

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LILIANE SANTOS DE CAMARGOS

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE COMPOSTOS
NITROGENADOS EM *Calopogonium mucunoides* EM
RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO:
EFEITOS NA NODULAÇÃO E NA FIXAÇÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek

2007

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

C14a Camargos, Liliane Santos de
Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados
em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes
fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação /
Liliane Santos de Camargos. - Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Nitrato. 2. Nitrogênio - Fixação. 3. Ureídeos. 4.
Aminoácidos. I. Sodek, Ladaslav. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Alterations in the metabolism of nitrogenous compounds in *Calopogonium mucunoides* in response to different nitrogen sources: effects on nodulation and fixation.

Palavras-chave em inglês: Nitrate; Nitrogen fixation; Ureides; Amino acids.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Ladaslav Sodek, Marlene Aparecida Schiavinato, Cláudia Regina Baptista Haddad, Mário Puiatti, Luciano do Amarante.

Data da defesa: 03/05/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Data da defesa: 03/05/2007

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador)

L. Sodek

Prof. Dr.^a Cláudia Regina Baptista Haddad

Cláudia Haddad

Prof. Dr.^a Marlene Aparecida Schiavinato

Marlene Schiavinato

Prof. Dr. Mário Puiatti

Mário Puiatti

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Luciano do Amarante

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani

Prof. Dr. Marcos Pereira Marinho Aida

Ao meu companheiro Leandro,
Ofereço

À nossa linda filha Júlia, cujo sorriso faz tudo valer a pena,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Biologia/Unicamp, especialmente ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade para realização do curso;

Ao CNPq, pela bolsa concedida (proc. 140578/2004-8) e pelo apoio financeiro ao projeto (proc.470160/2003-9);

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, pela orientação, apoio, incentivo, e pelas valiosas discussões durante todo o período de desenvolvimento do trabalho de tese;

Aos Prof.s Pedro Roberto Furlani, Eduardo Caruso Machado e Ana Maria Magalhães Andrade Lagôa, pelas críticas e sugestões à tese;

Ao Departamento de Ciências Naturais (UFMS/Campus de Três Lagoas), pela concessão para condução dos experimentos e realização das análises;

Ao Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas (USP/ESALQ) e, por conseguinte, ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, não só pela permissão para realização das análises de aminoácidos por HPLC, mas pelo apoio e amizade dispensados;

Ao amigo José Antônio Carmezini, que tanto auxiliou durante as análises por HPLC;

Ao Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar (UFMS/Campus de Três Lagoas/DCN), como profissional, pelo grande auxílio durante o desenvolvimento do projeto; e como companheiro, pelo estímulo, apoio, compreensão e cumplicidade constantes;

Aos meus pais, Lázaro e Lúcia Camargos, e a meu irmão, Linderley;

Aos grandes amigos, Gilberto C. Justino, Meire Cristina N. Andrade, Guilherme José G. Pereira, Alejandro Alberto Toro, Patrícia F. Cardoso, Fabrício S. Delite e Vanderlei A. Varisi;

À Piraí Sementes (Piracicaba – SP), pela disponibilização do material;

À todos os professores, colegas e funcionários da Unicamp e da UFMS que colaboraram para a realização deste.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 CONSIDERAÇÕES GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Nitrogênio e meio ambiente.....	3
2.2 Nitrogênio e leguminosas: influência do nitrato na nodulação.....	4
2.3 Absorção, transporte e redução de nitrato em plantas superiores.....	8
2.3.1 Absorção e transporte de nitrato.....	10
2.4 Aspectos fisiológicos da enzima Nitrato Redutase (NR).....	12
2.5 Aspectos relevantes da espécie <i>Calopogonium mucunoides</i>	14
3 OBJETIVOS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Material biológico.....	17
4.1.1 Cultivo das plantas.....	17
4.1.1.1 Soluções Nutritivas.....	17
4.1.2 Experimentação.....	18
4.1.2.1 Efeito do Nitrogênio Mineral na Nodulação.....	18
4.1.2.2 Efeito do Nitrogênio Mineral na Fixação.....	19
4.1.3 Coleta do Material.....	20
4.2 Extração de compostos nitrogenados para quantificação e análise qualitativa de aminoácidos	20
4.3 Quantificação de compostos nitrogenados.....	21

