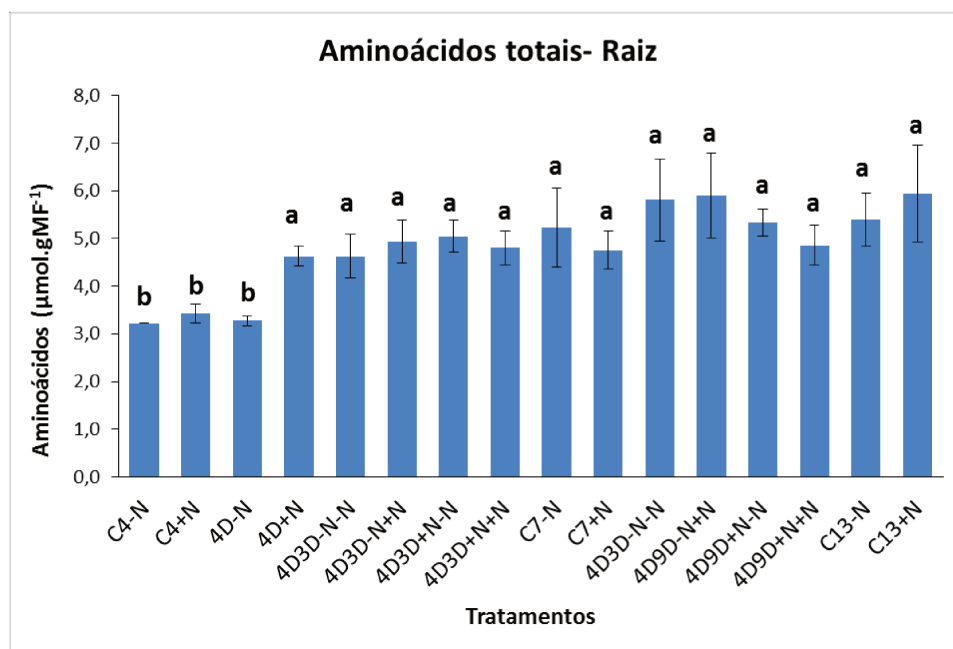


Figura 16: Teor de aminoácidos totais ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nas raízes de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p<0,05$).

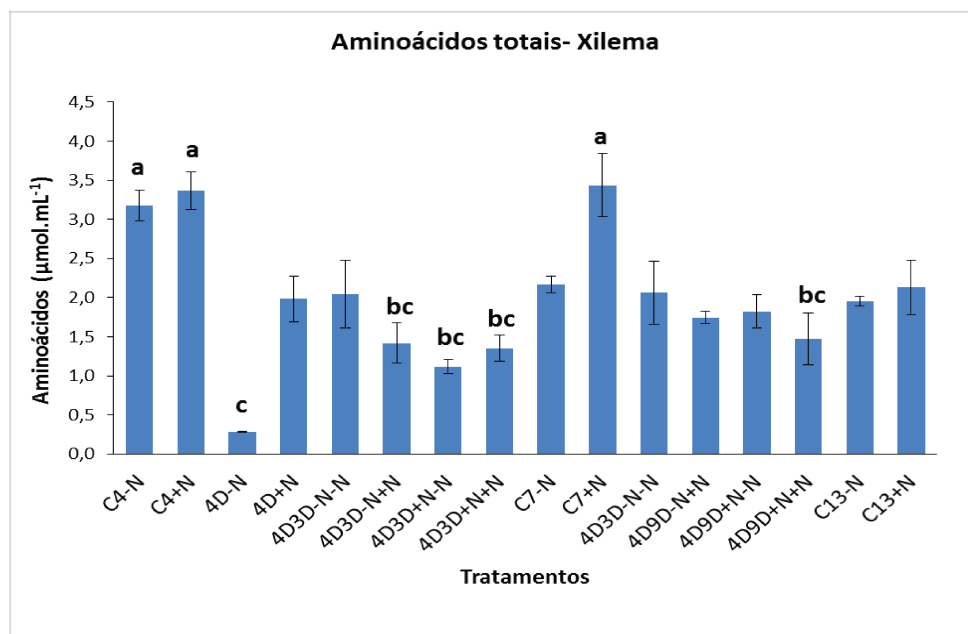


Figura 17: Teor de aminoácidos totais ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) na seiva do xilema de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tópic. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p<0,05$).

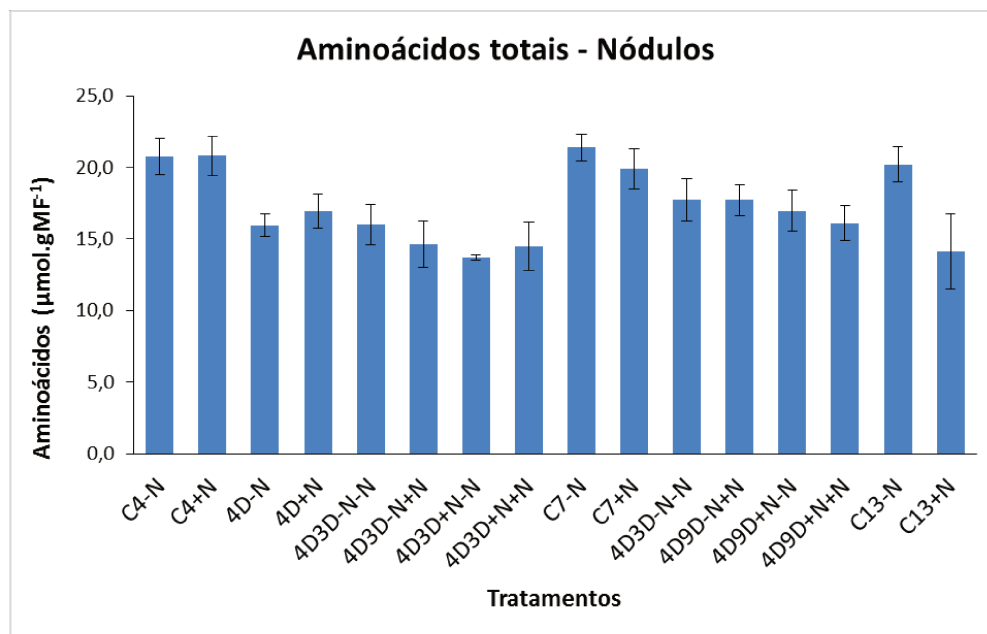


Figura 18: Teor de aminoácidos totais ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão.

Neste experimento também foram realizadas análises quantitativas de AST, sacarose, proteínas totais e URE nos nódulos e URE no xilema. Não houve diferenças significativas nos teores de AST, nos teores de proteínas totais ou URE (dados não apresentados) nos nódulos, apesar de no experimento anterior o teor de URE nos nódulos ter sido reduzido nos tratamentos de inundação. Mas houve diferença nos teores de sacarose que foram maiores nos tratamentos de inundação (Fig. 19). Também houve alterações nos teores de ureídeos na seiva do xilema (Fig. 20), em que o teor foi drasticamente reduzido pela inundação tanto em solução com, quanto sem nitrato. Quando comparamos os tratamentos controle tratados com ou sem nitrato, foi observado que o teor de URE foi menor nos controles tratados com nitrato (+N), exceto no controle C13 (-N ou +N).

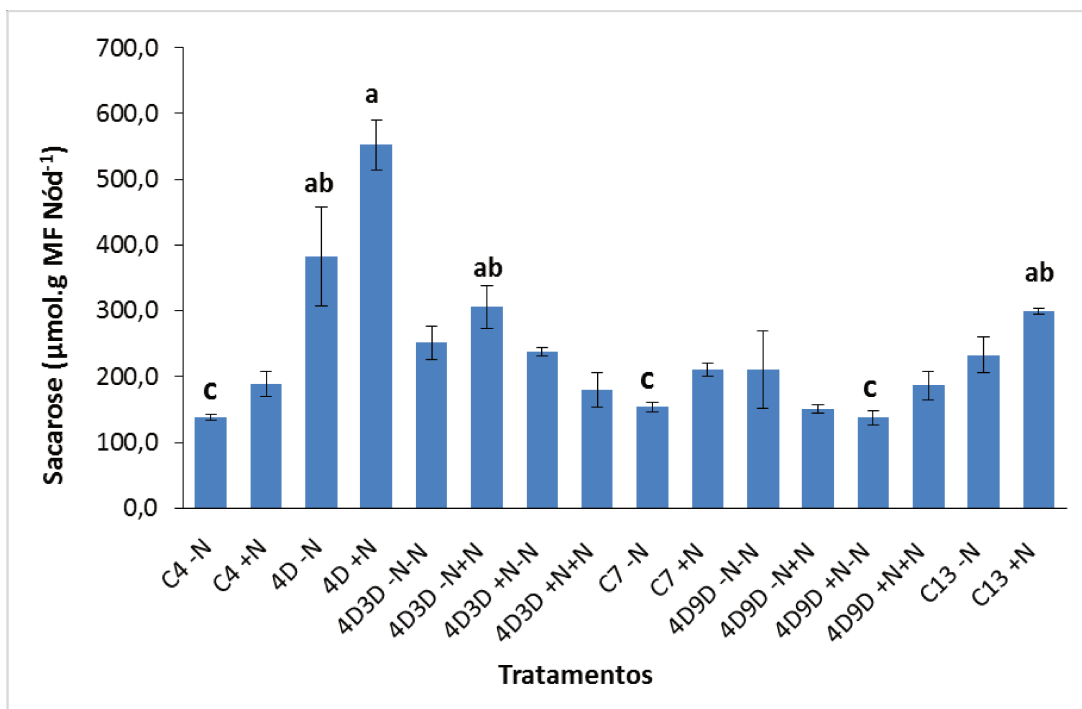


Figura 19: Teor de sacarose ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p<0,05$).

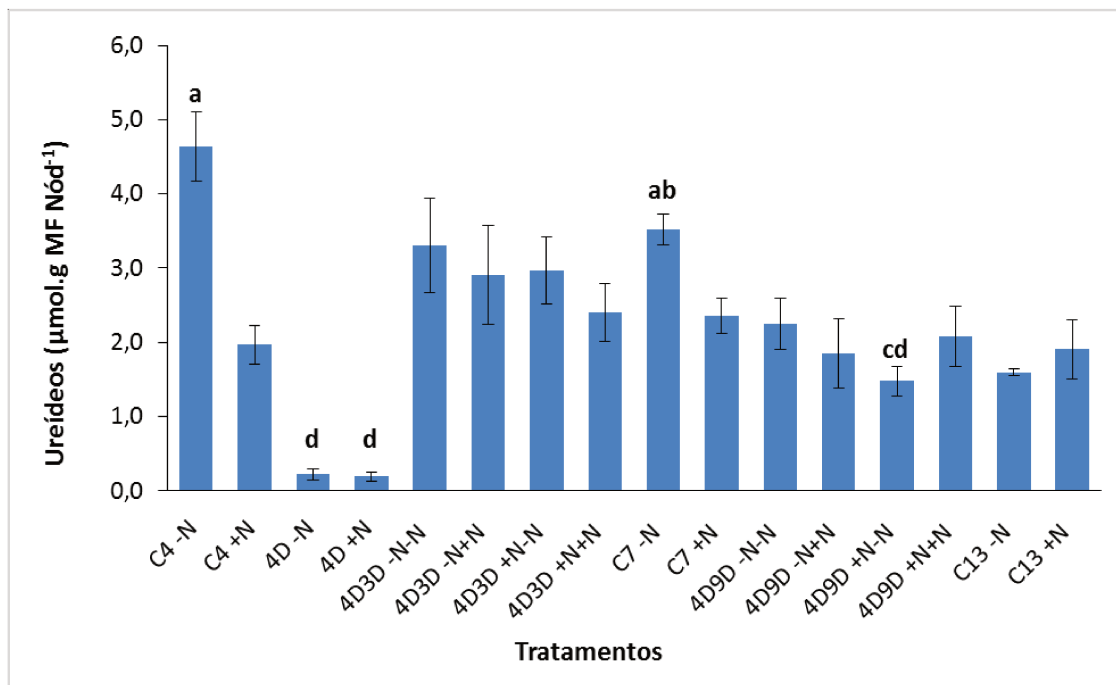


Figura 20: Teor de ureídeos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) na seiva do xilema de plantas de soja após 4 dias de inundação em solução sem nitrato (4D-N) e com nitrato (4D+N). Plantas sob estes mesmos regimes de inundação, após drenadas e mantidas em recuperação por 3 ou 9 dias em solução com ou sem nitrato, e plantas não-inundadas tratadas com solução com ou sem nitrato. (Obs: siglas descritas no tóp. 8.3.3.6 em Material e Métodos). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p<0,05$).

8.4.7 Experimento VII: Atividade da nitrogenase após inundação e recuperação

No experimento de avaliação da atividade (aparente) da nitrogenase, observa-se que a mesma foi a zero com 3 dias de inundação mas recuperou-se parcialmente após um dia de recuperação (Fig. 21). Com 5 dias de inundação a atividade foi bem menor que no controle porém não chegou a zero, e com 2 dias de recuperação a atividade voltou aos valores encontrados no controle (diferença não significativa).

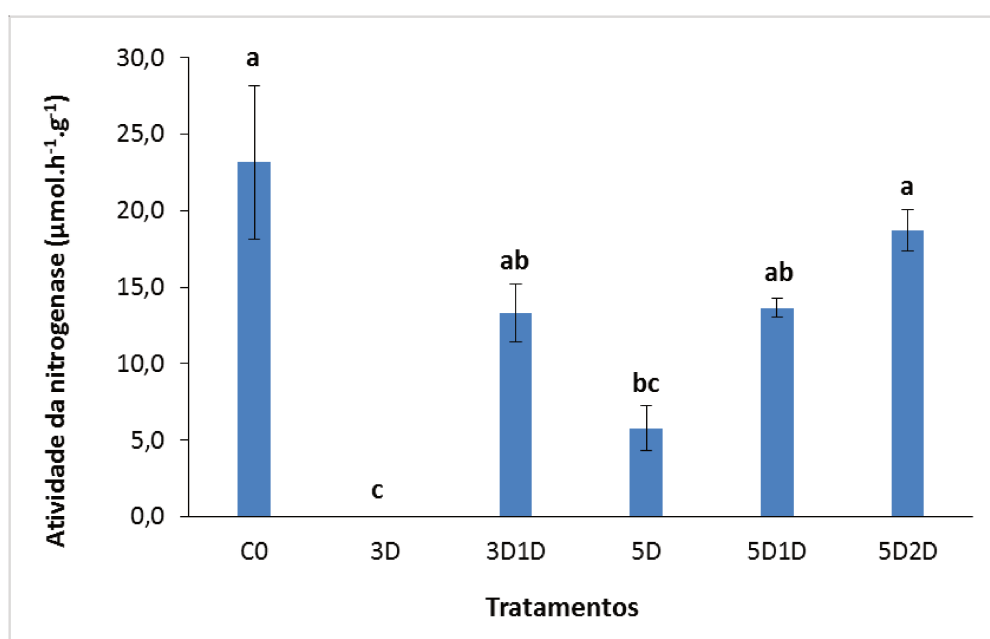


Figura 21: Atividade da nitrogenase ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) nos nódulos de plantas de soja após 3 dias de inundação (3D), 3 dias de inundação e 1 dia de recuperação (3D1D), 5 dias de inundação (5D) e 5 dias de inundação e 1 ou 2 dias de recuperação (5D1D,5D2D) e tratamento não inundado (C0) (controle). Os dados representam a média ($n=3$). As barras representam o erro padrão. As letras representam médias significativamente distintas ($p < 0,05$).

8.5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como enfoque principal estudar os efeitos da inundação e recuperação pós-estresse sobre o metabolismo de N nos nódulos de soja (cultivar IAC-17), através, principalmente, do estudo da composição de aminoácidos neste compartimento.

A exposição a curtos ou longos períodos de inundação altera a composição de aminoácidos no sistema radicular e na seiva do xilema (Drew, 1997; De Sousa & Sodek, 2003). Através dos ensaios realizados neste trabalho, podemos também afirmar que tanto períodos curtos quanto períodos longos de inundação, promoveram mudanças no metabolismo e na composição de aminoácidos nos nódulos de soja, o que também foi observado nas raízes e na seiva do xilema.

Com relação à composição de aminoácidos nos nódulos, pôde-se observar, que os aminoácidos mais abundantes em plantas não inundadas (controle) são respectivamente, ASN, GLU, SER, ASP e GABA, sendo que ASN representa sozinha praticamente 50% da composição de aminoácidos nos nódulos (mol%), e a somatória destes cinco aminoácidos representa em torno de 87% da composição total de aminoácidos nos nódulos de soja nos estádios avaliados (V7-V9).

Assim, considerando os experimentos de inundação e recuperação (Exptos. I, II, III e V), as mudanças na composição dos aminoácidos ASN e GABA no nódulo são evidentes após períodos de inundação mais longos, nos quais ASN diminuiu e GABA aumentou. Em termos quantitativos, as alterações em ASN e GABA foram as principais, pois a ASN, o principal aminoácido encontrado, praticamente desapareceu do nódulo e a queda foi compensada pelo aumento do GABA. Outros aminoácidos já sofreram alterações bruscas

em curtos períodos de inundação, não tendo sido detectados como GLN e ASP que começaram a diminuir nos nódulos com poucos minutos de inundação (Fig. 2). Estas alterações na composição de aminoácidos em períodos curtos (redução de GLN) nos nódulos e xilema observadas em nosso trabalho também foram encontradas no trabalho de Justino (2009), no qual avaliou-se o efeito da inundação no sistema radicular na seiva do xilema (principalmente) e também nos nódulos de soja. Contudo, ao contrário do observado por este autor o teor de ASN só reduziu a 1% após 4 dias de inundação, e não a partir de 30 minutos. A redução foi gradual e começou a partir de algumas horas de inundação. Nos nódulos houve uma redução no teor de ASP, mas em contrapartida houve um aumento no teor de ASP no xilema na inundação. O aumento na composição de ASP no xilema deve-se provavelmente à redução na síntese de ASN a partir de ASP. A diminuição da razão ASN/ASP na seiva do xilema também foi observada por outros autores (Amarante & Sodek, 2006; Antunes *et al.*, 2008).

Com relação ao teor de aminoácidos na seiva do xilema, foram obtidos resultados contrastantes (Fig. 7 e Fig. 17), em que no experimento IV (Fig. 7) o teor de aminoácidos durante a inundação foi maior do que os encontrados no controle, e no experimento VI (Fig. 17) foi menor. Com a inundação há uma redução na transpiração devido ao fechamento estomático (Irfan *et al.*, 2010), e de maneira geral espera-se que o teor de aminoácidos seja maior na inundação, uma vez que a seiva estará mais concentrada. No entanto o mesmo não foi observado no Expto. 8.4.6, o que pode estar relacionado às condições de temperatura e luminosidade do dia de coleta, uma vez que os experimentos foram realizados sob condições naturais.

Os efeitos observados devido à hipóxia do sistema radicular nos nódulos, na maioria dos casos, variaram de acordo com o tempo de exposição ao estresse, de forma que quanto maior o período de exposição, mais acentuado foi o efeito observado. A duração do estresse também teve efeito marcante no processo de recuperação pós-estresse, de maneira que, para ASN quanto maior a duração do estresse, mais tempo foi necessário para que a composição deste aminoácido voltasse a apresentar os mesmos valores encontrados nas plantas não inundadas. Em alguns casos, a recuperação total nem sempre foi observada.

A redução rápida da GLN em plantas simbióticas sinaliza que a fixação está sendo afetada, já que este aminoácido é indicador da eficiência deste sistema (Amarante & Sodek, 2006; Justino & Sodek 2013). Isto é comprovado pela acentuada redução na atividade da nitrogenase, observada tanto em nosso trabalho (Fig 21) quanto no trabalho de Justino & Sodek (2013). A maior parte da GLN produzida é enviada para o xilema, onde a diminuição na composição deste aminoácido, causada pela inundação, também foi observada após alguns minutos de exposição ao estresse, como observado no Expto. IV.