	Página
4.3.1 Análise quantitativa de aminoácidos.....	21
4.3.2 Análise quantitativa de ureídeos (Alantoína e Ácido Alantóico).....	21
4.3.3 Análise quantitativa de nitrato.....	22
4.3.4 Análise quantitativa de amônia.....	23
4.3.5 Análise quantitativa de proteínas.....	23
4.4 Análise qualitativa de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	24
4.5 Análise de Atividade Enzimática.....	25
4.5.1 Análise <i>in vivo</i> da atividade da enzima nitrato redutase (NR).....	25
4.5.2 Análise <i>in vitro</i> da atividade da enzima alantoinase.....	25
4.5.3 Análise <i>in vivo</i> da atividade da enzima nitrogenase.....	26
4.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS	27
5.1 Efeito do Nitrogênio sobre a Nodulação.....	27
5.2 Efeito do Nitrogênio Mineral sobre a Fixação.....	35
5.2.1 Efeito do tempo de exposição.....	35
5.2.2 Efeito da concentração de nitrogênio mineral fornecida.....	47
5.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no padrão de aminoácidos solúveis totais: variações qualitativas.....	58
6 DISCUSSÃO	72
6.1 Efeito do Nitrogênio sobre a Nodulação.....	72
6.2 Efeito do Nitrogênio Mineral sobre a Fixação.....	84
6.2.1 Efeito do tempo de exposição.....	84
6.2.2 Efeito da concentração de nitrogênio mineral fornecida.....	93

	Página
6.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no padrão de aminoácidos solúveis totais: variações qualitativas.....	100
7 CONCLUSÕES	113
8 LITERATURA CITADA	114

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre nodulação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema e em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . As plantas foram expostas à presença de nitrogênio antes da inoculação e cultivadas com a mesma solução durante 6 semanas. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.....	29
2 Influência da fonte de nitrogênio sobre a nodulação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema e em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato por 21 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.....	37
3 Influência da fonte de nitrogênio sobre a nodulação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema e em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.....	43
4A Influência da fonte e da concentração de nitrogênio sobre a nodulação e teores de compostos nitrogenados em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.....	49
4B Influência da fonte e da concentração de nitrogênio sobre a composição nitrogenada em seiva de xilema de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.....	51
5 Influência da concentração de nitrato sobre a nodulação e a fixação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.....	56
6 Influência da fonte de nitrogênio no teor de aminoácidos em seiva de xilema e em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . As plantas foram expostas à presença de nitrogênio antes da inoculação e cultivadas com a mesma solução durante 6 semanas. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 1.....	59

7 Influência do nitrato no teor de aminoácidos em seiva de xilema e em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato por 21 dias. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 2.....	64
8 Influência da fonte de nitrogênio no teor de aminoácidos em seiva de xilema e em tecidos de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 3.....	67
9 Influência da fonte e da concentração de nitrogênio no teor de aminoácidos em seiva de xilema de <i>Calopogonium mucunoides</i> . Plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 4B.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau centígrado
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	aspartato
BSA	albumina de soro bovino
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno-diamina-tetra-acético
Gaba	ácido gama-aminobutírico
Gln	glutamina
Glu	glutamato
Gly	glicina
GOGAT	glutamato sintase ou glutamina-oxoglutarato amidatransferase
GS	glutamina sintetase
His	histidina
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
Ile	isoleucina
Km	constante de Michaelis
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
MF	massa fresca

MS	massa seca
N ₂	dinitrogênio
NADH	β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NH ₄ ⁺	amônio
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
NR	nitrato redutase
OPA	o-ftadialdeído
Phe	fenilalanina
Ser	serina
Thr	treonina
Tris	tris[hidroxilmetil]aminometano
Tyr	tirosina
Val	valina

Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação

Calopogonium mucunoides é uma leguminosa tropical típica de cerrado, sendo muito utilizada em adubação verde e como forrageira. Possui alta capacidade de fixação de nitrogênio, sendo cultivada em solos de baixo pH e pouca fertilidade; e boa resistência à seca, mas não tolera baixas temperaturas. Poucos são os estudos acerca do metabolismo de nitrogênio nesta espécie, mas demonstram que a leguminosa apresenta alta abundância relativa de ureídeos quando fixando nitrogênio. Estudos preliminares nossos demonstraram certa tolerância do mecanismo de fixação à exposição ao nitrato. Este trabalho objetivou estudar o metabolismo de nitrogênio, em *Calopogonium mucunoides*, identificando as principais alterações no metabolismo de nitrogênio sob diferentes condições de obtenção deste nutriente: plantas cultivadas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio antes da nodulação; e plantas plenamente noduladas, então expostas a receber solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio, em diferentes concentrações e por diferentes tempos de exposição. Observou-se que a espécie não apresentou nodulação sensível à presença de nitrogênio no meio e, quando plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio, a fixação foi mantida e a atividade da enzima nitrogenase só foi afetada, embora não totalmente, quando as plantas foram expostas a concentrações de 30 mM de nitrato. Por outro lado, a espécie parece responder à fonte de nitrogênio translocando e/ou acumulando diferentes formas de ureídeo (alantoína e ácido alantóico), mas o metabolismo de aminoácidos não apresentou resposta padrão à exposição ao nitrogênio. Estes estudos indicaram tolerância da nodulação e da fixação de nitrogênio desta espécie ao cultivo na presença de nitrogênio, podendo então servir de embasamento a futuros estudos acerca da sensibilidade/tolerância desses processos à presença de nitrogênio no meio em leguminosas em geral.

Alterations in the metabolism of nitrogenous compounds in *Calopogonium mucunoides* in response to different nitrogen sources: effects on nodulation and fixation

Calopogonium mucunoides is a tropical legume found in the “cerrado” (savanna) regions, and widely used as green manure and forage. It has a high capacity for fixing nitrogen, being cultivated in soils with low pH and poor fertility; and good resistance to drought, but does not tolerate low temperatures. Studies on the nitrogen metabolism of this species are quite scarce but it is known that the legume has a high relative abundance of ureides when fixing nitrogen. Our own preliminary studies suggested certain tolerance of fixation to the presence of nitrate. The objective of the present study was to study nitrogen metabolism in *Calopogonium mucunoides*, identifying the influence of the nitrogen source on nitrogen metabolism using: different nitrogen sources starting before nodulation; and exposing plants to the same sources only after complete nodulation, at different concentrations and times of exposure. It was found that the nodulation process of this species was not sensitive to the presence of a nitrogen source in the medium and, when fully nodulated plants were exposed to the nitrogen sources, fixation was maintained and the activity of nitrogenase was only affected, albeit partially, when exposed to the highest (30 mM) dose of nitrate. On the other hand, the species appears to respond to the exogenous source of nitrogen by translocating and/or accumulating different forms of ureides (allantoin and allantoic acid), but the metabolism of amino acids did not respond clearly to the nitrogen source. The data indicate that the process of nodulation and nitrogen fixation in this species is tolerant to the presence of a nitrogen source in the medium and should prove useful for future studies on the sensitivity/tolerance of nitrogen fixation to an external nitrogen source in legumes.

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio está entre os elementos minerais mais abundantes nas plantas, sendo um dos principais fatores limitantes a seu crescimento. As plantas têm a capacidade de assimilar o nitrogênio inorgânico do ambiente e sintetizar todos os aminoácidos encontrados em proteínas, além dos outros compostos orgânicos nitrogenados presentes nas mesmas.

O nitrogênio inorgânico inclui tanto o nitrogênio mineral, na forma de nitrato e amônia, quanto o nitrogênio atmosférico, sendo que este último não é prontamente aproveitável pelas plantas, mas pode ser assimilado em conjunto com microorganismos fixadores. O processo mais bem sucedido de aproveitamento do nitrogênio atmosférico é a fixação biológica que ocorre nos nódulos presentes nas leguminosas.

O nitrogênio mineral está presente nas formas de nitrato e amônia, sendo o nitrato o mais comum. Amônia está disponível apenas em condições especiais de solo, como solos ácidos ou áreas com vegetação cujas raízes exudam inibidores do processo de nitrificação, como planícies de gramíneas e florestas de coníferas. A nitrificação também é prejudicada em solos compactados ou alagados, em função da baixa disponibilidade de oxigênio.