O teor de URE também diminuiu nos nódulos com a inundação (Fig. 12), e também está relacionado à redução acentuada da atividade da nitrogenase, assim como a GLN (Puiatti & Sodek 1999), o que de fato seria esperado uma vez que os URE são produtos específicos da FBN (McClure *et al.*, 1980; McNeil & LaRue, 1984; Herridge *et al.*, 1990). Esta redução no teor de URE em plantas de soja alagadas, também foi observada por Puiatti & Sodek, (1999) e Amarante & Sodek, (2006) na seiva do xilema. Sendo GLN produto direto da FBN e precursor destas substâncias, é coerente que assim como ocorreu a diminuição no teor de GLN nos nódulos e na seiva do xilema como observado neste trabalho, ocorreu a diminuição no teor de ureídeos nos nódulos e também no xilema.

Como anteriormente mencionado, a atividade da nitrogenase, diminuiu drasticamente na inundação. Isto se deve principalmente à menor disponibilidade de energia livre (ATP) para o funcionamento da enzima, em consequência da redução da respiração aeróbia (Layzell & Hunt, 1990; Downie, 2005; Justino & Sodek, 2013). Todavia, a atividade da nitrogenase foi recuperada totalmente após a remoção do estresse. Observa-se que a atividade da nitrogenase após 3 dias de inundação, não foi ao menos detectada, no entanto, há uma pequena atividade após 5 dias de inundação, e isto se deve provavelmente ao fato de após 5 dias já ter iniciado a formação do aerênquima nos nódulos (Thomas *et al.*, 2005). Este experimento de medição da atividade da nitrogenase foi realizado para demonstrar que a atividade da nitrogenase é recuperada, e que, os efeitos causados na composição dos aminoácidos no nódulo, que demoram a se recuperar ou não se recuperam estão ligados a outros fatores, como atividade ou expressão de outras enzimas, por exemplo.

Com relação à ASN que é o aminoácido em maior proporção tanto nos nódulos quanto na seiva do xilema de plantas simbióticas de soja, observa-se uma redução acentuada, partindo de 50% e chegando a menos de 3% da composição total de aminoácidos após 4 dias de inundação.

Diversos fatores podem contribuir para a redução de ASN nos nódulos. Aqui algumas hipóteses sobre a redução de ASN nos nódulos são apresentadas. Primeiro, partindo do princípio que ASN é formada a partir de GLN e ASP pela ação da enzima asparagina sintetase (AS) (Parker & Pratt, 2011), observa-se que com a redução primária da GLN, haverá uma maior quantidade de ASP em relação à mesma. Entretanto, o ASP tem caráter ácido e contribui para redução do pH celular, e a célula precisa criar mecanismos

para que isso não ocorra ou ocorra em menor grau. Aparentemente, partindo dos resultados aqui observados, a rota de formação do ASP via GLU pode ser invertida de forma que: ASP → GLU → GABA, uma vez que a composição deste aminoácido aumenta consideravelmente. A redução na composição de ASN no nódulo pode estar relacionada tanto à menor atividade da enzima asparagina sintetase (Lima & Sodek, 2003) quanto à limitação de seus precursores GLN e ASP, além da limitação de ATP uma vez que a AS é ATP-dependente (Lea & Fowden, 1975). Além disso, a recuperação de ASN também foi lenta e gradual. Isto condiz com os dados de Lima & Sodek (2003), que avaliaram a atividade da AS nos nódulos de soja e verificaram redução na atividade da enzima nos tratamentos mantidos em hidroponia (mesmo sob aeração, para FBN o efeito é o mesmo) e a atividade aumentava gradualmente com o tempo após a transferência das plantas para a vermiculita.

A diminuição da GLN está diretamente ligada à redução na atividade da nitrogenase e conseqüentemente à fixação de N₂, além da saída de GLN do nódulo para o xilema como produto do transporte do N para a parte aérea. A atividade da GS não foi afetada pela baixa pressão de O₂ nos nódulos de feijão-de-corda segundo Atkins *et al.* (1990), mas a atividade da GOGAT é reduzida em situações de baixa pressão de O₂. Entretanto, Rocha *et al.* (2010a), verificaram uma redução, ainda que pequena, na expressão do gene que codifica GS em nódulos de *L. japonicum* sob hipóxia, demonstrando que a baixa disponibilidade de O₂ também pode afetar a síntese de GS ao nível molecular, apesar da expressão não necessariamente levar à redução da atividade, uma vez que outros passos regulatórios estão envolvidos neste processo. Limami *et al.* (2008), avaliando a atividade da GS em plântulas de *Medicago truncatula* sob hipóxia, verificaram redução acentuada na atividade da GS e

na expressão gênica da mesma. Uma vez que a enzima GS é ATP-dependente (McParland *et al.*, 1976) com a redução de ATP devido a hipóxia, espera-se que haja redução da atividade pela limitação de ATP.

O acúmulo de GABA em condições de estresse é um fato muito comum em plantas, e as razões para este acúmulo são diversas, algumas ainda não totalmente esclarecidas. O GABA pode atuar na osmorregulação, no fluxo de carbono para o ciclo TCA e na manutenção do pH da célula (Bouché & Fromm 2004; Fait *et al.*, 2007), uma vez que, GABA é um aminoácido neutro (Bouché & Fromm 2004), e na formação de GABA a partir de GLU através da enzima glutamato descarboxilase (GAD), há consumo de H⁺, que também pode estar envolvido na regulação do pH celular (Bouché & Fromm 2004).

Serraj *et al.*, (1998) também observaram um aumento significativo de GABA nas raízes e ainda maior nos nódulos de soja em hidroponia (para a FBN o efeito da hidroponia com aeração é o mesmo que na inundação, Lima & Sodek, 2003). Estes autores sugerem que o aumento de GABA está ligado à regulação do pH, uma vez que o nódulo já possui o metabolismo energético otimizado para produção de energia em condições de baixa disponibilidade de O₂ (barreira à entrada de O₂ e leghemoglobina) e assim durante um estresse de O₂ acentuado sobre o nódulo o mais importante seria regular o pH celular.

Apesar das alterações observadas na composição destes aminoácidos, de maneira geral, não houve diferença no teor de aminoácidos totais nos nódulos, o que implica dizer que, enquanto o teor de alguns aminoácidos diminuiu o de outros aumentou de maneira aparentemente proporcional. Esta interconversão de aminoácidos, aparentemente bastante ativa durante a inundação, ocorre provavelmente no sentido de manter o pH, uma vez que

com a hipóxia, o pH da célula tende a diminuir devido, por exemplo, ao acúmulo de lactato, o que pode afetar a função de diversas enzimas que podem ser induzidas ou inibidas, como por exemplo, a H⁺ATPase (Irfan, *et al.*, 2010).

O N fixado na forma de GLN + ASN é exportado do nódulo sem alterações nos níveis totais de aminoácidos no nódulo, de forma que quando a FBN é prejudicada há um reflexo na exportação dos aminoácidos e não nos níveis dos mesmos no nódulo. Entretanto, ASN é o principal aminoácido do nódulo e o seu declínio para zero implica numa perda grande de N. Assim duas hipóteses são propostas, a primeira é que se ASN sai do nódulo para transporte no xilema, devendo haver outra fonte de N, provavelmente o floema (Atkins *et al.*, 1988; Parsons *et al.*, 1993), para compensar esta perda e formar GABA. A segunda hipótese é que toda ASN do nódulo seria transformada em GABA, inicialmente via asparaginase seguindo a sequência ASN-> ASP-> GLU-> GABA. Desta forma, a ASN “residual” presente no xilema seria oriunda do floema.

A análise da composição de aminoácidos na seiva do floema foi realizada em nosso trabalho e observamos que os aminoácidos mais abundantes foram, respectivamente, GABA, SER, ALA, ASN e ASP. Nossos dados não condizem com aqueles encontrados nos trabalhos de Lima & Sodek (2003), De Souza & Sodek (2003) e Oliveira & Sodek (2013), em que aos aminoácidos em maior proporção no floema de soja foram ASP e GLU seguidos pela ASN, porém as condições dos experimentos e estádios da planta não foram os mesmos. Assim como nos trabalhos citados, não foram observadas variações na composição destes aminoácidos com os tratamentos de inundação e recuperação aplicados. É provável que os aminoácidos presentes no floema supram os nódulos e raízes (Barta, 1987) durante a inundação quando a FBN é inibida, o que pode explicar a existência de

ASN “residual” no xilema após a inundação eliminar a ASN nos nódulos, uma vez que observamos que ASN está presente na seiva do floema (Fig. 8). Além disso, a degradação de proteínas também deve ser considerada como fonte de N para a fração de aminoácidos nos nódulos durante a inundação, apesar de não termos encontrado em nosso trabalho diferenças significativas no teor de proteínas totais.

Com relação à análise de carboidratos, verificamos que os teores de amido nos nódulos foram reduzidos nos tratamentos de inundação (Fig. 11), e os de sacarose elevados no caso do experimento VI (Fig. 19). Nos trabalhos de Barta (1987) e Castonguay *et al.* (1993), ambos trabalhando com efeito do alagamento nas raízes de alfafa (*Medicago sativa*), foi observado um aumento nos teores de sacarose nas raízes ressaltando que o suprimento de carboidratos não limita a respiração anaeróbia nas raízes. Barta (1988) não observou efeito da inundação sobre o teor de amido em alfafa, diferente do aqui observado. Além disso, este aumento no teor de carboidratos, uma vez que a redução do amido implica na sua degradação em sacarose, parece estar correlacionado ao fato de que sob ação das vias fermentativas devida à hipóxia há uma maior necessidade de esqueletos carbônicos para manter o fluxo de carbono (Dennis *et al.*, 2000; Sairam *et al.*, 2008).

Com relação ao efeito da presença de nitrato na solução nutritiva usada na inundação ou nos tratamentos de recuperação das plantas (Expto. VI), observou-se que os efeitos da inundação foram mais evidentes do que os da adição de nitrato. No tratamento de inundação, nas raízes e na seiva do xilema, a presença do nitrato aumentou a proporção de ASN e ALA em relação ao tratamento inundado sem nitrato. A importância fisiológica do acúmulo de ALA nas raízes sob hipóxia tem sido reportada na literatura (De Souza & Sodek, 2003; Limami, *et al.*, 2008; Rocha, *et al.*, 2010a).

Antunes (2007) observou um aumento na atividade da enzima redutase do nitrato (RN) que é responsável pela assimilação do nitrato, tanto nas raízes quanto nos nódulos de plantas de soja transferidas da hidroponia em solução sem nitrato para hidroponia em solução com nitrato. Aqui observamos que o nitrato foi assimilado sob hipóxia uma vez que o teor de aminoácidos totais na seiva do xilema foi maior em plantas inundadas com nitrato do que naquelas inundadas em solução sem nitrato (Fig. 17). Oliveira *et al.* (2013b) também observaram assimilação de nitrato em raízes de soja não nodulada sob condições de hipóxia. Os teores de aminoácidos nas raízes e nódulos separadamente não diferiram de forma significativa para os dois tratamentos. Ainda de acordo com Antunes (2007), plantas de soja noduladas, cultivadas sem N mineral não apresentaram atividade da RN nas raízes, mas após fornecer o nitrato a enzima é induzida e alcança uma atividade bastante elevada. No presente estudo, embora não tenha sido dosada a atividade da RN, mesmo sob o estresse de inundação o fornecimento do nitrato aparentemente levou à assimilação do mineral pois houve aumento no teor de aminoácidos na seiva do xilema (Fig. 15). O teor de aminoácidos no xilema é tido como indicador da assimilação do N na raiz (Pate, 1973; Pate *et al.*, 1975; Atkins *et al.*, 1980), pelo menos em parte, pois o floema também contribui com a reciclagem de aminoácidos chegando à raiz (Pate *et al.*, 1981; Parsons & Baker, 1996).

Verificamos diversas alterações no metabolismo de N nos nódulos de soja sob hipóxia, tanto na composição de aminoácidos, principalmente a redução de ASN e aumento de GABA, redução na atividade da nitrogenase, diminuição no teor de ureídeos e também aumento no teor de carboidratos (sacarose).

Dessa forma, como a fixação de N_2 é praticamente eliminada pelo estresse de alagamento, é de se esperar que o metabolismo dos aminoácidos, principalmente aqueles mais próximos à assimilação do N atmosférico como GLN e ASN, esteja entre os mais afetados. A influência do estresse em outras enzimas do metabolismo destes aminoácidos não foi estudada aqui, porém trabalhos encontrados na literatura demonstraram os efeitos da baixa pressão de O_2 sobre o metabolismo de N nos nódulos, GOGAT (Atkins *et al.*, 1990) AS (Lima & Sodek, 2003) expressão da AS (*SASI*) (Antunes *et al.*, 2008), dados que demonstram que diversas mudanças ocorrem durante a inundação sobre a FBN e assimilação do mesmo nos nódulos e também no transporte de N para o xilema.

8.6 CONCLUSÕES

- Os níveis de ASN nos nódulos é bastante prejudicada com o alagamento do sistema radicular.
- A recuperação do metabolismo da ASN é lenta e ocorre conforme o tempo de exposição à inundação, ou seja, quanto maior o tempo de inundação maior o tempo para recuperação.
- A redução de ASN nos nódulos é compensada pelo aumento de GABA, que poderia ter como principal função regular o pH, sendo esta alteração a mais notória neste trabalho.
- Plantas inundadas em solução com nitrato o assimilam nas raízes mesmo sob hipóxia.
- Mesmo após períodos longos (5 dias) de alagamento do sistema radicular a atividade da nitrogenase recupera-se.

9.0 CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS PRODUZIDOS NO NÓDULO A PARTIR DA FBN EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO DO SISTEMA RADICULAR E RECUPERAÇÃO PÓS ESTRESSE ATRAVÉS DA ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO DO ¹⁵N.

9.1 INTRODUÇÃO

O N é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas. As plantas podem obtê-lo na forma inorgânica (amônia e nitrato) e orgânica (ureia, aminoácidos) (Williams & Miller, 2001). Além disso, as plantas capazes de realizar simbiose com bactérias do grupo *Rhizobia*, formam em suas raízes os nódulos, estruturas especializadas na captação e conversão do N atmosférico N₂ (N molecular) para forma inorgânica, a amônia através da enzima nitrogenase (Shubert, 1986).

A atmosfera terrestre é composta por 78,09% de N₂. Assim a quantidade de N molecular é abundante, embora as plantas sozinhas não sejam capazes de assimilá-lo (Kneip *et al.*, 2007), tornando a FBN um fenômeno de extrema importância no ciclo deste elemento, bem como para o desenvolvimento vegetal e para a agricultura (Herridge *et al.*, 2008).

A FBN traz benefícios não somente às plantas simbióticas, mas para todo um sistema florestal ou agrícola, uma vez que o N absorvido por elas poderá ser incorporado ao solo e a outras espécies de plantas não fixadoras, aumentando a disponibilidade de N para as plantas em geral (Herridge *et al.*, 2008).

Através do uso do isótopo estável ^{15}N , que permite seguir e quantificar este nutriente nas plantas em diferentes compartimentos (Handley & Raven, 2006), é possível estudar o comportamento das moléculas que o incorporam e como é o comportamento dessas moléculas numa situação de estresse, neste caso sob hipóxia por alagamento do sistema radicular (Oliveira & Sodek, 2013).

Há algum tempo, tem se utilizado o isótopo $^{15}\text{N}_2$ (gás N marcado) no estudo do metabolismo de N em nódulos de plantas. No trabalho de Ohyama & Kumazawa (1980), no qual foi estudada a assimilação do N proveniente da FBN nos nódulos de soja, utilizaram para tal propósito o isótopo $^{15}\text{N}_2$, sendo este trabalho um dos pioneiros no uso desta ferramenta no estudo da assimilação de N. Desde então, alguns estudos têm sido feitos, utilizando isótopo $^{15}\text{N}_2$ para elucidação do metabolismo de N em nódulos de plantas (Atkins, *et al.*, 1980; Herridge *et al.*, 1990; Parsons & Baker, 1996; Scharff *et al.*, 2003; Justino & Sodek, 2013).

A soja é uma leguminosa de extrema importância na agricultura mundial e é capaz de se associar a rizóbios do solo e fixar N molecular. A simbiose é eficiente e a soja é capaz de completar seu ciclo de vida com alta produtividade sem a adição de fontes externas de N (Hungria *et al.*, 2001). No entanto a FBN nesta leguminosa é sensível a condições de hipóxia (Amarante & Sodek, 2006; Justino & Sodek, 2013). Com a inundação do sistema radicular a atividade da nitrogenase é reduzida, levando conseqüentemente à redução da FBN e a alterações na composição de aminoácidos na seiva do xilema (Justino & Sodek, 2013) e, como observado no Cap. I, também leva a modificações na composição de aminoácidos nos nódulos.

Dessa forma, para obter informações sobre o metabolismo dos aminoácidos formados a partir da FBN pretendeu-se neste trabalho através do uso do isótopo $^{15}\text{N}_2$ verificar o padrão de marcação dos aminoácidos com ^{15}N , sob hipóxia devido ao alagamento do sistema radicular e também durante a recuperação pós estresse.

9.2 OBJETIVOS

9.2.1 Objetivo geral

- Verificar o padrão de marcação dos aminoácidos com ^{15}N nos nódulos e na seiva do xilema sob inundação do sistema radicular e recuperação para obter informações sobre o seu metabolismo.

9.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo ideal para incubação com $^{15}\text{N}_2$.
- Avaliar o padrão de marcação dos aminoácidos do nódulo e xilema após incubação com $^{15}\text{N}_2$

9.3 MATERIAL E MÉTODOS

As condições de cultivo das plantas, bem como o preparo da solução nutritiva, manutenção dos rizóbios e coleta do material vegetal (seiva do xilema e nódulos) foram as mesmas descritas no tópico Material e Métodos do Capítulo I.

9.3.1 Montagem dos experimentos: incubação com $^{15}\text{N}_2$ em vasos Qubit[®]

Plantas plenamente noduladas entre os estágios V7-V9 (estágios de desenvolvimento, conforme Fehr *et al.*, 1971) foram removidas dos vasos e agitadas suavemente para livrar o sistema radicular da maior parte da vermiculita, lavadas com água destilada, e o excesso de água foi retirado com auxílio de papel absorvente. Em seguida, foram transferidas para vasos Qubit[®] (permitem a vedação do sistema radicular) (Qubit Systems, Inc., Kingston, Ontário, Canadá) e o espaço excedente foi preenchido com bolas de vidro, o que deixa um espaço livre preenchido com ar de 300 mL. Foram acrescentados 140 mL de água, e o vaso foi tampado e selado com massa Qubit (hermeticamente vedado). Foram coletados 40 mL de gás N_2 marcado com ^{15}N (99% átomo, da Sigma[®]) em seringa de 60 mL sem agulha. A ponta da seringa foi encaixada no orifício pela conexão *Luer*, e o gás injetado dentro do vaso, enquanto que pela saída na lateral inferior do vaso é permitido o escoamento dos 40 mL de água deslocados pela entrada do gás (Fig. 1). Desta forma o espaço livre dentro do vaso ficou em 200 mL, sendo que havia $^{15}\text{N}_2$ em 20% deste volume (40 mL de $^{15}\text{N}_2$ diluído em 200 mL, cerca de $\pm 23\%$ de ^{15}N , considerando que 78% da composição do ar é N_2). Cada vaso continha 3 plantas.

No momento da coleta as raízes foram imediatamente colocadas em recipiente com água e gelo. Os nódulos foram destacados da raiz e o excesso de água foi removido com

auxílio de papel absorvente. Os nódulos então foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados em freezer a -20°C até a extração dos aminoácidos em ácido sulfosalicílico a 2% (item 9.3.3.1) para as análises de enriquecimento com ¹⁵N no GC/MS (item 9.3.4). A seiva do xilema assim que foi coletada, foi mantida em tubos sobre o gelo e ao final das coletas foram armazenados em freezer como as amostras de nódulo, até o momento das análises de enriquecimento com ¹⁵N no GC/MS.