Apesar de ser a forma mais comum de nitrogênio mineral presente no solo, o nitrato é facilmente lixiviado, uma vez que o solo possui carga líquida de superfície negativa.

Após a absorção pela planta, o nitrogênio inorgânico precisa ser incorporado em moléculas orgânicas, processo que recebe o nome de assimilação. A amônia ao ser absorvida é prontamente assimilada pela via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase), já o nitrato precisa ser reduzido a amônia pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase para ser então assimilado.

Dadas as características de obtenção de nitrogênio via fixação biológica, as leguminosas constituem-se em um grupo de grande importância. Possuem capacidade de acúmulo de

proteínas em seus grãos, que são muito utilizados na alimentação. Como a maior parte do nitrogênio presente em leguminosas foi retirado da atmosfera, estas são muito utilizadas na adubação verde, prática que consiste no cultivo de leguminosas fixadoras que, em vez de serem colhidas, são incorporadas ao solo para que o nitrogênio contido na matéria orgânica seja liberado na forma de amônia, após a degradação.

Em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio mineral no ambiente, bactérias fixadoras do grupo *Rhizobium* infectam o sistema radicular das leguminosas e estabelecem uma relação simbiótica, formando nódulos radiculares. Nesta associação, o nitrogênio atmosférico é reduzido a amônia que é, então, assimilada via GS/GOGAT. Por outro lado, via de regra, havendo disponibilidade de nitrogênio mineral no ambiente, a leguminosa não estabelece a relação simbiótica, absorvendo o nitrogênio do meio.

Apesar de as duas vias, absorção de nitrogênio mineral, mais comum na forma de nitrato, e fixação biológica, terem como produto final a amônia, em leguminosas tropicais, particularmente as da tribo Phaseolae, ocorrem alterações no metabolismo de nitrogênio em função da fonte primária. Via de regra, quando a amônia provém da associação simbiótica, os produtos nitrogenados exportados via xilema são ureídeos, enquanto quando provém da redução assimilatória do nitrato, são exportadas amidas, especialmente asparagina e glutamina.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as possíveis alterações decorrentes da fonte primária de nitrogênio em *Calopogonium mucunoides*, tais como sensibilidade do sistema de fixação à presença do nitrogênio mineral, através da quantificação localizada dos principais compostos nitrogenados, sob diferentes condições de fornecimento de nitrogênio.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nitrogênio e meio ambiente

O nitrogênio é o nutriente mineral essencial mais limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Date, 1973; Hardy & Havelka, 1975). As plantas adquirem nitrogênio do solo na forma de nitrato, amônia, uréia e aminoácidos, prevalecendo o nitrato em grande parte dos solos por ser o produto final da utilização microbiológica do nitrogênio amoniacal, onde bactérias quimiossintetizantes dos gêneros *Nitrossomonas* e *Nitrobacter* oxidam a amônia e utilizam os elétrons removidos no seu metabolismo (Willians & Miller, 2001). Como o solo possui carga elétrica líquida negativa, o nitrato não se liga eletrostaticamente a esta matriz, sendo facilmente lixiviado quando não absorvido pelos vegetais. Em condições especiais de solo que inibem a atividade metabólica destas bactérias quimiossintetizantes, tais como anoxia, alta concentração de compostos fenólicos e alta acidez, o nitrogênio fixado disponível preponderante é a amônia que, em ambientes básicos, volatiliza-se, sendo perdida do sistema explorado pelos vegetais, o solo. Inversamente, em ambientes ácidos, mantém-se na forma protonada, podendo interagir com os colóides do solo.

Na atmosfera o N_2 , dinitrogênio, é o gás mais abundante, entretanto somente alguns microorganismos procariotos desenvolveram mecanismos bioquímicos que permitem reduzir N_2 a amônia e incorporá-la a esqueletos carbônicos (assimilação de nitrogênio), o que faz com que estes ocupem um nicho ecológico indispensável, fornecendo nitrogênio fixado para o ciclo global nos mais diferentes ecossistemas, desde solos aeróbicos, superfície dos oceanos, a nódulos especializados de leguminosas (Halbleib & Ludden, 2000). A amônia é, então, incorporada a compostos orgânicos (assimilação) pois não pode ser fisiologicamente acumulada por ser tóxica, atuando como desacoplador de membrana (Givan, 1979). Muitos desses microorganismos conseguiram associar-se simbioticamente com outros organismos,

sendo que a associação mais importante, em termos econômicos, é a associação de bactérias do grupo do *Rhizobium* com plantas do grupo das leguminosas.

No solo, o nitrogênio presente pode estar na forma de nitrato, amônia, aminoácidos, peptídeos e purinas, sendo encontrados transportadores de membranas para todas estas formas (Willians & Miller, 2001). Uréia também é absorvida e translocada nesta forma, apresentando, em tomate, baixa eficiência na fase de plântula e eficiência próxima à do nitrato em outros estádios de desenvolvimento (Tan et al., 2000).

2.2 Nitrogênio e leguminosas: influência do nitrato na nodulação

Um exemplo da importância da associação *Rhizobium*/leguminosas é a produção brasileira de soja que dispensa totalmente a adubação nitrogenada onde, praticamente, todo o nitrogênio dos compostos desta planta provém da associação simbiótica, tornando o produto brasileiro altamente competitivo. As leguminosas constituem o único grupo de plantas superiores que desenvolveu uma ampla associação simbiótica com bactérias fixadoras. Por esta característica, facilidade de obtenção de nitrogênio em termos de disponibilidade no ambiente, acumulam grande quantidade de proteína em seus órgãos, que são utilizados como fonte de proteína em toda a base da cadeia alimentar, além de ser fonte de nitrogênio inorgânico para outros vegetais, pela decomposição de sua matéria orgânica. Desta maneira, as leguminosas constituem uma das mais importantes famílias de plantas agrícolas, sendo uma importante fonte de proteína para as populações mais carentes do planeta podendo ser consumidas diretamente, utilizadas na alimentação de animais domésticos, como adubo para outras culturas no processo de adubação verde ou em consórcio com outras espécies (Udvardi et al., 1992).

Em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio mineral no ambiente, as bactérias do grupo do *Rhizobium*, vivendo saprofiticamente, infectam o sistema radicular de leguminosas, estabelecendo uma relação simbiótica. Nesta associação o N₂ atmosférico, de baixa reatividade, é reduzido a amônia em condições bioquímicas especiais. É necessário a presença do complexo enzimático nitrogenase, produzido pela bactéria, de um ambiente sub-celular com baixa concentração de oxigênio, obtida pela estrutura de parede do nódulo radicular, a presença de leg-hemoglobina e disponibilidade de forte redutor bioquímico. Estas condições são todas encontradas nos nódulos funcionais do sistema radicular de leguminosas, resultado da interação simbiótica. A amônia, produto final da redução de N₂ pelo complexo nitrogenase, é liberada no citoplasma e assimilada pelo sistema GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamina oxoglutarato amidatransferase ou glutamato sintase). Glutamina sintetase é localizada nos cloroplastos e citoplasma de folhas e no citoplasma de células de raízes (Oaks & Hirel, 1985) e a glutamato sintase é localizada nos cloroplastos de folhas (Mifflin & Lea, 1980) e em plastídeos nas raízes (Emes & Fowler, 1979). A partir destes primeiros compostos nitrogenados, glutamina e glutamato, todos os demais compostos orgânicos nitrogenados são produzidos pela ação de transaminases. Desta maneira, a folha e o sistema radicular são a principal fonte de nitrogênio para os drenos, sítios de alta demanda.

Por outro lado, quando existe disponibilidade de nitrogênio mineral no solo, via de regra, a leguminosa não estabelece a associação simbiótica, passando a absorver o nitrogênio disponível no solo. No caso de nitrato, o mesmo deve ser reduzido a amônia pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase e, ao final, assimilada pelo sistema GS/GOGAT.

Existem evidências de que quando a planta nodulada é colocada para “escolher” entre N combinado e N₂ da fixação, a primeira forma é “preferida”, e dessa maneira, ocorre aumento no nível de N combinado, substituindo a fixação de N₂ pelo N combinado (Oghoghorie & Pate, 1971; Wery et al., 1986).