Figura 1: Sistema de incubação com ¹⁵N₂ em vasos Qubit® com o sistema radicular de três plantas em cada vaso. A seringa permanece conectada à porção superior do vaso após injeção do ¹⁵N₂ até que o sistema seja desmontado. A mangueirinha na porção inferior contém água deslocada pela entrada do ¹⁵N₂. A água impede que haja entrada de ¹⁴N do meio externo.

9.3.2 Experimentos

9.3.2.1 Expto. I: Avaliação do tempo de incubação com $^{15}\text{N}_2$ em plantas controle (não-inundadas):

Neste primeiro experimento, as plantas foram colocadas nos vasos Qubit[®], e incubadas com o $^{15}\text{N}_2$ (conforme descrito no item 9.3.1 desta seção) durante diferentes períodos de tempo. Os períodos de exposição com o $^{15}\text{N}_2$ foram: 10, 20, 30 e 60 minutos. Plantas não expostas também foram coletadas (controle negativo sem $^{15}\text{N}_2$).

No fim da exposição as plantas e os nódulos foram coletados conforme item 9.3.1.

9.3.2.2 Expto. II: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo após inundação e recuperação em plantas incubadas posteriormente com $^{15}\text{N}_2$:

Neste experimento, os vasos em que as plantas eram cultivadas em vermiculita foram colocados dentro de vasos maiores com 3L de capacidade, e foram então inundados com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) sem N mineral (solução -N) com 1/3 da força iônica original, mantendo uma lâmina de água de cerca de 2 cm acima do substrato. As plantas permaneceram inundadas por 1, 3 e 5 dias e recuperadas após estes períodos de inundação por 1, 3 e 5 dias. Após o período de inundação ou recuperação as plantas foram retiradas da vermiculita, e incubadas nos vasos Qubit[®] com $^{15}\text{N}_2$ (item 1.0) durante 60 minutos. Plantas controle (não inundadas) também foram incubadas e coletadas. Após o período de exposição, as plantas foram retiradas dos vasos e os nódulos foram coletados (item 9.3.1).

9.3.2.3 Expto. III: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo em plantas previamente incubadas com $^{15}\text{N}_2$ e submetidas à inundação

Neste experimento a incubação/exposição com $^{15}\text{N}_2$ foi realizada antes de submetê-las aos tratamentos. As plantas foram retiradas da vermiculita, lavadas em água destilada e então incubadas com $^{15}\text{N}_2$ por: 1 hora (Série A) ou 4 horas (Série B). Após os períodos de incubação as plantas foram inundadas em solução $-\text{N}$ (1/3 da força iônica original) em vasos com 3L de capacidade por: 1, 3 e 5 dias. Plantas controle (não inundadas) também foram incubadas e coletadas.

Após os períodos de incubação as plantas foram retiradas dos vasos, os nódulos foram destacados da raiz, congelados em N_2 líquido e armazenados em freezer a -20°C até a extração dos aminoácidos com ácido sulfosalicílico (item 9.3.1).

9.3.2.4 Expto. IV: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos em plantas incubadas com $^{15}\text{N}_2$ após tratamento de inundação e recuperação, aperfeiçoando o método de incubação

Neste experimento foi realizada uma pequena adaptação em relação ao Expto. II com relação ao procedimento de incubação das plantas. A fim de evitar que o estresse causado pela retirada das raízes da vermiculita e imediata montagem do sistema de incubação afetasse a eficiência do sistema, ou seja, para evitar que outra fonte de variação pudesse interferir no procedimento, as plantas dos tratamentos controle e recuperação, foram retiradas da vermiculita um dia antes da incubação, e foram mantidas durante 24 horas já nos vasos Qubit[®] com as bolas de vidro e com cerca de 3 cm de água de torneira na base do vaso (em contato com as raízes). No caso das plantas inundadas, as mesmas foram

previamente retiradas da vermiculita e mantidas sob inundação dentro dos vasos Qubit® com solução -N (1/3) cobrindo todo o sistema radicular, cerca de 2 cm acima do mesmo.

No dia da coleta/incubação, as plantas foram mantidas por 1 hora com o $^{15}\text{N}_2$ e os nódulos coletados e armazenados (item 9.3.1).

Os tratamentos deste experimento foram, controle (não-inundado), 4 dias de inundação (4D) e plantas que foram inundadas por 4 dias e postas em recuperação por 5 dias (4D5D).

9.3.2.5 Expto. V: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos e na seiva do xilema de plantas incubadas em diferentes tempos com $^{15}\text{N}_2$

Plantas de soja em estágio V8-V9 foram incubadas em $^{15}\text{N}_2$ por diferentes períodos de acordo com o tratamento para coleta da seiva do xilema. Os tratamentos deste experimento foram:

Tratamento 60 min.: as plantas intactas permaneceram incubadas por 30 minutos e, após, a parte aérea foi seccionada para coleta da seiva do xilema. A seiva foi coletada durante 30 minutos (tempo total de incubação com $^{15}\text{N}_2 = 60$ min.);

Tratamento 90 min.: as plantas intactas permaneceram incubadas por 60 minutos e a seiva foi coletada durante 30 minutos (tempo total de incubação com $^{15}\text{N}_2 = 90$ min.);

Tratamento 150 min.: as plantas intactas permaneceram incubadas por 120 minutos a seiva foi coletada durante 30 minutos (tempo total de incubação com $^{15}\text{N}_2 = 150$ min.);

Tratamento 210 min.: as plantas intactas permaneceram incubadas por 180 minutos a seiva foi coletada durante 30 minutos (tempo total de incubação com $^{15}\text{N}_2 = 210$ min.);

No fim da exposição ao $^{15}\text{N}_2$ em cada tratamento, ou seja, ao final da coleta da seiva do xilema, as plantas foram retiradas dos vasos e as raízes imediatamente colocadas em recipiente com água e gelo. A seiva foi armazenada em tubos sob gelo e posteriormente congelada até as análises de incorporação de $^{15}\text{N}_2$ feito em GC/MS. Os nódulos foram destacados da raiz, imediatamente congelados em N_2 líquido e armazenados em freezer a -20°C até a extração dos aminoácidos com ácido sulfosalicílico (item 9.3.3.1) para posterior análise da incorporação de ^{15}N em aminoácidos por GC/MS (item 9.3.4).

9.3.3 Análises bioquímicas

9.3.3.1 Extração em ácido sulfosalicílico a 2% e eluição dos aminoácidos em coluna Dowex 50Wx8 H⁺

Para extração dos aminoácidos, aproximadamente 0,250 g de massa fresca de nódulos (congeladas em N_2 líquido) foi extraída em 2 mL de ácido sulfosalicílico 2%. Em seguida o material foi agitado em vortex e mantido em repouso por 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 14000 $\times g$ por 10 minutos, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante separado e passado em coluna Dowex 50Wx8 H⁺.

Para o preparo das colunas foram usados 0,5 g de resina Dowex 50W x 8H+ 200 mesh da Sigma[®]. Num béquer a resina foi suspensa em NaOH a 2 M (20 mL) para retirar qualquer resíduo fixo na resina por troca com os íons Na^+ . Após o sobrenadante decantar, o

NaOH foi retirado e a resina foi lavada com água deionizada 4 vezes seguidas (20 mL cada) para remover o NaOH.

Posteriormente, suspendeu-se a resina em 10 mL de HCl a 2 M para transformar a resina na forma H⁺, e em seguida a suspensão foi transferida para a coluna. Após formada a coluna, a resina foi lavada com mais 10 mL de HCl a 2 M. Em seguida a coluna foi lavada outras quatro vezes com água deionizada (20 mL cada). Foi colocada sobre a resina um disco de fibra de vidro GF/C da Whatman[®] para mantê-la compacta durante a adição dos solventes. A coluna foi novamente lavada com água deionizada e após isso estava pronta para o uso. A coluna sempre foi mantida hidratada com aproximadamente 10 mL de água deionizada quando não estava sendo utilizada.

Durante o uso, a água deionizada foi descartada e a amostra (2 mL do extrato em ácido sulfosalicílico) foi colocada na coluna. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 4 mL de água deionizada. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de hidróxido de amônio (NH₄OH) a 4 M para eluir os aminoácidos que ficaram retidos na coluna. As primeiras cinco gotas foram descartadas e o restante foi coletado. Mais 2 mL de NH₄OH foram colocados e as cinco primeiras gotas foram coletadas e o restante foi descartado. A coluna foi então lavada com água deionizada (20 mL) duas vezes seguidas, em seguida lavada com 10 mL de HCl, lavada novamente com água deionizada, estando a partir deste ponto, pronta para ser reutilizada.

Do volume de amostra de nódulo coletado após passagem na coluna (2mL) em NH₄OH, 1/10 foi separado e concentrado (seco) sob jato de nitrogênio gasoso. As amostras

de seiva do xilema foram separadas em alíquotas de 50 µL e também foram secas em jato de nitrogênio gasoso para posterior derivatização e análise no GC/MS.

9.3.4 Análise de aminoácidos por GC/MS

A técnica para a derivatização dos aminoácidos seguida pela sua separação e análise por GC-MS foi baseada no método descrito por Persson & Nasholm (2001), que por sua vez foi baseado nos métodos descritos por Godber & Parsons (1998). Seguindo este procedimento, as amostras foram secas em jato de N₂ gasoso, e após a secagem das mesmas adicionou-se 100µL de diclorometano (CH₂Cl₂) para retirar possíveis resíduos de água por evaporação. No caso das amostras de seiva do xilema foram adicionados 100 µL de HCl a 0,1 M para eliminar possíveis interferentes (Silvester *et al.*, 1996) e as amostras foram secas novamente. Em seguida adicionou-se 30µL de piridina e 30µL de MTBSTFA [N-metil-N(-Tertbutildimetilsilil) trifluorocetamida] como agente derivatizante. A reação foi realizada em banho-seco com temperatura de 70°C durante 30 minutos. Foi usado um padrão de aminoácidos Sigma® AAS-18, com os aminoácidos (ASP, GLU, SER, HIS, GLY, THR, ARG, ALA, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU e LYS), aos quais foram adicionados os aminoácidos ASN, GLN e GABA, todos na concentração de 2,5 µmol.mL⁻¹, e para a análise foram diluídos 10 vezes. Uma alíquota de 40 µL deste padrão foi seca em jato de N₂ gasoso e derivatizado como no procedimento descrito anteriormente.

A análise por GC/MS foi conduzida utilizando o sistema de cromatografia gasosa, da marca Shimadzu®, modelo 2010A acoplada ao espectrômetro de massas quadrupolo modelo QP2010. O sistema de cromatografia gasosa é equipado com uma coluna capilar modelo DB5 com as dimensões de 30m x 0,32mm (partícula 0,25µm). Os aminoácidos

foram separados em gradiente de temperatura de 100°C a 300°C com taxa de aumento em 6°C/minuto, usando Hélio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, forno (da coluna) e interface do GC/MS foram, respectivamente, 290°C, 100°C, e 250°C. Os espectros de massa foram registrados por impacto de elétrons (EI) em 70 eV na faixa m/z de 200 a 510. Os valores citados foram estabelecidos após testes preliminares com padrões de aminoácidos.

Para calcular o enriquecimento dos aminoácidos em ^{15}N , a seguinte fórmula foi usada:

Porcentagem de N enriquecido = $(R_e - R_c) / [1 + (R_e - R_c)] \times 100$ (Silvester *et al.*, 1996)

onde $R_e = [(M + 1)/M]$ das amostras provenientes de material exposto ao ^{15}N , e R_c é igual a mesma relação M+1 e M para as amostras de material controle (não expostas ao ^{15}N). A massa (M) do fragmento principal é usada, o que corresponde à massa [M-57] para a maioria dos aminoácidos (Chaves das Neves & Vasconcelos, 1987).

9.3.5 Delineamento experimental e análise dos dados

Todos os experimentos foram realizados com delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições onde cada planta foi uma unidade experimental. Quando necessário, os dados foram submetidos à análise de variância. Por se tratarem de porcentagem, os mesmos foram convertidos para arco seno da raiz de x, e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo uso do software estatístico VARPC, desenvolvido pelo professor e orientador deste trabalho, Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas.

9.4 RESULTADOS

9.4.1 Expto. I: Avaliação do tempo de incubação com $^{15}\text{N}_2$ em plantas controle (não-inundadas):

Este primeiro experimento de incubação do sistema radicular das plantas com $^{15}\text{N}_2$ teve por objetivo estabelecer um tempo de exposição adequado para que fosse utilizado nos demais experimentos. O intervalo de tempo adequado para os experimentos seria entre o tempo mínimo que permite detectar a incorporação do isótopo nos aminoácidos até o tempo mais longo em que os aminoácidos estivessem marcados no nível máximo de saturação, ou seja, aquele no qual entrassem em equilíbrio isotópico. Tempos mais prolongados seriam teoricamente desnecessários pois estando em equilíbrio isotópico o perfil de incorporação não deve alterar. Para este propósito escolhemos os tempos 10, 20, 30 e 60 minutos para observar o padrão de marcação/saturação dos aminoácidos.

Assim no gráfico da figura 2 abaixo, podemos observar que a partir de 10 minutos de incubação, os principais aminoácidos da assimilação primária de N já apresentaram uma marcação com $^{15}\text{N}_2$ de fácil detecção. Estes valores foram próximos àqueles observados nos tempos posteriores, ou seja, após 10 minutos de incubação a marcação intensificou pouco. Observa-se que a GLN é o aminoácido marcado em grau bem mais elevado seguido respectivamente por GLU, ASP, ALA e SER. É notável o fato de que a GLN atingiu um valor de enriquecimento máximo já a partir do início do experimento, pois não foi superado com tempos maiores de incubação, indicando que o “pool” de GLN atingiu o equilíbrio isotópico com o $^{15}\text{N}_2$ rapidamente.

O enriquecimento dos aminoácidos GLU, ASP, ALA e SER tendeu a aumentar até 30 minutos de exposição ao isótopo, mas o enriquecimento desses aminoácidos não se intensificou aos 60 minutos, indicando que a partir dos 30 minutos eles entraram em equilíbrio isotópico. Por outro lado, o enriquecimento de ASN e GABA permaneceu bem abaixo dos outros aminoácidos marcados, apesar de os seus precursores metabólicos (ASP e GLU respectivamente) apresentarem um enriquecimento bem maior (Fig. 2).

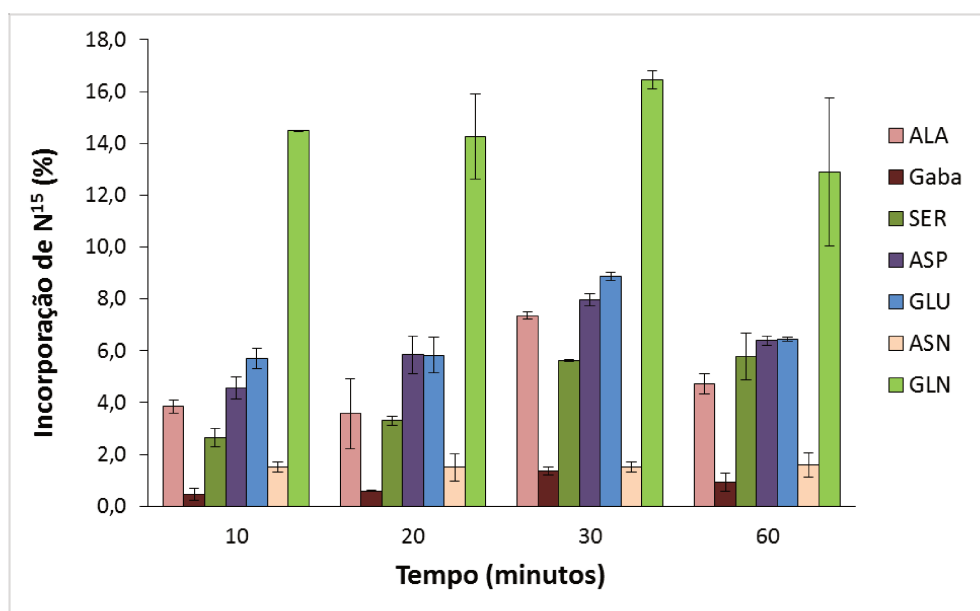


Figura 2: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos SER, ASP, GLU, ASN, GLN, GABA e ALA, em nódulos de soja após 10, 20, 30 e 60 minutos de incubação com $^{15}\text{N}_2$ (dados normalizados). Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

9.4.2 Expto. II: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo após inundação e recuperação em plantas incubadas posteriormente com $^{15}\text{N}_2$

Este experimento teve como objetivo avaliar a marcação dos aminoácidos dos nódulos em diferentes períodos de inundação e recuperação. Após os períodos de inundação e/ou recuperação aos quais foram submetidas, as plantas foram incubadas com o $^{15}\text{N}_2$ durante 1 hora, de acordo com o experimento anterior, tempo suficiente para a marcação plena dos aminoácidos principais da assimilação primária de N.

Pode-se observar que a marcação variou significativamente ($p < 0,05$) entre o controle não inundado e os tratamentos de inundação, para a maioria dos principais aminoácidos do nódulo (Fig. 3). A marcação foi nitidamente menor nos tratamentos de inundação para os aminoácidos apresentados, exceto para ASN e GABA para as quais não foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos inundados. A marcação de ASN e GABA foi bem baixa em relação aos demais (sem evidência clara de alterações no grau de incorporação), principalmente em relação à GLN, assim como observado no experimento anterior onde foram analisadas somente plantas controles em diferentes períodos de incubação. Para todos os aminoácidos avaliados houve pouca diferença na incorporação de ^{15}N entre os tratamentos de 1, 3, e 5 dias de inundação.

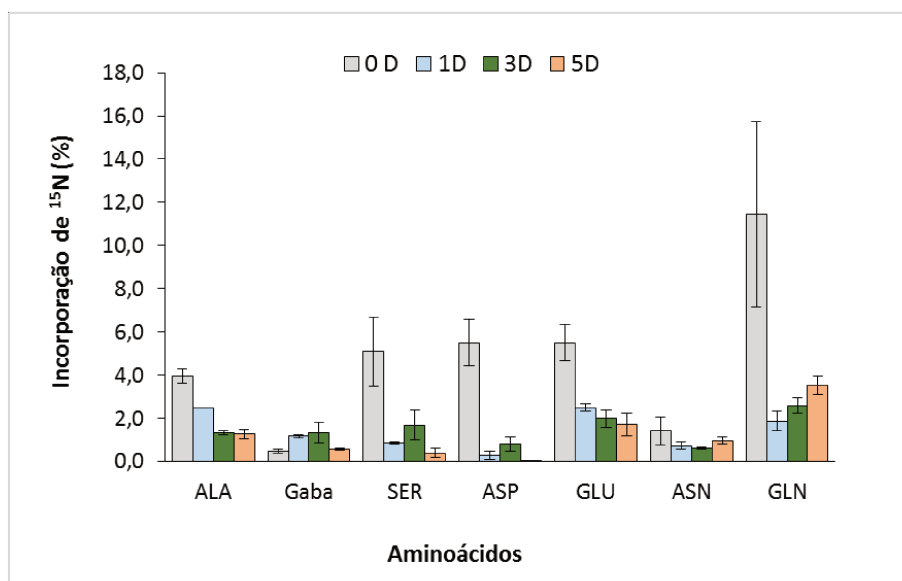


Figura 3: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 1, 3 e 5 dias de inundação; controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 1 hora com $^{15}\text{N}_2$ após os tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

Também não houve diferenças significativas na incorporação de ^{15}N entre os tratamentos de recuperação e os tratamentos de inundação. Portanto, não houve evidência da recuperação do metabolismo destes aminoácidos, pois o grau de marcação não alcançou os valores observados no tratamento controle (não inundado) (Fig. 4, 5 e 6). Com exceção do aminoácido SER, que começou a se recuperar no tratamento de 1 e 5 dias de recuperação após um dia de inundação (Fig. 4) e nos tratamentos de 5 dias de inundação e 1 e 5 dias de recuperação 5D1D e 5D5D (Fig. 6), os demais aminoácidos não apresentaram indícios de recuperação em nenhum dos tratamentos.

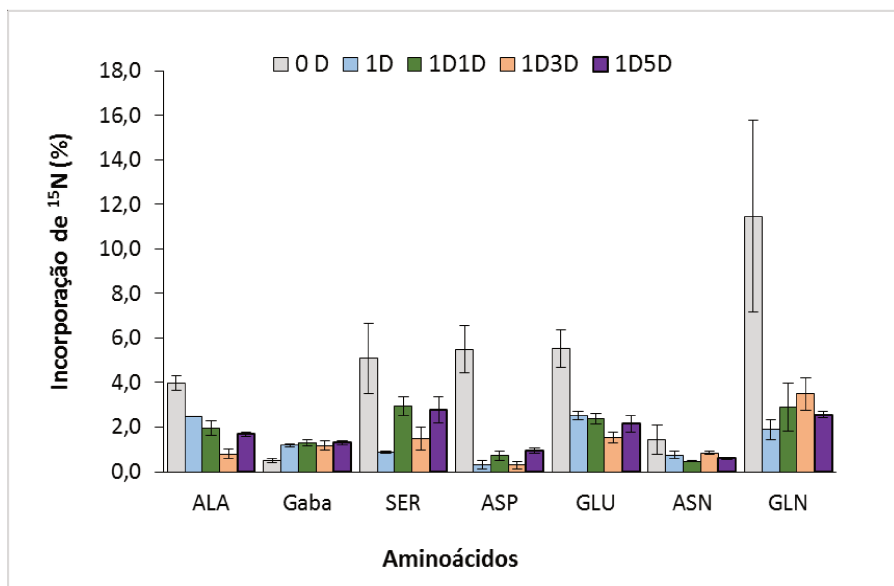


Figura 4: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 1 dia de inundação seguido de 1, 3 e 5 dias de recuperação; controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 1 hora com $^{15}\text{N}_2$ após os tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

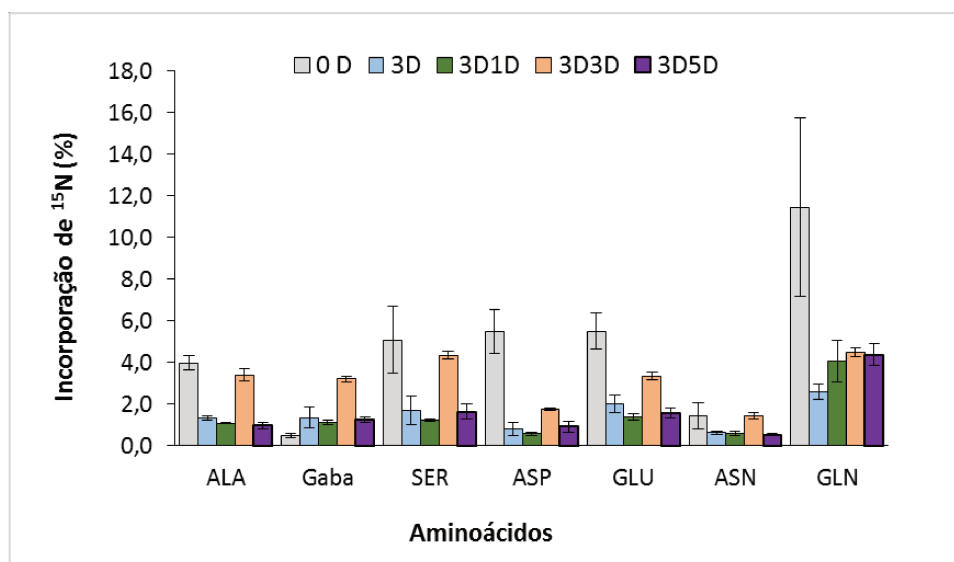


Figura 5: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 3 dias de inundação seguido de 1, 3 e 5 dias de recuperação; controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 1 hora com $^{15}\text{N}_2$ após os tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

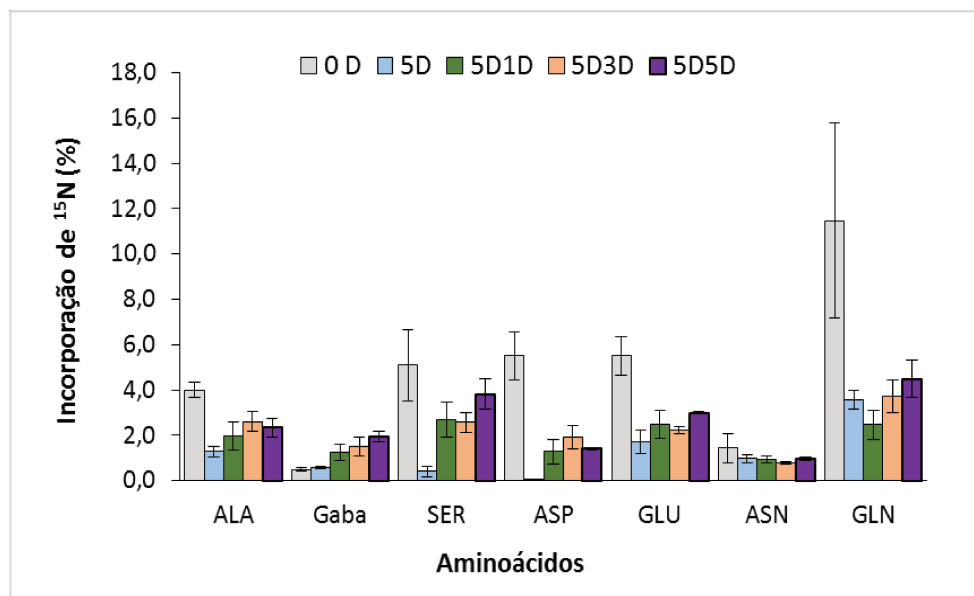


Figura 6: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 5 dias de inundação seguido de 1, 3 e 5 dias de recuperação; controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 1 hora com $^{15}\text{N}_2$ após os tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão

9.4.3 Expto. III: Avaliação da marcação dos aminoácidos do nódulo em plantas previamente incubadas com $^{15}\text{N}_2$ e submetidas à inundação

Neste experimento em que as plantas foram incubadas com $^{15}\text{N}_2$ primeiro, um grupo foi exposto ao isótopo por 1 hora e outro por 4 horas, e submetidas ao estresse depois, observou-se que a marcação dos aminoácidos no nódulo foi afetada pela inundação, com respostas diferentes conforme o aminoácido. As variações na incorporação de ^{15}N para os aminoácidos avaliados tanto nas plantas que foram previamente incubadas por 1 hora quanto nas incubadas por 4 horas com ^{15}N , foram significativas ($p < 0,05$) (Fig. 7 e 8).

Para a maioria dos aminoácidos, a incorporação de ^{15}N reduziu com a inundação, geralmente de forma progressiva entre 1 e 5 dias de inundação (Fig. 7 e 8). A principal

exceção é o GABA que aumentou o enriquecimento de ^{15}N após 1 e 3 dias de inundação em ambos os períodos de incubação e aos 5 dias apresentou redução para um valor próximo ao do controle. GLN também apresentou uma resposta diferenciada nas plantas incubadas por 4 horas pois a pequena redução observada não foi significativa. Quanto aos demais aminoácidos (ALA, SER, ASP e GLU) a incorporação de ^{15}N diminuiu de forma brusca e já foi afetada com 1 dia de inundação. O aminoácido ASN apresentou um padrão de redução semelhante, porém um pouco mais suave, pois a incorporação de ^{15}N foi afetada significativamente apenas a partir de 3 dias de inundação (em ambos os períodos de incubação).

A incorporação de ^{15}N não diferiu entre os períodos de incubação de, 1 ou 4 horas, o que é coerente com os dados anteriores (Fig. 2) indicando a saturação dos aminoácidos com o isótopo em tempos inferiores a 1 hora. Entretanto a incorporação de ^{15}N foi sempre menor no tratamento de 5 dias de inundação em ambos os períodos de incubação observados.

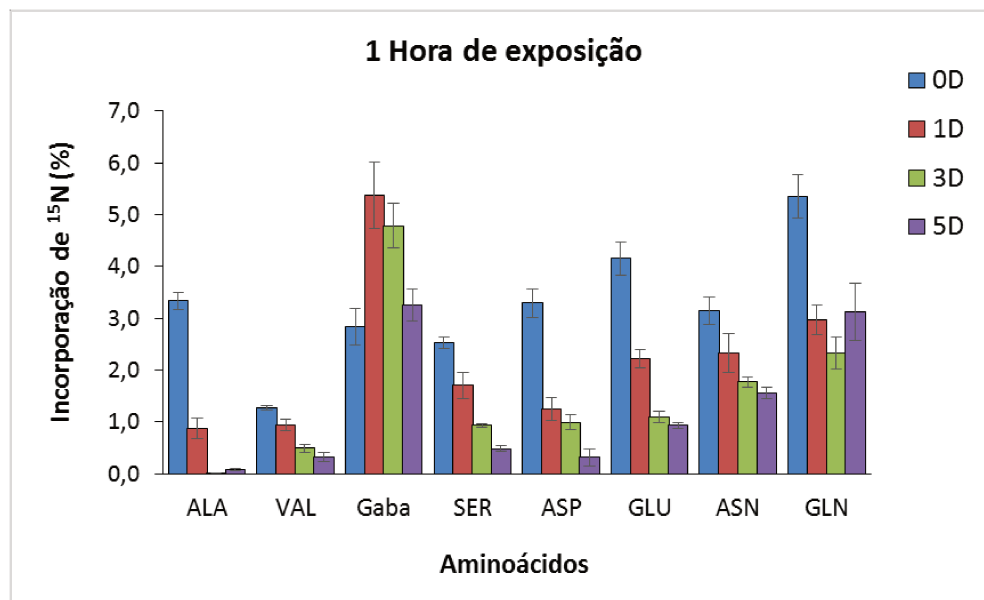


Figura 7: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 1, 3 e 5 dias de inundação; controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 1 hora h com $^{15}\text{N}_2$ antes dos tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

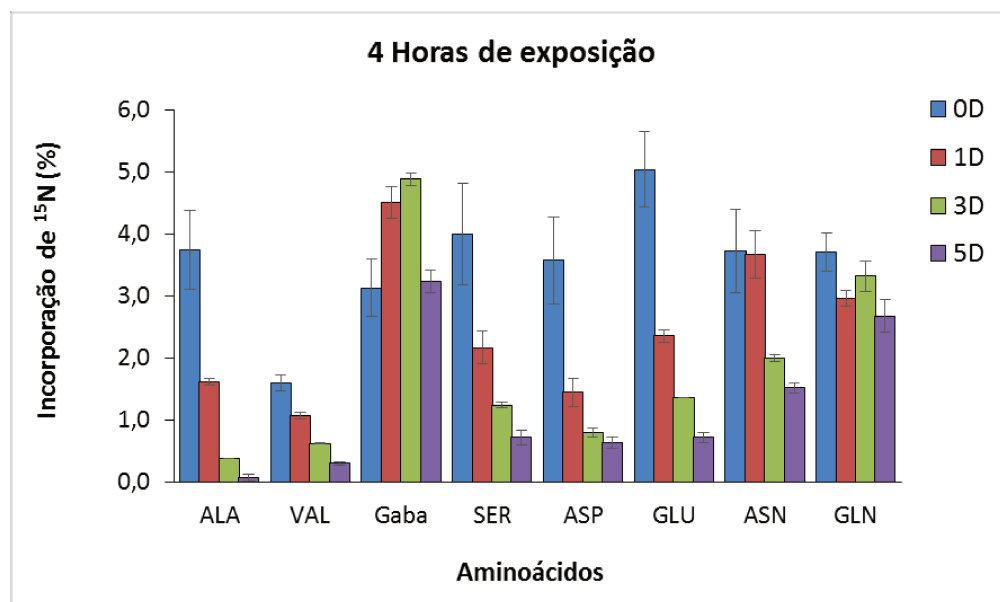


Figura 8: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 1, 3 e 5 dias de inundação; controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 4 horas com $^{15}\text{N}_2$ antes dos tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

9.4.4 Expto. IV: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos em plantas incubadas com $^{15}\text{N}_2$ após tratamento de inundação e recuperação, aperfeiçoando o método de incubação

Tendo em vista a recuperação pouco evidente do metabolismo dos aminoácidos em termos de grau de incorporação de ^{15}N no experimento anterior, no presente experimento foi feita uma pequena modificação na técnica visando diminuir possíveis efeitos adversos do estresse sofrido pela planta durante a retirada da mesma da vermiculita e transferência para o vaso usado para os ensaios com $^{15}\text{N}_2$. Portanto, o experimento anterior foi, em parte, repetido aqui, porém no caso das plantas controle e do tratamento de recuperação, foram transferidas para os vasos do ensaio com ^{15}N um dia antes do ensaio para permitir a adaptação da planta ao novo ambiente.

Neste experimento, a recuperação foi total para a maioria dos aminoácidos (Fig. 9) assim justificando a modificação no procedimento experimental adotada. Considerando os tratamentos controle e inundado (4D), assim como observado nos experimentos anteriores, GLN apresenta maior incorporação de ^{15}N , e GABA e ASN as menores. No entanto, quando observamos o tratamento de recuperação (4D5D), o qual foi inundado por 4 dias e recuperado do estresse após 5 dias, verificou-se que, diferente do resultado obtido no Expto. II (item 9.4.3), foi possível observar através do padrão de incorporação de ^{15}N que a maior parte dos aminoácidos avaliados conseguiu recuperar-se e apresentar a mesma incorporação observada no controle não-inundado (Fig. 9). Esses dados condizem com aqueles obtidos para composição de aminoácidos por HPLC, estudadas no Cap. I deste trabalho. Da mesma forma, também observou-se que o aminoácido ASN não consegue recuperar-se 5 dias após remoção do estresse.

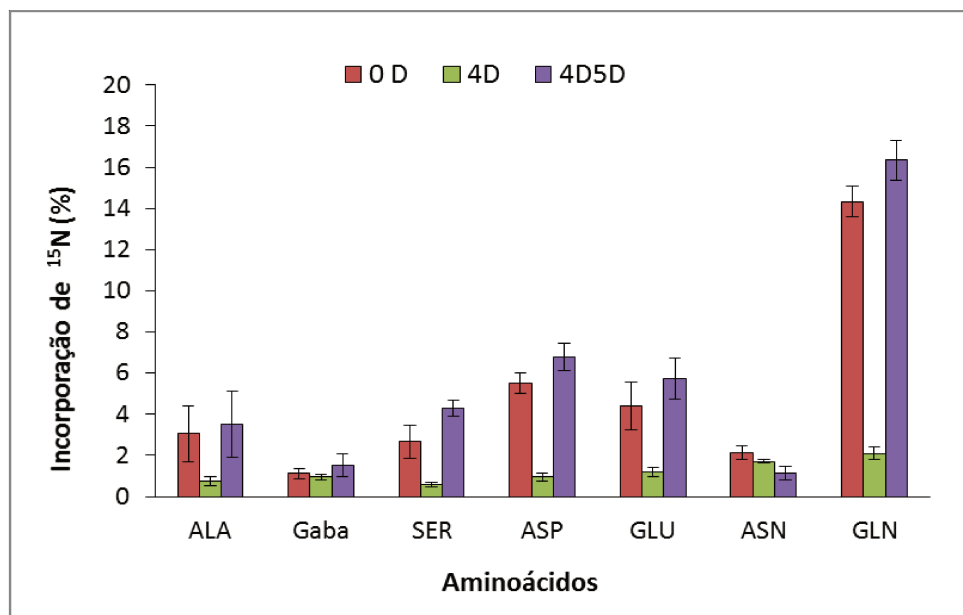


Figura 9: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja. Tratamentos: 4 dias de inundação; 5 dias de recuperação pós inundação (4D5D); controle não inundado (0D). Todas as plantas incubadas durante 1 hora com $^{15}\text{N}_2$ depois dos tratamentos. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

9.4.5 Expto. V: Avaliação da marcação dos aminoácidos dos nódulos e na seiva do xilema de plantas incubadas em diferentes tempos com $^{15}\text{N}_2$

Este experimento teve por objetivo avaliar se os aminoácidos presentes no xilema provêm dos nódulos. Se os aminoácidos no xilema provêm na sua totalidade do nódulo, então devem apresentar um grau de enriquecimento igual no nódulo e no xilema. Se houver entrada de outras fontes de aminoácidos no xilema, por esses não serem marcados levariam à diminuição do grau de enriquecimento dos aminoácidos no xilema em relação aos nódulos. Para alcançar o objetivo, incubamos as plantas com $^{15}\text{N}_2$ por diferentes períodos, de 30 até 180 minutos. Os dados do nódulo e do xilema são da mesma planta, sendo que os nódulos foram coletados imediatamente após a coleta da seiva.

Observou-se que, praticamente todos os aminoácidos apresentaram marcação maior nos nódulos (Fig. 10) em comparação com o xilema (Fig. 11). A exceção foi a GLN para a qual o grau de enriquecimento coincidiu entre o nódulo e o xilema, a não ser no tratamento com 150 minutos de incubação, que foi menor no xilema. Porém o valor envolve apenas uma repetição, e assim não foi possível verificar se a diferença é significativa. Analisando o conjunto de dados, a incorporação no nódulo parece ficar estável entre 90 minutos e 150 minutos de incubação. Mas no tratamento de 210 minutos a incorporação de ^{15}N diminuiu, nos nódulos.

Em relação aos nódulos, assim como observado nos experimentos anteriores, GLN apresenta maior incorporação, e GABA e ASN as menores, considerando todos os períodos de exposição avaliados. Assim como observado no Expto. I, a incorporação de ^{15}N nos aminoácidos já é considerável no tratamento de 60 minutos de incubação.

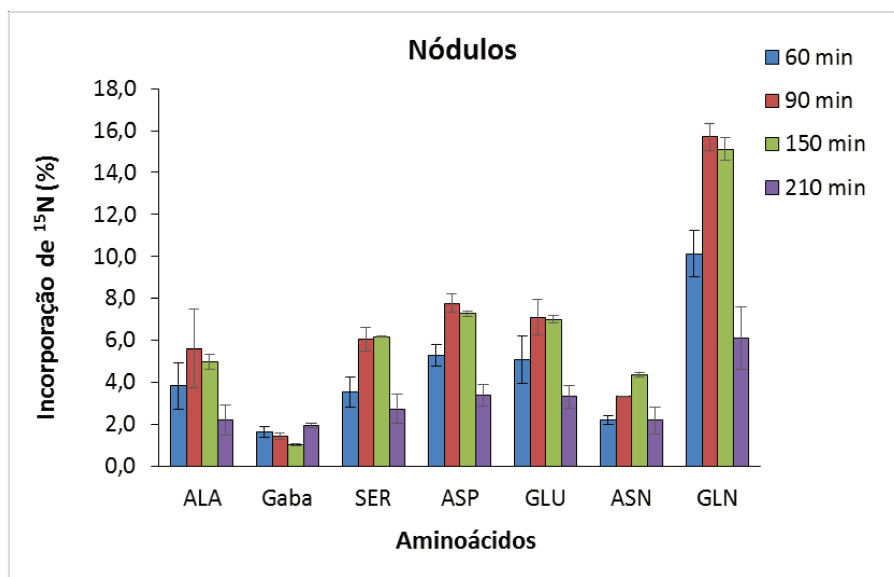


Figura 10: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN em nódulos de soja em diferentes períodos de incubação com $^{15}\text{N}_2$. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

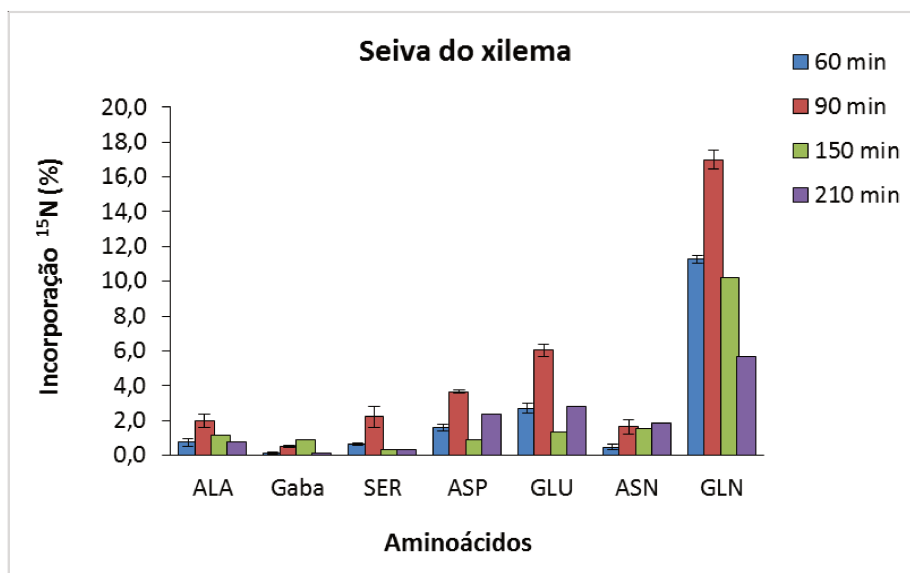


Figura 11: Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ (% das moléculas com ^{15}N) nos aminoácidos ALA, GABA, SER, ASP, GLU, ASN e GLN na seiva do xilema de soja em diferentes períodos de incubação com $^{15}\text{N}_2$. Os valores representam a média (n=3; 150 e 210 min. n=1). As barras representam o erro padrão.

9.5 DISCUSSÃO

O isótopo estável ^{15}N tem sido bastante utilizado em estudos do metabolismo de N em plantas (Ohyama & Kumazawa 1980; Herridge *et al.*, 1990; Prell, *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013a), uma vez que a marcação das moléculas com isótopos permite uma interpretação mais clara e precisa do caminho percorrido pelas mesmas. Dessa maneira, é possível compreender, por exemplo, os efeitos de estresse sobre o metabolismo de N.

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizamos também o isótopo estável ^{15}N , para elucidar as alterações decorrentes do estresse de hipóxia causado pela inundação do sistema radicular, sobre a FBN e metabolismo de aminoácidos nos nódulos de soja. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos afirmar que a incorporação de ^{15}N nos aminoácidos avaliados, demonstra que os mesmos são produtos da FBN em soja e que a hipóxia afeta o padrão de incorporação de ^{15}N nos aminoácidos dos nódulos.

Foi possível verificar que, para a maioria dos aminoácidos avaliados, a incorporação reduz com a inundação, exceto para o GABA. Isto condiz com os resultados da análise da composição de aminoácidos por HPLC, apresentada no Cap.I deste trabalho, no qual os aminoácidos mais representativos nos nódulos, como ASN, ASP e SER, têm sua composição reduzida nos nódulos, devido à hipóxia. Por outro lado, com a inundação há um aumento na composição de GABA, o que também condiz com os resultados aqui obtidos, pois há uma maior incorporação de ^{15}N neste aminoácido com a inundação, em relação ao controle não-inundado.

Apesar de ser encontrada em pequena proporção no nódulo ($\pm 1\%$), GLN também tem sua composição reduzida com a inundação (praticamente desaparece). O fato do

enriquecimento da GLN ter sido bastante reduzido no nódulo após a inundação foi também relatado para o xilema por Justino & Sodek (2013) e evidencia a sensibilidade da FBN ao estresse. A GLN é produto direto da FBN sendo o primeiro aminoácido formado no processo de assimilação. Isto foi comprovado pela incorporação preferencial de $^{15}\text{N}_2$ em GLN do nódulo (Fig. 2). A intensidade de enriquecimento segue a sequência GLN>GLU>ASP>ALA>ASN>GABA. Uma sequência parecida foi encontrada em nódulos de caule de *Sesbania rostrata*, após exposição ao $^{15}\text{N}_2$, ou seja, GLN>GLU>ALA>ASP>ASN e GABA (Godber & Parsons, 1998). No xilema (Fig. 10) também foi encontrada uma sequência semelhante, o que vem confirmar dados anteriores com a soja (Justino & Sodek, 2013) e reforça a conclusão de que a GLN é produto específico da FBN. Ludwig *et al.* (2003) também encontraram incorporação preferencial de $^{15}\text{N}_2$ em GLN do xilema de ervilha.

Por outro lado, em trabalho realizado com feijão caupi (*Vigna unguiculata*), Atkins *et al.* (1988) verificaram, através da incorporação de $^{15}\text{N}_2$ em aminoácidos dos nódulos, um elevado enriquecimento de GLN, porém um enriquecimento maior ainda em GLU. É difícil explicar este resultado. Partindo do pressuposto de que o N inorgânico é assimilado primeiro em GLN, é possível ter havido uma certa demora em isolar os nódulos após a exposição ao $^{15}\text{N}_2$ e neste intervalo ter ocorrido incorporação de $^{14}\text{N}_2$ em GLN que diminuiria o enriquecimento primeiro nesse aminoácido, devido à diluição. No nosso estudo tomamos a precaução de paralisar o metabolismo imediatamente após retirar o sistema radicular do vaso com $^{15}\text{N}_2$ justamente para evitar o fenômeno.

Em nosso estudo, o aminoácido GLN atingiu o equilíbrio isotópico em torno de 16% que foi a maior porcentagem de incorporação observada, os demais aminoácidos no

nódulo entraram em equilíbrio abaixo desse valor. De qualquer forma, o valor máximo de incorporação de ^{15}N encontrado em GLN (ca. 16%, ou 8% em cada um dos dois átomos de N) ficou abaixo do valor da marcação isotópica de $^{15}\text{N}_2$ (estimado em 23%, ver Material e Métodos, item 9.3.1 usado nos ensaios). Como este N_2 é reduzido diretamente ao amônio pela nitrogenase, é de se esperar que o amônio produzido esteja marcado também em 23%. Contudo, após assimilação do amônio pela glutamina sintetase, o grau de enriquecimento da GLN ficou bem abaixo de 23%. Uma possível explicação seria a existência de dois (ou mais) “pools” de amônio, um marcado, produto da fixação e outro não-marcado, produto de outra fonte metabólica como por exemplo a degradação de aminoácidos. De fato, como o amônio formado pela nitrogenase no bacteroide precisa atravessar a membrana peribacteróide para então ser assimilado em GLN no citoplasma da planta (Atkins, 1991), existem “pools” separados de amônio no nódulo. Não pode ser descartada, porém, uma outra interpretação de que existem dois “pools” de GLN, sendo que um entraria em equilíbrio com a FBN e outro não, porém esta possibilidade parece mais remota pois não há evidências para sua existência.

A incorporação de ^{15}N em ASN e GABA permaneceu bem abaixo dos outros aminoácidos marcados, apesar de os seus precursores metabólicos (ASP e GLU respectivamente) apresentarem um enriquecimento maior. Isto pode ser devido ao grande “pool” de ASN no nódulo (ver Cap I) o que levaria a um tempo bem maior para atingir o equilíbrio isotópico, e/ou à possível entrada de ASN a partir de uma fonte externa não-marcada de aminoácidos, provavelmente o floema. Um grau de enriquecimento relativamente baixo para ASN do nódulo de feijão caupi também foi observado por Atkins *et al.* (1988) o que levou os autores a concluir que havia uma fonte externa não-marcada de

ASN para os nódulos, provavelmente o floema. Em outros estudos com nódulos da soja (Ohyama & Kumazawa, 1978; Minamisawa *et al.*, 1986) também foi relatada a incorporação mais lenta de ^{15}N em ASN relativamente a outros aminoácidos.

No experimento de inundação no qual as plantas foram incubadas com $^{15}\text{N}_2$ antes de terem sido submetidas ao estresse, podemos observar que no caso das que foram incubadas por 4 horas e inundadas por 1, 3 e 5 dias, para o aminoácido GLN não houve redução da marcação após a inundação. Entretanto, nas plantas que foram incubadas por 1 hora, houve decaimento, embora apenas na primeira hora. Isso significa portanto, que na inundação há pouca ou nenhuma entrada de ^{14}N , o que prova mais uma vez a ausência da fixação de N_2 durante a inundação. Esta manutenção ou pouca diminuição do enriquecimento ocorre apesar de GLN quase desaparecer do nódulo após a inundação (Cap I). Significa também que há pouca ou nenhuma entrada de GLN de outra fonte não-marcada o que mostra coerência com a redução total do teor de GLN do nódulo, pois se houvesse uma outra fonte, sobraria GLN para transporte no xilema. Outros aminoácidos do nódulo apresentaram um comportamento diferente.

Os aminoácidos GLU, ASP, ALA, SER, VAL (Fig. 7 e 8) apresentaram uma diminuição acentuada no grau de enriquecimento ao longo dos 5 dias de inundação, o que sugere um metabolismo intenso destes aminoácidos apesar da ausência da FBN durante a inundação. O metabolismo de ASP, GLU e ALA, por exemplo, é estreitamente ligado via transaminação, enquanto o GLU é precursor do GABA, o aminoácido que acumula no nódulo durante a inundação. Portanto, a redução em enriquecimento significa que há entrada contínua de N não marcado no metabolismo destes aminoácidos durante a inundação, provavelmente de outra fonte como o floema. É conhecido que o floema da

soja contém altas proporções dos aminoácidos ASP, GLU e, em quantidade um pouco menor, ASN (De Sousa & Sodek, 2003; Lima & Sodek, 2003). No caso do GABA, o enriquecimento aumentou no primeiro dia de inundação e depois permaneceu alto, sendo que o enriquecimento de GABA aumentou para um valor próximo ao valor de GLU do dia zero. Como o “pool” de GABA é maior do que do GLU (Cap I, Fig. 2) é possível que demore mais para o GABA atingir o equilíbrio isotópico com o “pool” de GLU.

Nos trabalhos de Oliveira & Sodek (2013) e Oliveira, *et al.* (2013a), nos quais foram avaliados o metabolismo de N na raiz de soja não-nodulada sob hipóxia, e utilizadas fontes marcadas de N, neste caso $^{15}\text{NO}_3$ e $^{15}\text{NH}_4$, também foi observado, através da incorporação de ^{15}N , os efeitos da hipóxia no sistema radicular, onde a hipóxia reduziu a incorporação total de ^{15}N nos aminoácidos na raiz, independente da fonte de N marcado. Além disso, os autores sugerem que existe um redirecionamento no metabolismo de aminoácidos para a síntese de ALA e GABA nas raízes. Aqui sugerimos que exista um redirecionamento no metabolismo de aminoácidos nos nódulos para síntese de GABA e em menor grau ALA. Na raiz, diferente do nódulo, o aumento de ALA é maior que o de GABA. Isto se deve provavelmente ao fato de que ALA está ligada ao processo de fermentação e produção de energia durante a hipóxia (De Souza e Sodek, 2003; Rocha *et al.*, 2010a), enquanto que GABA está ligado mais à regulação e ajuste do pH (Serraj *et al.*, 1998). Como o nódulo já possui metabolismo energético otimizado para produção de energia em condições de baixa disponibilidade de O_2 , devido a presença da barreira à entrada de O_2 e à presença da leghemoglobina (Hunt & Layzell, 1993; Downie, 2005), para o nódulo pode ser mais importante regular o pH durante um estresse de O_2 acentuado.

Com relação aos experimentos de recuperação, a princípio não foi observada, através da incorporação de ^{15}N , uma recuperação nos aminoácidos, diferente dos dados de composição dos aminoácidos nos nódulos (via HPLC – Cap. I) que demonstraram a recuperação dos mesmos, ainda que em graus diferentes. Contudo, como este resultado não era esperado, consideramos que este fato poderia ser devido à planta ser submetida ao outro estresse, além da inundação, provocado pela transferência da planta da vermiculita para os vasos Qubit[®] e imediatamente ser feita a incubação com $^{15}\text{N}_2$. É conhecido que simplesmente “pertubar” o sistema radicular prejudica a FBN (Minchin *et al.*, 1986). Desta maneira, optamos por refazer o experimento, só que neste caso, transferimos a planta para os vasos Qubit[®] um dia antes da incubação com $^{15}\text{N}_2$, assim permitindo a adaptação da planta ao novo ambiente. Desta maneira, foi possível observar a recuperação dos aminoácidos, com exceção de ASN (Fig. 10). Este resultado condiz com aqueles encontrados para a composição de aminoácidos no Cap. I, onde a composição de ASN foi fortemente prejudicada pela inundação após 4 dias, sendo que, em condições normais representa aproximadamente 50% dos aminoácidos do nódulo e com 4 dias de inundação esse valor diminui para menos de 3%. Além disso, a recuperação é lenta e demora de acordo com o tempo de estresse. Assim, demonstramos no Cap. I, que após 5 dias de inundação ASN só aumentou após 8 dias de recuperação. No experimento aqui executado com ^{15}N o tempo de inundação foi de 4 dias e de recuperação foi de 5 dias e, portanto, tempo insuficiente para recuperação total. A demora maior na recuperação de ASN pode estar relacionada à inativação da enzima asparagina sintetase durante inundação e a lenta recuperação de atividade após a drenagem (Lima & Sodek, 2003) associadas às variações encontradas na expressão gênica desta enzima, *ASI* (Cap. III).

No trabalho desenvolvido por Justino & Sodek (2013), em que avaliaram os efeitos da hipóxia do sistema radicular de soja nodulada e recuperação após o estresse na seiva do xilema, também foi observada redução na incorporação de ^{15}N , principalmente com relação à GLN, produto direto da FBN e ASN, que apresentou marcação bem baixa durante a hipóxia. No nosso trabalho detectamos ASN no nódulo, ainda que em baixas proporções tanto no caso do tratamento de inundação (Cap. I, Fig.9) quanto na recuperação, e a recuperação total de GLN foi observada, no entanto não foi possível observar a recuperação total de ASN.

Com relação à GLN, estes mesmos autores já haviam determinado que este aminoácido no xilema provém dos nódulos, porém não foi descartada a possibilidade de uma parte poder ter outra origem. Aqui nós comprovamos através da avaliação da incorporação de ^{15}N nos aminoácidos dos nódulos e “simultaneamente” nos aminoácidos da seiva, que a GLN do xilema é proveniente apenas dos nódulos, uma vez que o padrão de incorporação de ^{15}N observado nos nódulos e no xilema foi o mesmo ou praticamente igual em plantas não inundadas. Isto é compatível com o brusco declínio a quase zero do teor de GLN no xilema após ter sido inibida a FBN (Justino & Sodek, 2013). Por outro lado, os demais aminoácidos avaliados apresentaram um padrão de incorporação diferente, com valores maiores nos aminoácidos dos nódulos (Fig.10), demonstrando que para ASN, ALA, GLU, SER e GABA do xilema, existe uma fonte externa não-marcada, provavelmente a seiva do floema. O floema é uma fonte importante para aminoácidos reciclados no sistema radicular e transportados via xilema para a parte aérea (Pate *et al.*, 1981; Layzell *et al.*, 1981; Parsons & Baker, 1996) e assim os aminoácidos devem misturar-se no xilema com os exportados do nódulo.

Pudemos verificar em nosso trabalho os efeitos da hipóxia sobre o metabolismo de N no nódulo, através da incorporação com ^{15}N , e que os dados condizem com os dados bioquímicos em relação à composição de aminoácidos tanto na inundação quanto na recuperação. Além disso, os resultados obtidos estão em conformidade com dados de outros trabalhos na literatura no que diz respeito aos efeitos da hipóxia.

9.6 CONCLUSÕES

- A incorporação de ^{15}N nos aminoácidos do nódulo foi afetada pela hipóxia do sistema radicular.
- Através da incorporação de ^{15}N também observamos que o metabolismo dos aminoácidos recuperou-se após remoção do estresse, com exceção de ASN.
- Assim como observado no Cap. I deste trabalho, o metabolismo do aminoácido ASN tem recuperação lenta, e após 5 dias de inundação não foi possível observar recuperação plena em 5 dias de recuperação.
- A incorporação de ^{15}N nos aminoácidos ASN, GLU, ASP, ALA e SER foi menor na seiva do xilema em relação aos nódulos, o que sugere uma fonte externa não-marcada destes aminoácidos. GLN do nódulo, por outro lado, parece ser a fonte exclusiva da amida no xilema.
- Os resultados sugerem que sob inundação há um redirecionamento no metabolismo de outros aminoácidos, como o GLU, para a formação de GABA no nódulo.
- Durante a inundação o metabolismo dos aminoácidos GLU, ASP, ALA, SER, VAL e GABA continua intenso no nódulo enquanto que o de GLN fica praticamente paralisado.

10.0 CAPÍTULO III: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS ENZIMAS ASPARAGINA SINTETASE, GLUTAMATO DESCARBOXILASE E NITROGENASE EM NÓDULOS DE PLANTAS DE SOJA DURANTE A INUNDAÇÃO E RECUPERAÇÃO

10.1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio envolve a redução do N₂ atmosférico em NH₃, pela enzima presente nos rizóbios, a nitrogenase, que é a peça chave deste evento (Kim & Rees, 1994).

A nitrogenase é um complexo enzimático formado por duas subunidades ou componentes (proteínas): o componente I, ou proteína ferro-molibdênio (FeMo), e o componente II, também denominada Fe-proteína. As proteínas que compõem a nitrogenase são produtos dos genes *nifD*, *nifK* (FeMo) e *nifH* (FeS) (Kim & Rees, 1994; Marin *et al.*, 1998).

A soja é uma leguminosa, de grande importância agrícola, amplamente usada em estudos sobre a FBN devido principalmente à eficiência deste sistema nessa cultura. Como demonstrado por Amarante & Sodek (2002) e Justino & Sodek (2013), a hipóxia no sistema radicular de soja, promovida pela inundação, afeta a FBN que é sensível à hipóxia. A atividade da nitrogenase diminui, levando à redução da FBN e a alterações na composição de aminoácidos na seiva do xilema.

Nos capítulos anteriores deste trabalho, confirmamos que a inundação afetou a FBN e demonstramos as principais alterações no metabolismo de N nos nódulos de soja sob alagamento. Demonstramos que com 4 dias de inundação, ASN (que é o aminoácido mais representativo no nódulo) reduz drasticamente. Em contrapartida houve um aumento na composição de GABA. Além disso demonstramos que a inundação afetou drasticamente a atividade da nitrogenase, mas esta recupera-se totalmente com a remoção do estresse. Já ASN teve a recuperação lenta e essa ocorreu conforme o tempo de exposição ao estresse, ou seja, quanto maior o período de alagamento, maior o período necessário à recuperação.

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

A identificação de genes para a AS em plantas, mostram que essa enzima é codificada por uma pequena família de genes (de um a três), na maioria das plantas (Azevedo *et al.*, 2006), sendo conhecidas três isoformas em soja (Antunes *et al.*, 2008). As enzimas AS caracterizadas como dependentes de glutamina apresentam um sítio de ligação para glutamina definido por quatro amino ácidos (MET-CYS-GLY-ILE), localizado na região N terminal (Van-Heeke & Schuster, 1989).

A enzima glutamato descarboxilase (GAD) é responsável pela catálise da biossíntese de GABA. Nesta reação o GLU é descarboxilado formando o GABA (Snedden

et al., 1995). Alguns estudos indicam a existência de mais de cinco isoformas do gene que codifica a GAD em soja, mas isto não está totalmente claro (Matsuyama *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2013).

A soja, por sua grande importância no cenário agrícola mundial, teve seu genoma totalmente sequenciado no ano 2010 (Schmutz *et al.*, 2010). Apesar deste fato, ainda são escassos os estudos que envolvam a expressão dos genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio na interação rizóbio-planta, principalmente na interação com o *B. elkanii*.

Dessa forma, neste trabalho foi avaliada a expressão de genes da planta os quais codificam as enzimas asparagina sintetase (AS) e a enzima glutamato descarboxilase (GAD). Também foram avaliados os genes *nifH* e *nifD* do rizóbio, os quais codificam proteínas das subunidades da nitrogenase.

10.2 OBJETIVO

- Avaliar a expressão dos genes que codificam as enzimas AS, GAD (da planta) e os genes *nifH* e *nifD* (da bactéria) nos nódulos de plantas de soja submetidas à inundação e recuperação.

10.3 MATERIAL E MÉTODOS

As condições de cultivo das plantas, bem como o preparo da solução nutritiva, manutenção dos rizóbios foram os mesmos descritas no tópico Material e Métodos do Capítulo I.

10.3.1 Montagem do experimento e coleta dos nódulos

O experimento foi montado dentro de casa de vegetação quando as plantas estavam entre os estádios V7/V8 (Fehr *et al.*, 1971), em que a nodulação era plena e a quantidade de nódulos era satisfatória para as análises.

Para o procedimento de inundação, os vasos com 1L contendo as plantas foram submersos em solução -N (1/3) dentro de vasos de capacidade de 3L, mantendo-se uma lâmina de água com cerca de 2 cm acima do substrato. A recuperação consistia em manter as plantas por diferentes tempos (dias) após a drenagem, e irrigando-as com água de torneira quando necessário até a coleta.

As plantas deste experimento foram submetidas à inundação por 4 dias (4D). Plantas sob este mesmo período de inundação foram drenadas e mantidas em recuperação do estresse por 2 dias (4D2D), 4 dias (4D4D) e 6 dias (4D6D). Além disso, plantas não-inundadas (controle) foram coletadas no quarto dia de experimento (C0).

Após os tratamentos descritos, as plantas foram retiradas da vermiculita, as raízes lavadas em água destilada, colocadas em recipiente com gelo e imediatamente os nódulos foram destacados da raiz e o excesso de água dos mesmos foi removido com auxílio de

papel absorvente. Em seguida, foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados em freezer -80°C até a extração do RNA.

10.3.2 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

10.3.2.1 Obtenção das sequências e desenho dos iniciadores (primers):

Para este estudo, foram analisados genes da planta que codificam as enzimas GAD e AS para a qual foram encontrados três homólogos em soja, identificados como *AS1*, *AS2* e *AS3*. Também foram analisados os genes da bactéria (*B. elkanii*), *nifH* que codifica o componente I (FeMo) da enzima nitrogenase e *nifD* que codifica a subunidade alfa do componente II da nitrogenase.

A busca das sequências dos genes de estudo foi realizada através de palavras chave, no banco de dados público NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) no mês de Maio de 2013.

Para os genes *AS1* e *AS3* foram utilizadas as sequências registradas com os números gi|351723288:151-1890 e gi|109940718:140 respectivamente, no banco de dados do NCBI.

No caso do gene que codifica a isoforma *AS2*, foram encontradas algumas sequências, todas completas no banco de dados, e as mesmas foram alinhadas por meio do programa BioEdit[®] versão 7.0.5.3. O programa retornou apenas uma sequência consenso (*GmAS2*) e a mesma foi usada para desenho dos primers.

Figura 1: Sequência consenso para o gene AS2.

```
>GmAS2
ATGTGTGGTATTCTTGCTGTTCTTGGTTGTTCTGATGACTCTCGAGCCAAAAGGGTCCGCGTG
CTTGAGCTCTCTCGCAGATTGAAGCACCGTGGCCCTGACTGGAGTGGGCTCCATCAACATGGT
GACTGCTTTTTGGCACATCAACGGTTAGCCATAGTTGATCCTGCTTCTGGGGATCAACCTCTC
TTTAACGAGGACAAATCCGTCATTGTTACGGTAAATGGAGAGATTTACAACCATGAAGAGCT
CAGGAAACAGCTGCCTAATCACAACCTCCGAACCTGGAAGTGATTGTGATGTTATTGCACACCT
GTACGAGGAACATGGAGAAGACTTTGTGGACATGCTGGATGGTATCTTCTCATTGTCTACT
GGACACCCGTGACAACAGTTTTATAGTGGCTCGGGATGCTATTGGGGTCACTTCCTTGTACAT
TGGATGGGGGTTAGATGGCTCTGTTTGGATTCATCAGAAATGAAAGGCCTGAATGATGATT
GTGAACACTTTGAGTGTTCACCTGGTCACTTGTACTCTAGCAAAGAAAGAGGGTTCCGCA
GATGGTACAATCCTCCTTGGTTCTCTGAGGCTATTCCATCTGCCCTTATGATCCTCTTGTGTTT
AAGACACGCCTTTGAGCAGGCAGTCATAAAAAGGTTGATGACTGATGTGCCTTTTGGTGTCT
ACTCTCTGGAGGTTTGGACTCTTCTTGGTTGCATCCATCACTTCTCGTTACTTGGCCAACACA
AAGGCTGCTGAGCAGTGGGGATCAAAGTTACATTCATTCTGTGTAGGCCTTGAGGGCTCACC
AGATTTGAAGGCTGCAAAAAGAGGTTGCTGACTATCTAGGCACTGTCCACCATGAGTTTACCTT
CACTGTTCAAGGATGGAATAGATTCCATTGAAGATGTTATCTACCATATTGAAACATATGATGT
GACTACAATTAGAGCAAGCACACCTATGTTTCTCATGTCTCGGAAGATTAATCACTTGGTGT
CAAATGGGTTATCTCAGGAGAAGGATCTGATGAGATCTTTGGAGGGTATTTGTACTTCCACAA
GGCACCAACAAGGAGGAGTTCCACAGAGAAACATGCCGCAAGATCAAAGCACTTCACCAA
TATGATTGCTTGCAGCCAATAAATCAACATTTGCTTGGGGTCTAGAAGCCCCTGTACCATTT
TTGGACAAGGCGTTTATCAATGCTGCAATGAGTATTGACCCTGAGTGGAAGATGATAAAAAG
AGATGAAGGACGAATTGAGAAGTGGATTCTGAGGAGAGCCTTTGATGATGAAGAGCATCCTT
ATCTGCCAAAGCACATTTTATACAGGCAGAAAGAACAATTCAGTGATGGAGTTGGCTATAGT
TGGATTGATGCCCTTAAGGCCCATCCTCCAAAACATGTGACTGAAAAAATGATGCTTAATGCT
GGTAACATTTACCCCAACAACACCCCAAAAACCAAGGAAGCATATTACTACAGAATGATCTT
TGAGAGGTTCTTCCCTCAGAACTCAGCTAGGCTCACTGTTTCTGGAGGAGCAAGTGCTGCATG
TAGCACAGCCAAAGCTGTTGAGTGGGATGCTGCTTGGTCTAACAACCTTGATCCCTCTGGTAG
AGCAGCACTTGGAGTGCACATTTAGCCTATGAAAACCAGAACAACAAGGGTGTAGAAATTG
AGAAGATAATACCTATGGATGCTGCTCCCCTTGGTGTGCCATCCAGGGCTAA
```

Para o gene que codifica a enzima GAD foi encontrada apenas uma forma em soja, no banco de dados, e assim como AS2, também foram encontradas algumas sequências completas e parciais no banco de dados, e as mesmas foram alinhadas. Foi feita uma sequência consenso (*GmGAD*) a partir das sequências e a mesma foi usada para desenho dos primers.

Figura 2: Sequência consenso para o gene *GAD*.

```
>GmGAD
ATGGTTCTCTCCAAAACCGCCTCCGAATCCGACGTCTCTGTCCACTCAACCTTCGCTTCTCGC
TATGTCAGAACTTCGCTTCCCAGGTTCAAGATGGCGGAGGAGTCGATACCGAAGGAGGCAG
CATACCAGATCATAAACGACGAGTTGATGTTGGATGGGAACCCAAGGTTGAATTTGGCATCA
TTTGTGACGACTTGGATGGAGCCAGAGTGTGATAAACTCATCATGGCTGCCATTAATAAGAA
CTATGTTGACATGGACGAGTACCCTGTCACCACTGAGCTACAGAATCGATGTGTTAACATGA
TAGCTCATCTTTTCAATGCACCACTAGAAGAGACTGAGGCAGCAGTTGGTGTGGCACGGTT
GGCTCATCAGAGGCCATTATGTTGGCTGGATTGGCATTCAAAGAAAAGTGGCAAAACAGAA
GGAAACAAGAGGGAAAGCCTTATGACAAACCCAACATTGTCACTGGAGCCAACGTTTCAGGT
TTGCTGGGAGAAATTTGCAAGGTACTTTGAGGTGGAGTTAAAGGAGGTGAAGCTCCGTGAT
GATTATTATGTAATGGACCCTGAAAAGGCCGTGGAATTGGTGGATGAGAACACTATTTGTGT
TGCTGCTATCCTTGGTTCCACACTAAATGGAGAGTTTGAAGATGTCAAACGCTTAAATGATC
TCCTAATTGAAAAGAACAAAATAACTGGGTGGGACACTCCTATTCATGTTGATGCAGCCAGC
GGTGGGTTTCATAGCCCCATTTATTTACCCAGAGCTTGAGTGGGACTTCCGGTTACAAGTGT
GAAGAGCATCAATGTTAGTGGGCACAAGTATGGTTTGGTCTATGCTGGAATCGGTTGGGTTA
TCTGGAGAAGCAAGCAGGACTTGCTGAGGAACTCATCTTTCACATCAACTATCTTGGGGCT
GATCAACCCACCTTCACCTTAACTTCTCAAAGGTTCTAGCCAAGTCATTGCTCAATACTAC
CAACTGATTTCGCTTGGTTTTGAGGGATATAGAAACGTGATGGAAAACCTGCAGGGACAACA
TGCTGGTGTGAAAGAGGGACTCGAGAAAACAGGGCGATTTTCAATTGTGTCCAAAGACAA
TGGTGTGCCTTTGGTGGCTTTTCACTGAAAGACCACACCCACTTTGACGAATTCCAAATCTC
AGACTTTTTAAGGCGCTTTGGGTGGATAGTGCCAGCATAACCCATGCCCCAGATGCTCAAC
ATGTCACAGTGCTTCGTGTTGTCATCAGGGAGGACTTCTCAAGGACCCTCGCGGAGCGTCTC
GTGTCCGATGTGGAGAAGGTGCTGCATGAGCTTGATTCACTTCCTGCAAGGGTCATCAGCAG
CACCCTGTGACACTCAGTGCAGAAGAAAATGGCAAGGTAGTGGTTGCTAAGAAGAATCCT
ATGGAGACTCAGAGGGAAATCACTGCCATTTGGAAGAAGTTTGTGTTGGAGAGGAAGAAGA
ACAAATGACAAGATGAATGGTGTGTTGTTAG
```

Para os genes do rizóbio *B. elkanii*, *nifH* e *nifD*, as sequências encontradas no banco de dados para cada gene também foram alinhadas e formaram apenas uma sequência consenso cada (*BeNifH* e *BeNifD*).

Figura 3: Sequência consenso para o gene *nifH*.

```
>BeNifH
TAGCATGTCTTCGAGTTCGTCCATGGAGATCGGGGTCGGAATGATGCCCTTGCCGCCATTGTT
GTGAACCTTGGTCGCAAGATTGCGATAGTGATCGGCCTGCTTCGACTCGGGCGCATACTCCAG
CACCGTCATGCGGCGCAACTCGGCATGTTGCACCACATTGTCGCGCGGCACAAAGTAGATCA
GCTGAGTGCCCCAACTTCTTGGCCAGCGCCTCCGCCAGTTCAGCTCTTTGTTCGGTCTGCCGCT
CGTTGCAGATCAGGCCGCCAGCCGCACGCCGCCGAGTTGGCGTATTTTCAGGATGCCTTTGG
AGATATTGTTTTCGGCATAACATTGCCATCATTTCTCCGGACATGACGATATAGATCTCCTGCG
CCTTGTTTTCCCGGATCGGCATCGCAAAGCCACCACAAACCACGTCACCGAGCACGTTCGTAG
GACACATAGTCAATGTCTCATAGGCGCCGTTTTCTCCAGGAAATTGATCGAGGTGATGACG
CCGCGGCCCGGCGCAGCCGACACCCGGCTCAGGACCGCCGGACTCCACGCAGCGGATGTCCTT
GTAGCCGACCTTCATCACGTCTCGAGTTCGAGGTCTCCACGCTGCCGGCGCTCGCTGCAAG
GCTCAAATCGTGTCTGCGCCTTGGCATGCAGGATCAGGCGGGTTCGAGTCCGCTTAGGAT
CGCATCCCACGATCAGGATTTTCTGACCCATCTCGGCCAGTGCCGCCAACGTATTCTGGGAAG
TGGTCGACTTGCCGATACCCCTTACCGTAAAAGGCGATCTG
```

Figura 4: Sequência consenso para o gene *nifD*.

```
>BeNifD
GTGCTGAAGGTCTATCCGGAGAAGACCGCGAAGCGGCGTGCCAAGCATCTCAACGTTACCA
GTCCGGGAAGTCCGATTGCGGAGTCAAGTCCAACATAAAAATCCATACCTGGTGTGATGACAA
TCAGAGGCTGCGCCTATGCAGGATCCAAGGGGGTGGTCTGGGGGCCGATCAAGGACATGGTC
CATATCAGCCACGGCCCGTTGGCTGCGGCCAGTATTCGTGGGGCTCGCGTCGTAACATTTAC
GTTGGCACAACGGGCATCGATAGTTTTGTAACCCTGCAATTCACCTCCGATTTCCAGGAGAAG
GACATCGTATTCGGTGGCGACAAGAAGCTGGTCAAAGTCCTTGACGAAATCCAGGAGCTTTT
CCCGCTCAACCACGGCATCACCATCCAATCGGAATGCCCGATCGGATTGATCGGGGACGACA
TCGAGGCCGTGTCAAGGTCGAAATCCAAGGAATATGGTGGCAAGACCATCGTGCCTGTCCGC
TGTGAGGGCTTTCGCGGCGTGTGCGCAGTCGTTGGCCACCACATCGCCAACGACGCGGTGCG
CGATTGGATTTTCGACAAGCTCGACCCGACGGCAAACCAAAGTTCGAGCCGACGCCCTACG
ATGTTGCGATCATTGGTGACTACAATATCGGCGGCGACGCCTGGTCATCGCGAATTCTGCTGG
AGGAAATGGGCCTGCGGGTGATTGCACAGTGGTCCGGCGACGGTTCACCTCGCCGAGCTCGAA
GCAACGCCGAAGGCGAAGCTCAACATTCTGCATTGCTACCGTTCGATGAACTACATCTCGCG
CCATATGGAAGAGAAGTTCGGCATCCC
```

Após obtenção das sequências dos genes de estudo, as mesmas foram analisadas através de uma ferramenta online disponível no NCBI (Conserved Domains Database (CDD) para a verificação dos domínios conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>). Considerando-se isso, os primers foram desenhados nas regiões não conservadas. Para o desenho dos primers para a qRT-PCR (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction) foi utilizado o programa

Primer3 Plus® (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), considerando as características especiais da PCR quantitativa, como o tamanho do amplicon, menor que 150 pares de base (pb), primers com 19-20 pb, temperatura de anelamento entre 60 e 90°C, entre outros.

Como genes normalizadores para a planta foram utilizados os primers desenhados a partir do gene *cons7* (Libault *et al.*, 2008; Borges, *et al.*, 2012). E como gene normalizador para *B. elkanii*, foi usada a sequência do gene que codifica a subunidade 16S ribossomal identificada como gi|9087295|gb|AF237422.2 (Chueire *et al.*, 2003) no NCBI, para desenho dos primers descritos abaixo.

Tabela 1: Pares de primers utilizados para a análise da expressão dos genes alvo (*AS1*, *AS2*, *AS3*, *GAD*) e (*nifH* e *nifD*) e dos genes normalizadores (*cons7* e *16S*) de soja e do rizóbio respectivamente.

Soja		
Gene	Primer	
	F (5' --> 3'')	R (5' --> 3'')
AS1	TCCCCCTTCAACACTCCAAC	TGCAACACTTGTTCCCTCCAG
AS2	AAAGCTGTTGAGTGGGATGC	GCTGAAATGTGCACTCCAAG
AS3	TAAGGCCTGATCTTGGAAGG	ATGTGCCCTGGAGGAAAAG
GAD	CAACATGCTGGTGCTGAAAG	AGTGTGAAAGCCACCAAAGG
cons7	ATGAATGACGGTCCCATGTA	GGCATTAAAGCAGCTCACTCT
Rizobio		
Gene	Primer	
	F (5' --> 3'')	R (5' --> 3'')
nifH	AGATCAGCTGAGTGCCCAAC	GCATCCTGAAATACGCCAAC
nifD	ATTGCGGAGTCAAGTCCAAC	TATGGACCATGTCCTTGATCG
16S	CTACAATGGCGGTGACAATG	AACTTCATGGGCTCGAGTTG

10.3.2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA

A extração de RNA foi realizada pelo método Trizol da Sigma[®] segundo orientações do fabricante. Após a extração, o RNA foi tratado com DNase “Turbo DNA-free” (Ambion, Inc.) e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. A determinação da concentração de RNA, em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, foi obtida a partir da equação: $\text{RNA} = (\text{Abs a } 260 \text{ nm} \times \text{diluição}) / 25$. A qualidade do RNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 1 % com brometo de etídio, com visualização sob luz UV em fotodocumentador (Gel Doc 2000, BIO RAD). Um volume referente a 2 μg de RNA total foi utilizado para sintetizar a primeira fita de cDNA com kit SuperScript III First-Strand (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

10.3.2.3 qRT-PCR e teste de eficiência dos primers

Para as análises de expressão por qRT-PCR foram utilizados os pares de primers previamente montados para os genes de estudo e amostras de cDNA (diluídas 50 vezes). As reações (processadas em duplicata técnica) foram preparadas com o QuantiFast[™] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen). As PCRs foram analisadas em termociclador com sistema de detecção para PCR em tempo real, nas condições: 95°C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e de 60°C por 30 segundos. Um valor de Ct (Cycle threshold) foi criado, sendo Ct definido como o número de ciclos no qual a taxa de amplificação do gene alvo torna-se exponencial. A confirmação de especificidade do amplicon foi baseada na curva de dissociação no final de cada ensaio, gerando uma curva de eficiência de amplificação para cada par de primers. A eficiência foi determinada entre 90% e 110% para todos os primers. A quantificação relativa da expressão entre tratamento (hipoxia) e

controle foi determinada comparando a expressão transcricional entre os genes alvo e gene referência (ou normalizador) pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: 2 representa a eficiência do primer do gene alvo (eficiência é calculada como a porcentagem de eficiência x 0.01 + 1); $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{alvo_{Tra}} - Ct_{ref_{Tra}}) - (Ct_{alvo_{Cont}} - Ct_{ref_{Cont}})]$ Ct = ciclo limiar, alvo = gene alvo, ref = gene referência, Tra= tratamentos, e Cont= controle (Livak & Schmittgen, 2001).

10.3.3 Delineamento experimental e análise dos dados

O experimento foi disposto em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições biológicas, onde cada repetição foi composta por um pool de nódulos de três plantas. Aos dados quantitativos obtidos, foi aplicada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo uso do software estatístico VARPC, desenvolvido pelo professor e orientador deste trabalho, Dr. Ladaslav Sodek, do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas.

10.4 RESULTADOS

Através dos métodos utilizados foi possível saber a quantidade e qualidade de RNA das amostras de nódulo de soja. As análises de expressão dos genes alvo foram feitas contra os genes normalizadores, onde obtivemos os valores de $\Delta\Delta CT$, a partir dos quais foram calculados os valores de expressão diferencial ($2^{-\Delta\Delta CT}$) utilizados nos gráficos. Nesta análise os dados de expressão estão expressos em relação ao tratamento controle, ou seja, os valores indicam se para aquele determinado tratamento o gene foi mais ou menos expresso em relação ao tratamento controle.

De maneira geral, comparando-se as três isoformas de AS no controle, podemos verificar que, a *AS3* apresentou menor expressão relativa em relação as demais, e a *AS2* apresentou maior expressão relativa nos nódulos de soja, seguida de *AS1* (dados não apresentados).

Considerando a análise da expressão das três isoformas da AS com relação aos tratamentos avaliados, foi verificado que houve diferença na expressão destes genes entre os tratamentos.

Nas isoformas *AS1* e *AS2*, observou-se que a expressão foi nitidamente menor ($p < 0,05$) no tratamento de inundação em relação ao controle, principalmente para *AS2* (Fig. 5, A e B). Também foi observado que a expressão aumenta gradualmente com os tratamentos de recuperação em *AS1*, mas não chega a apresentar a mesma expressão observada no tratamento controle, mesmo após 6 dias de recuperação, dados estes que condizem com a análise do perfil de aminoácidos por HPLC efetuada no Cap. I deste

trabalho, onde o teor de ASN reduz drasticamente com a inundação e recupera-se lentamente com os tratamentos de recuperação.

No caso de *AS2* a expressão também aumenta com os tratamentos de recuperação, no entanto a recuperação neste caso já é alta e equivalente àquela observada nos controles com 2 dias de recuperação e não se altera conforme os dias de recuperação avaliados.

Já no caso de *AS3*, foi observado um efeito inverso ao encontrado para *AS1* e *AS2*. No caso de *AS3* a expressão no tratamento de inundação foi maior do que aquela observada no controle e nos tratamentos de recuperação (Fig. 5, C).

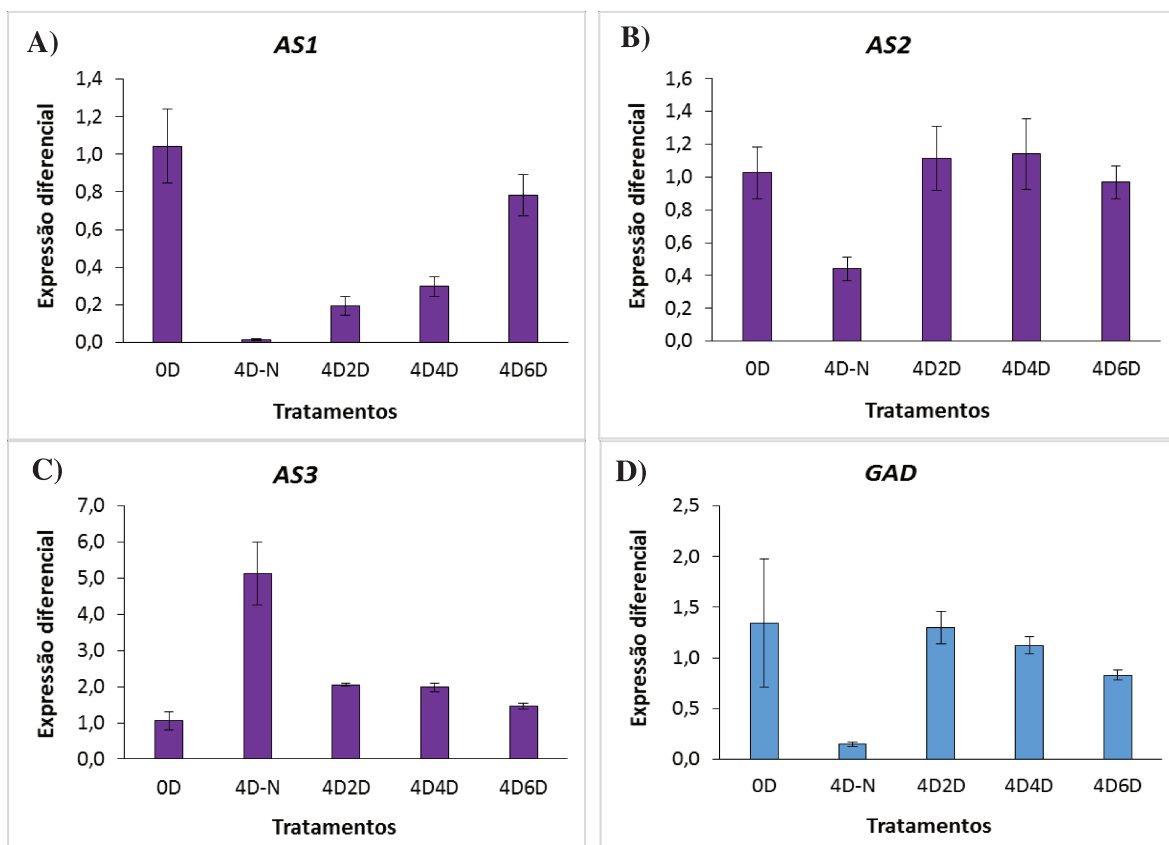


Figura 5: Expressão relativa dos genes *AS1*(A), *AS2*(B), *AS3*(C) e *GAD* (D) em nódulos de soja nos tratamentos controle (não-inundado), inundação por 4 dias (4D -N), e recuperação pós inundação por 2 (4D2D), 4 (4D4D) e 6 dias (4D6D). Dados expressos em $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

Para o gene que codifica a enzima GAD, foi observado que a expressão deste gene foi bem baixa em relação às isoformas *AS1* e *AS2* (dados não apresentados). Com relação aos tratamentos avaliados, a expressão no tratamento de inundação foi bem menor que o controle (Fig. 5, D). Após remoção do estresse, a expressão retornou ao nível do controle dentro de 2 dias e permaneceu com valores que não diferiram do controle. Neste caso, diferente do que foi observado no Cap. I, em que o teor de GABA, que é o produto da

reação desta enzima, foi maior com a inundação, aqui a expressão do gene que codifica a GAD foi reduzida na inundação.

Os genes que codificam as subunidades da enzima nitrogenase no bacterioide (*B. elkanii* - SEMIA 5019), *nifH* e *nifD*, foram afetados pela inundação. A expressão de ambos os genes foi nitidamente menor no tratamento de inundação em relação ao controle e aos tratamentos de recuperação (Fig. 6). Nos tratamentos de recuperação a expressão aumenta, em ambos os casos. No caso do *nifH* aparentemente houve aumento até 4 dias de recuperação porém estatisticamente não houve diferenças entre os tempos de recuperação. Embora todos os tratamentos de recuperação tenham apresentado valores abaixo do controle, estatisticamente os valores após 4 e 6 dias de recuperação não diferiram do observado no tratamento controle, sugerindo recuperação total ou próxima. Quanto ao *nifD* a expressão aumenta gradativamente até 6 dias de recuperação quando igualou-se ao valor do controle. Estatisticamente os valores de 4 e 6 dias de recuperação não são diferentes e apenas o de 6 dias é maior do que o de 2 dias de recuperação.

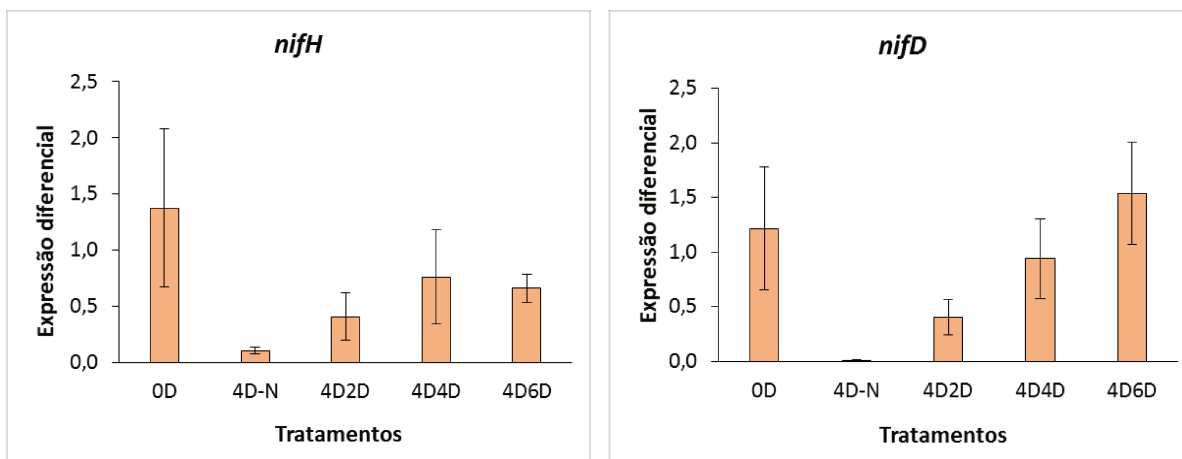


Figura 6: Expressão relativa do gene *nifH* (A) que codifica o componente I ou Fe-proteína e *nifD* (B) que codifica a subunidade α do componente II ou FeMo da enzima nitrogenase em nódulos de soja nos tratamentos controle (não-inundado), inundação por 4 dias (4D -N), e recuperação pós inundação por 2 (4D2D), 4 (4D4D) e 6 dias (4D6D). Dados expressos em $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os valores representam a média (n=3). As barras representam o erro padrão.

10.5 DISCUSSÃO

Demonstramos que a hipóxia do sistema radicular afeta a expressão de todos os genes avaliados nos nódulos de soja, tanto dos genes codificados pela planta, quanto dos genes codificados pelo rizóbio.

Considerando os genes que codificam a AS, as três isoformas apresentam comportamentos distintos. A isoforma que mais se encaixa com os dados bioquímicos relacionados ao teor de ASN durante a inundação e recuperação é a *AS1*, em que a expressão diminui drasticamente com 4 dias de inundação e aumenta lentamente com os tratamentos de recuperação. Esse mesmo padrão foi observado para os teores de ASN nos nódulos. A expressão de *AS2* também diminuiu com a inundação, mas a recuperação já ocorre com 2 dias de recuperação. Os dados aqui obtidos para *AS1* estão de acordo com os

dados encontrados por Antunes *et al.* (2008), que avaliaram a expressão (semi quantitativa via *Northern blot*) das três isoformas de AS nos nódulos e raízes de soja. Estes autores observaram que a expressão de *AS1* (*SAS1*) diminuiu bastante no nódulo após transferência da planta da vermiculita para hidroponia (com aeração, um pouco diferente de inundação, mas para a FBN o efeito é o mesmo). Em contrapartida, não observaram efeito aparente sobre *AS2* e *AS3*. Contudo, em nosso trabalho a expressão relativa foi avaliada por PCR em tempo real (quantitativa), que apresenta uma maior precisão em relação ao *Northern Blot* e talvez este fato estes autores não tenham observado efeitos nas isoformas 2 e 3.

Além disso, estes mesmos autores (Antunes *et al.*, 2008) observaram uma recuperação lenta de *AS1*, como aqui observado, o que também confirma o observado em nossos dados bioquímicos com relação ao teor de ASN (Cap I). Lima & Sodek (2003) observaram queda na atividade da AS em nódulos de soja durante a inundação e também observaram uma recuperação lenta e gradativa da atividade desta enzima. Estes dados nos levam a concluir que a AS mais ativa e fisiologicamente importante nos nódulos de soja é a isoforma *AS1*.

Com relação ao *GAD*, observamos que a expressão diminuiu com a inundação, e aumentou com a recuperação aos valores observados no controle (não-inundado), o que não era de fato esperado, uma vez que o teor de GABA aumentou consideravelmente nos tratamentos de inundação (Fig. 9, Cap I), sendo esperado, portanto que a expressão de *GAD* também aumentasse sob inundação. Entretanto, ao considerarmos a sequência consenso que foi criada a partir das sequências disponíveis no banco de dados pesquisado (NCBI), observamos que somente duas sequências (completas) encontradas no período pesquisado, haviam sido publicadas (Matsuyama *et al.*, 2009). De acordo com estes autores,

responsáveis pela inserção destas sequencias no banco de dados, as mesmas correspondem à *GmGAD1*. No trabalho desenvolvido por eles, a obtenção da sequência foi feita a partir de ensaio com plântulas de soja, e os mesmos observaram uma correlação positiva entre teor de GABA, atividade da GAD e expressão da *GmGAD1* (PCR semi-quantitativa) e que isto foi mais evidente nos estágios iniciais de desenvolvimento. Nenhuma sequência de outra isoforma confirmada da GAD foi encontrada nos bancos de dados analisados. Desta forma consideramos que o contig formado pelas sequencias existentes correspondiam apenas a uma isoforma, que segundo Matsuyama *et al.* (2009) é o *GmGAD1*.

Numa publicação posterior à execução do nosso trabalho, Hyun *et al.* (2013) identificaram cinco isoformas de *GAD* em soja (*GmGAD 1-5*). Neste mesmo trabalho os autores avaliaram a expressão destes genes através da qRT-PCR, em diferentes tecidos de plântulas de soja, e concluíram que em termos de expressão tecido-específica, *GmGAD1* e *3* foram altamente expressas em hipocótilos e raízes, enquanto a expressão de *GmGAD4* e *5* foram mais elevadas nos cotilédones. Além disso, a expressão não-tecido-específica de *GmGAD2* foi observada. Também verificaram uma correlação positiva entre o aumento dos teores de GABA e aumento da expressão dos *GmGADs* nas plântulas de soja, sendo que a maior expressão correspondia a 7 dias após a germinação, que foi também o tempo mais longo de crescimento analisado.

Mustroph *et al.* (2014), verificaram que a expressão das cinco isoformas de *GAD* em raízes de *Arabidopsis thaliana* sob hipóxia, não correlacionou com a quantidade de GABA, assim como aqui observado. No trabalho destes autores, os aminoácidos GABA e ALA, aumentaram consideravelmente em raízes sob hipóxia, mas a expressão da GAD não foi maior, e concluíram portanto que fatores envolvidos após a transcrição, estariam

relacionados a atividade desta enzima. Além disso, GABA pode ser produzido por outra via, através da enzima GABA-transaminase, em que ALA + semialdeído succínico forma GABA + piruvato (Fait *et al.*, 2008). Entretanto, devido a formação de um ácido carbônico por esta via, acreditamos que seja pouco provável que seja a via principal de formação do GABA em condições de hipóxia.

No entanto, como demonstrado, não foram encontrados na literatura dados de expressão de *GAD* em nódulos de soja. Porém, em ambos os trabalhos mencionados acima, o teor de GABA corresponde a uma maior expressão do gene para *GAD*, o que não foi observado em nosso trabalho. Isto se deve provavelmente ao fato de a *GmGAD* que usamos para desenhar os primers não ser específica para o tecido estudado, apesar da *GmGAD1* ser altamente expressa nas raízes (Hyun *et al.*, 2013). Entretanto, ambos os estudos foram feitos utilizando plântulas de soja e em nosso trabalho foram utilizadas plantas adultas no final do estágio vegetativo, além, claro, do tecido estudado, que no nosso caso foi o tecido do nódulo, o qual também envolve a simbiose do rizóbio com a planta. Dessa forma, sugerimos que mais estudos sejam realizados com relação à expressão de *GAD* em nódulos de soja, uma vez que agora se tem o conhecimento da existência destas sequências de *GmGAD* (1 a 5).

No Cap. I deste trabalho, demonstramos que a atividade da nitrogenase é sensível à hipóxia do sistema radicular em soja, todavia, a recuperação é rápida e total, confirmando os dados obtidos por Justino & Sodek (2013). Ao avaliarmos a expressão dos genes *nifH* e *nifD* do rizóbio *B. elkanii* (SEMIA 5019), responsáveis pela síntese da subunidade alfa do componente I (FeMo) e do componente II (Fe-proteína) respectivamente, observamos uma redução brusca na expressão de ambos os genes, mais proeminente no gene *nifD* (quase

inexistente), sob inundação, o que corrobora os dados encontrados para a atividade da enzima. Além disso, pôde-se verificar que o padrão de expressão demonstrado pelos genes foi distinto. Aparentemente a recuperação da expressão do *nifD* é lenta e gradativa, mas é completa. Já o *nifH* apresenta recuperação mais rápida. Sánchez *et al.* (2010) também avaliaram a expressão do *nifH* em nódulos de soja sob hipóxia, infectados, neste caso, pelo *B. japonicum* (USDA 110) e verificaram uma redução de sete vezes na expressão em relação ao controle não inundado, demonstrando o efeito da hipóxia na expressão da enzima nitrogenase.

Rocha *et al.* (2010a) trabalhando com hipóxia do sistema radicular em nódulos de *Lotus japonicum* infectados pelo rizóbio *Mesorhizobium loti* (R7A), avaliaram a expressão do *nifH* por qRT-PCR, e também observaram uma diminuição na expressão deste gene na inundação. Porém, não observaram recuperação na expressão após a remoção do estresse, como aqui observado.

Os resultados obtidos neste trabalho, principalmente com relação à expressão dos genes *nifH* e *nifD* são de extrema importância, uma vez que praticamente não são descritos na literatura os efeitos de estresses (adversos), sobre a expressão destes genes em nódulos de plantas. Além disso, os resultados obtidos para expressão dos genes da nitrogenase e da AS corroboram os dados bioquímicos obtidos no Cap. I, e demonstram que a baixa disponibilidade de O₂ no nódulo, devido à hipóxia, reduz não somente a atividade das enzimas mas também a expressão dos genes responsáveis pela síntese das mesmas. Contudo, a remoção do estresse leva à recuperação gradual tanto da expressão quanto da atividade das enzimas nitrogenase e AS.

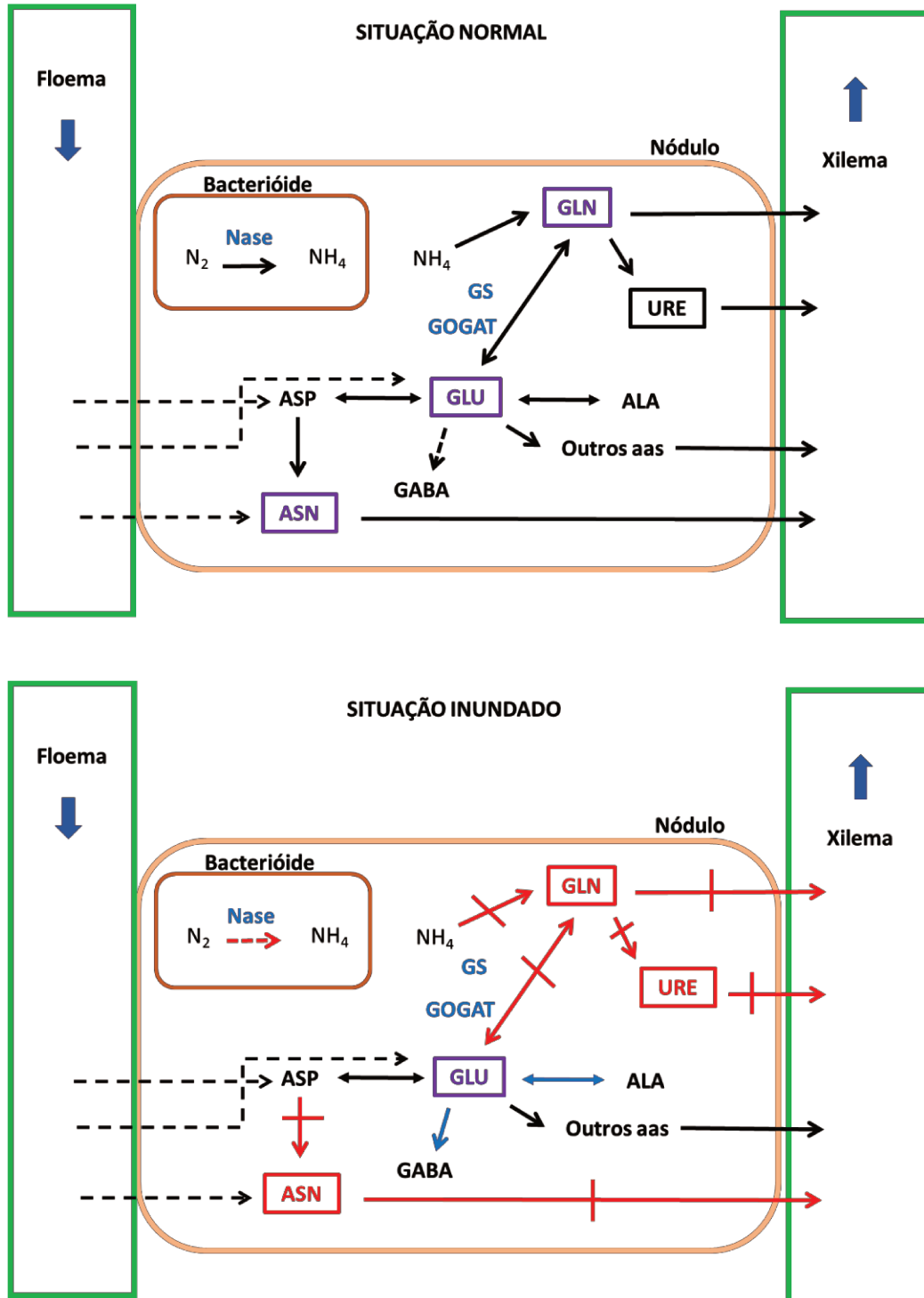
10.6 CONCLUSÕES

- A hipóxia do sistema radicular afetou a expressão de todos os genes avaliados.
- A expressão de *AS1*, gene que codifica a enzima responsável pela síntese de ASN, diminuiu drasticamente com a inundação e recuperou-se lenta e gradualmente, de forma consistente com as variações no teor de ASN no nódulo e seiva do xilema.
- A expressão de *AS2* também diminuiu com a inundação, mas neste caso a recuperação foi rápida.
- A expressão do gene para GAD, enzima responsável pela formação de GABA, reduz drasticamente com a inundação e portanto não explica o aumento deste aminoácido no nódulo durante o estresse.
- A expressão dos genes *nifH* e *nifD* diminuíram com a inundação, mas recuperaram-se, e no caso de *nifD* a recuperação foi gradual. Estas variações explicam a inibição da FBN durante a inundação do sistema radicular nodulado de soja, e a sua recuperação lenta após remoção do estresse.

11.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com a inundação as alterações mais notórias na composição de aminoácidos do nódulo foi a redução acentuada de ASN e aumento de GABA.
- Como em outros trabalhos, também observamos aqui redução drástica na atividade da enzima nitrogenase após a inundação.
- Com os resultados obtidos, concluímos que no metabolismo de N no nódulo, a inundação afeta principalmente as amidas GLN e ASN, e o aminoácido GABA.
- A incorporação de $^{15}\text{N}_2$ foi maior em GLN seguida de $\text{GLU} > \text{ASP} > \text{ALA} > \text{ASN}$, o que está em conformidade com os dados descritos na literatura sobre a assimilação do N nos aminoácidos.
- A incorporação de $^{15}\text{N}_2$ foi menor para os aminoácidos GLN, ASP, GLU, SER e ALA, nos tratamentos de inundação em relação ao tratamento controle (não inundado). Porém, não houve alterações na incorporação de $^{15}\text{N}_2$ em ASN e GABA.
- Apesar das alterações observadas, principalmente no teor de ASN e GABA, não houve alteração no teor de aminoácidos totais. Portanto, propomos que ASN sai do nódulo para transporte no xilema, e há outra fonte de N, provavelmente o floema, para compensar esta perda e formar GABA, uma vez que a incorporação de $^{15}\text{N}_2$ é menor durante a inundação.
- Os dados de expressão de *AS1* e *AS2* e dos genes *nifH* e *nifD* (nitrogenase), corroboram os dados bioquímicos (redução de ASN e recuperação lenta) e enzimáticos (queda da atividade da nitrogenase).

Abaixo um esquema demonstrando o efeito da inundação nos nódulos na situação normal e inundado:



12.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, B.J., Boddey, R.M., Urquiaga, S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant Soil* 252:1-9.
- Amarante, L. & Sodek, L., 2006. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. *Biol. Plant* 50 (3): 405 – 410.
- Amarante, L., Lima, J.D., Sodek, L. 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. *Environ. Exp. Bot.* 58: 123 – 129.
- Andrews, M., Lea, P.J., Raven, J.A., Azevedo, R.A. 2009. Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: genes and costs. *Ann. Appl. Biol.* 155(1): 1-13.
- Antunes, F. 2007. Papel da redutase do nitrato e da asparagina sintetase em plantas de soja (*Glycine max* L.) sob condições de estresse de nitrogênio. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. Tese de Doutorado.
- Antunes, F., Aguilar, M., Pineda, M., Sodek, L. 2008. Nitrogen stress and the expression of asparagine synthetase in roots and nodules of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum* 133(4): 736-743.
- Appleby, O. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Phys.* 35: 443–478.
- Armstrong, W., Brandle, R., Jackson, M.B. 1994. Mechanism of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 43: 307 – 358.

- Atkins, C.A. 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant Soil* 100: 157 – 169.
- Atkins, C.A. 1991. Ammonium assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation* (eds M.J., Dilworth & A.R., Glenn), Elsevier, Amsterdam. pp. 293-319.
- Atkins, C.A., Pate, J.S., Griffiths, G., White, S.T. 1980. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO₃-grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Plant Physiol.* 66: 978-983.
- Atkins, C.A., Dakora, F.D., Storer, P.J. 1990. Effect of oxygen pressure on synthesis and export of nitrogenous solutes by nodules of cowpea. *Planta* 182(4): 565-571.
- Atkins, C.A., Storer, P.J., Pate, J.S. 1988. Pathways of nitrogen assimilation in cowpea nodules studied using ¹⁵N₂ and allopurinol. *Plant Physiol.* 86: 204-207.
- Azevedo, R.A., Lancien, M., Lea, P.J. 2006. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids* 30(2): 143-162.
- Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. 2006. Aluminium stress affects nitrogen fixation and assimilation in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regul.* 48(3), 271-281.
- Barta, A.L. 1987. Supply and partitioning of assimilates to roots of *Medicago sativa* L. and *Lotus corniculatus* L. under anoxia. *Plant, Cell & Environ.* 10(2): 151-156.
- Barta, A.L. 1988. Response of field grown alfalfa to root waterlogging and shoot removal. I. Plant injury and carbohydrate and mineral content of roots. *Agron. J.* 80(6): 889-892.

- Benson, J.R., & Hare, P.E. 1975. *O*-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. Proc. Nat. Acad. Sci. 72(2): 619-622.
- Bouché, N., & Fromm, H. 2004. GABA in plants: just a metabolite? Trends Plant Sci. 9(3): 110-115.
- Broughton, W.J., Zhang, F., Perret, X., Staehelin, C. 2003. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: Agricultural uses and perspectives. Plant Soil 252:129–137.
- Castonguay, Y., Nadeau, P., Simard, R.R. 1993. Effects of flooding on carbohydrate and ABA levels in roots and shoots of alfalfa. Plant, Cell & Environ. 16(6): 695-702.
- Cedar, H., & Schwartz, J.H. 1969. The asparagine synthetase of *Escherichia coli* I. Biosynthetic role of the enzyme, purification, and characterization of the reaction products. J. Biol. Chem. 244: 4112-4121.
- Chaves das Neves, H.J., & Vasconcelos, A.M.P. 1987. Capillary gas chromatography of amino acids, including asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic—mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic—mass spectrometric detection of the N, O (S) -*tert.*-butyldimethylsilyl derivatives. J. Chromatogr. 392: 249-258.
- D'Haese, W. & Hosters, M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiology 12: 79 - 105.

- Dakora, F.D. 2000. Commonality of root nodulation signals and nitrogen assimilation in tropical grain legumes belonging to the tribe *Phaseoleae*. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 885 – 892.
- Day, D.A., Price, G.D., Udvardi, M.K. 1989. Membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum-Glycine max* symbiosis: peribacteroid membrane units from soybean nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 16: 69–84.
- De Sousa, C.A.F. & Sodek, L. 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environ. Exp. Bot.* 50: 1 – 8.
- Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G., Peacock, W.J. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J. Exp. Bot.* 51(342):89-97.
- Dighe, N.S., Shukla, D., Kalkotwar, R.S., Laware, R.B., Bhawar, S.B., Gaikwad, R.W. 2010. Nitrogenase Enzyme: A Review. *Der Pharm. Sinica* 1 (2): 77-84.
- Dobereiner, J. 1990. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. *Estudos Avançados* 4(8): 144-152.
- Dobereiner, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economics contribution. 1997. *Soil Biol. Biochem.* 29: 771 – 774.
- Downie, J.A. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr. Biol.* 15(6): 196-198.

- Drew, M.C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 223 – 250.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G., Fernie, A.R. 2008. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci.* 13(1): 14-19.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T., Pennington, J.S. 1971. Stage of development description for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. *Crop Sci.* 11: 929 - 931.
- Food And Agricultural Organization of United Nations, 2013. <http://www.fao.org>. Acesso em Setembro de 2013.
- Forde, B.G., & Lea, P.J. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J. Exp. Bot.* 58(9): 2339-2358.
- Fukao, T. & Serres, J.B. 2004. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act. *Trends Plant Sci.* 9 (9): 450 – 455.
- Gage, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280 – 300.
- Geurts, R. & Bisseling, T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell* (Suppl.) 14: 239 – 249.
- Godber, I.M., & Parsons, R. 1998. Translocation of amino acids from stem nodules of *Sesbania rostrata* demonstrated by GC-MS in planta ¹⁵N isotope dilution. *Plant Cell Environ.* 21:1089-99.

- Graham, D. & Smydzuc, J. 1965. Use of anthrone in the quantitative determination of hexose phosphates. *Anal. Biochem.* 11:246-255.
- Handel, E.V. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22:280-283.
- Handley, L.L., & Raven, J.A. 1992. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant, Cell & Environ.* 15(9): 965-985.
- Herridge, D.F., Bergensen, F.J., Peoples, M.B. 1990. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ^{15}N abundance methods. *Plant Physiol.* 93: 708-716.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Soil Calif. Agr. Exp.Sta. Bull.*, circular 347.
- Huang, B., Johnson, J.W., NeSmith, S., Bridge, D.C. 1994. Root and Shoot growth of wheat genotypes in response to hypoxia and subsequent resumption of aeration. *Crop Sci.* 34: 1538 – 1544.
- Hubert, R. & Simoni, R.D. 1980. Genetic and biochemical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 142: 212-220.
- Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.D.C. 2001. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Embrapa Soja; Brasília, DF: Embrapa Cerrados.
- Hunt, S. & Layzell, D.B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 483–511.

- Hyun, T.K., Eom, S.H., Jeun, Y.C., Han, S.H., Kim, J.S. 2013. Identification of glutamate decarboxylases as a γ -aminobutyric acid (GABA) biosynthetic enzyme in soybean. *Ind. Crop Prod.* 49: 864-870.
- Irfan, M., Hayat, S., Hayat, Q., Afroz, S., Ahmad, A. 2010. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma* 241(1-4): 3-17.
- Jackson, M.B., Herman, B., Goodnough, A. 1982. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant Cell Environ.* 5: 163 – 172.
- Jarret, H.W., Cooksey, K.D., Ellis, B., Andersen, J.M. 1986. The separation of *o*-Pthaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. *Analyt. Biochem.* 153: 189 – 198.
- Justino, G.C. 2009. Fixação do nitrogênio em plantas de soja com o sistema radicular alagado. Universidade Estadual de Campinas: Campinas – SP. Tese de Doutorado.
- Justino, G.C. & Sodek, L. 2013. Recovery of nitrogen fixation after short-term flooding of the nodulated root system of soybean. *J. Plant Physiol.* 170(3):235-241.
- Kennedy, R.A., Rumpho, M.E., Fox, T.C. 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* 101: 1163 – 1168.
- Kim, J. & Rees, D.C. 1992. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* 257(5077): 1677-1682.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C., Maier, U-G. 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*. Vol. 7. 55 pp.

- Lam H.M., Cosghigano I., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47: 569–593.
- Lanza, L.N.M., Rossi, S.C., Sodek, L. 2013. Adubação nitrogenada beneficia soja alagada. *Bragantia* 72(1): 2-9.
- Lancien M., Gadad P., Hodges M. 2000. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol.* 123: 817– 824.
- Layzell D.B. & Hunt S. 1990. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol Plantarum* 80: 322–7.
- Lea, P.J. & Fowden, L. 1975. The purification and properties of glutamine-dependent asparagines isolated from *Lupinus albus*. *Proceedings Royal Society of London Series B*, 192: 13 – 26.
- Lea, P.J., & Azevedo, R.A. 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Ann. Appl. Biol.* 149(3): 243-247.
- Lea, P.J., Robinson, S.A., Stewart, G.R. 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: *The Biochemistry of Plants: Intermediary Nitrogen Metabolism*. (Mifflin, B.J. & Lea, P.J., eds.) Vol 16, Academic Press, New York, pp. 147-152.
- Lima, J. D. & Sodek, L. 2003. N-stress alters aspartate and asparagine levels in xylem sap in soybeans. *Plant Sci.* 165: 649 – 645.

- Limami, A.M., Glévarec, G., Ricoult, C., Cliquet, J.B., Planchet, E. 2008. Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *J. Exp. Bot.* 59(9): 2325-2335.
- Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J.A., Watson, A. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agr Sust Develop.* 31:155–172.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H.F., Dourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A., Poole, P.S. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbioses. *Nature* 422: 722 – 726.
- Lucinski, R., Polcyn, W., Rataczak, L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* — legumes. *Acta Biochim. Polonica* 49:537 – 546.
- Marin, V.A., Baldani, J., Teixeira, K.D.S. 1998. Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN. EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 84.
- Marur, C.J., Sodek, L., Magalhães, A.C. 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6(2): 103-108.
- Matsuyama, A., Yoshimura, K., Shimizu, C., Murano, Y., Takeuchi, H., Ishimoto, M. 2009. Characterization of glutamate decarboxylase mediating γ -amino butyric acid increase in the early germination stage of soybean (*Glycine max* [L.] Merr). *J. Biosci. Bioeng.* 107(5): 538-543.

- 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 N₂ fixation in soybean. *Plant Physiol.* 66: 720 – 725.
- McNeil, D.L. & LaRue, T.A. 1984. Effect of nitrogen source on ureides in soybean. *Plant Physiol.* 74: 227-232.
- McParland, R.H., Guevara, J.G., Becker, R.R., Evans, H. J. 1976. The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of Soya-bean root nodules. *Biochem. J.* 153: 597-606.
- Mengel, K., Kosegarten, H., Kirkby, E.A., Appel, T. 2001. *Principles of Plant Nutrition* 5th ed. Springer: Southport, United Kingdom. 849pp.
- Miller, A.J. & Cramer, M.D. 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274: 1–36.
- Minamisawa, K., Arima, Y., Kumazawa, K. 1986. Characteristics of asparagine pool in soybean nodules in comparison with ureide pool. *Soil Sci. Plant Nutr.* 32: 1-14.
- Minchin F.R. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol Biochem.* 29: 881–888.
- Minchin, F.R., Sheehy, J.E., Witty, J.F. 1986. Further errors in the acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. *J. Exp. Bot.* 37(10): 1581-1591.

- Mustroph, A., Kaiser, K.A., Larive, C.K., & Bailey-Serres, J. 2014. Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in Arabidopsis with a focus on primary C- and N- metabolism. *Plant Cell Environ.*
- Neo, H.H., & Layzell, D.B. 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 113(1): 259-267.
- Norris, D.O. & Date, R.A. 1976. Legume bacteriology. In: *Tropical Pastures Research; Principles and Methods* (N. H. Shaw, W. W. Bryan, eds) Commonwealth Bureal of pastures and Field Crops, Bull. 51 Hurley, England, pp. 134 – 174.
- Ohyama, T., & Kumazawa, K. 1978. Incorporation of ¹⁵N into various nitrogenous compounds in intact soybean nodules after exposure to ¹⁵N₂ gas. *Soil Sci. Plant Nutr.* 24: 525-533.
- Oliveira, H.C., & Sodek, L. 2013. Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism of soybean root segments. *Amino Acids* 44(2): 743-755.
- Oliveira, H.C., Freschi, L., Sodek, L. 2013a. Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 66: 141-149.
- Oliveira, H.C., Salgado, I., Sodek, L. 2013b. Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. *Planta*, 237(1): 255-264.

- Parker, E.J., & Pratt, A.J. 2011. Amino Acid Biosynthesis. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Vol. 3, 1-82.
- Parsons, R., & Baker, A. 1996. Cycling of amino compounds in symbiotic lupin. *J. Exp. Bot.* 47: 421-429.
- Parsons, R., Stanforth, A., Raven, J.A., Sprent, J.I. 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell Environ.* 16(2): 125-136.
- Pate, J.S. 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* 5:109-119.
- Pate, J.S., Sharkey, P.J., Lewis, O.A.M. 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. *Planta* 122, 11-26.
- Pate, J.S., Atkins, C.A., Herridge, D.F., Layzell, D.B. 1981. Synthesis, storage, and utilization of amino compounds in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiol.* 67: 37-42.
- Persson, J. & Nasholm, T. 2001. A GC-MS method for determination of amino acid uptake by plants. *Physiol. Plantarum* 113(3): 352-358.
- Prell, J., Bourdes, A., Karunakaran, R., Lopez-Gomez, M., Poole, P. 2009. Pathway of γ -aminobutyrate metabolism in *Rhizobium leguminosarum* 3841 and its role in symbiosis. *J. Bacteriol.* 191(7): 2177-2186.

- Pugh, R., Witty, J.F., Mytton, L.R., Minchin, F.R. 1995. The effect of waterlogging on nitrogen fixation and nodule morphology in soil-grown white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* 46: 285–90.
- Puiatti, M. & Sodek, L. 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 767 – 773.
- Richards, N.G., & Schuster, S.M. 1992. An alternative mechanism for the nitrogen transfer reaction in asparagine synthetase. *FEBS letters* 313(2): 98-102.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., Van Dongen, J.T. 2010a. Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 152:1501-1513.
- Rocha, M., Sodek, L., Licausi, F., Hameed, M.W., Dornelas, M.C., Van Dongen, J.T. 2010b. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. *Amino Acids* 39(4): 1043-1053.
- Sairam, R.K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P.S., Srivastava, G.C. 2008. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. *Biol Plantarum* 52(3):401-412.
- Sánchez, C., Gates, A.J., Meakin, G.E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D.J., *et al.* 2010. Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant Microbe. In.* 23(5): 702-711.

- Scharff, A.M., Egsgaard, H., Hansen, P.E., Rosendahl, L. 2003. Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea root nodules by in vivo ^{15}N nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* 131(1): 367-378.
- Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., *et al.* 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- Schubert, K. R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:539-574.
- Schubert, S., Serraj, R., Plies-Balzer, E., Mengel, K. 1995. Effect of drought stress on growth, sugar concentrations and amino acid accumulation in N_2 -fixing alfalfa. *J. Plant Physiol.* 146, 541–546.
- Serraj, R., Shelp, B.J., Sinclair, T.R. 1998. Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. *Physiol. Plantarum* 102(1): 79-86.
- Silvester, W.B., Parsons, R., Watt, P.W. 1996. Direct measurement of release and assimilation of ammonia in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis. *New Phytol.* 132:617-625
- Smith, P.M. & Atkins, C.A. 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128, 793–802.
- Snedden, W.A., Arazi, T., Fromm, H., Shelp, B.J. 1995. Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.* 108(2): 543-549.
- Streeter, G. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N_2 fixation by nitrate. *Critical Rev. Plant Sci.* 7: 1-23.

- Thomas, A.L., & Sodek, L. 2005. Development of the nodulated soybean plant after flooding of the root system with different sources of nitrogen. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(3): 291-297
- Thomas, A.L., Gerreiro, S.M.C., Sodek, L. 2005. Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. *Ann. Bot.* 96: 1191 – 1198.
- Thomson, C.J. & Greenway, H. 1991. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. *Plant Physiol.* 96:1294-1301.
- Udvardi, M.K., Lister, D.L., Day, D.A. 1992. Biological nitrogen fixation investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141:13 – 39.
- Van Heeke, G. & Schuster, S.M. 1989. The N-terminal cysteine of human asparagine synthetase is essential for glutamine-dependent activity. *J. Biol. Chem.* 264(33): 19475-19477.
- Vogels, G.D. & Van Der Drift, C. 1970. Differential analysis of glyoxilato derivatives. *Anal. Biochem.* 33:143-157
- White, C.-P. 2011. Urea metabolism in plants. *Plant Sci.* 180: 431–438.
- Williams, L.E. & Miller, A.J., 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Ver. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52: 659 – 688.
- Yemm, E.W., & Cocking, E.C. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst.* 80: 209-213.

Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., Boldt, R. 2006. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 805-836.