Apesar das duas vias, absorção de nitrogênio mineral e fixação biológica, terem como produto final a amônia, em leguminosas tropicais, especialmente as integrantes da tribo Phaseolae, ocorrem mudanças profundas no metabolismo de nitrogênio dependendo da fonte primária. Conforme observado por vários pesquisadores (Matsumoto et al., 1977; Pate et al., 1979, 1980; Paterson & Larue, 1983; McNeil & Larue, 1984), a presença de N inorgânico no meio radicular decresce a proporção relativa de N orgânico na seiva do xilema, ocorrendo ainda mudança de ureídeos para amidas, o que parece estar ligado a economia de energia, uma vez que, em termos globais, mais energia é requerida para fixar N_2 do que para utilizar NO_3^- (Becana & Sprent, 1987). Portanto, via de regra, (no caso das leguminosas da tribo Phaseolae, principalmente) quando a amônia provém da associação simbiótica, os produtos nitrogenados exportados para a parte aérea, via xilema, são ureídeos; por outro lado, quando provém da redução assimilatória do nitrato, os produtos exportados são as amidas, principalmente asparagina e glutamina (Schubert, 1986). Estas alterações têm sido utilizadas para avaliar a participação da associação simbiótica no balanço total de nitrogênio no vegetal através da abundância relativa de ureídeos (RUA) na seiva do xilema (McClure et al., 1980; Sanzalferez & Delcampo, 1994; Alves et al., 2000). Por outro lado, para as leguminosas que não produzem ureídeos, os produtos exportados são as amidas (Asn e Gln) tanto no caso da assimilação do nitrato como da fixação de nitrogênio (Amarante et al., 2006).

Esta mudança preferencial pelo metabolismo de nitrato em detrimento à associação simbiótica é desfavorável à utilização econômica das leguminosas; o ideal seria que fossem insensíveis, ou com pouca sensibilidade. Desta maneira, teria-se uma entrada mais constante de nitrogênio no sistema agrícola, uma maior eficiência nas associações culturais entre leguminosas e plantas de outras famílias botânicas e uma redução substancial na necessidade de adubos nitrogenados industriais na agricultura.

Em vários trabalhos identificou-se a existência de plantas com maior tolerância à presença de nitrato (Chalk, 1998; Michaelson-Yeates et al., 1998), isto é, que não "abandonam" a fixação simbiótica ou o fazem mais lentamente, e que esta característica é genética e pode ser melhorada por vários métodos, tendo sido o assunto revisado por Herridge & Rose (2000).

Um dos aspectos de relevância é o estudo de mutantes que apresentam hipernodulação; Lee et al. (1991) estudando mutantes de soja que hipernodulam, observaram que um dos fatores de inibição da nodulação é transportado da parte aérea para a raiz, parecendo ser o determinante da regulação da nodulação. Gordon et al. (1997) relacionaram ainda que a fixação é severamente inibida por fatores ambientais como seca, salinidade e aplicação de nitrato. Aparentemente, a senescência do nódulo envolve mudanças nas concentrações endógenas de espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes (Groten et al., 2005), existindo uma forte correlação positiva entre atividade de nitrogenase e conteúdo de ascorbato e glutatona no nódulo, que reduzem durante a senescência.

Vários autores sugerem que a sensibilidade do sistema de fixação em resposta à seca está relacionado ao acúmulo de ureídeos em tecidos, folhas e nódulos (Sinclair et al., 2003; Purcell et al., 2004, King & Purcell, 2005). Esta hipótese sugere que o aumento de ureídeos ou aminoácidos em folhas ou nódulos coincide com a redução na fixação de nitrogênio e que a recuperação da fixação depende do reestabelecimento da concentração inicial dos compostos nitrogenados que regulam a fixação (King & Purcell, 2005). King & Purcell (2005) trabalhando com cultivares de soja tolerantes e suscetíveis à seca em relação à fixação, observaram que no cultivar Jackson, tolerante, os ureídeos em folhas se mantêm baixos; no entanto, o cultivar KS4895 apresentava altos teores de ureídeos em folhas ou asparagina em nódulos, e a fixação não foi inibida.

O mecanismo metabólico que leva à preferência do nitrato em relação à fixação simbiótica e os mecanismos que proporcionam tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato no meio não são conhecidos, sendo o ponto chave para a obtenção de leguminosas capazes de se manterem em associação simbiótica efetiva, mesmo em ambiente com disponibilidade de nitrato. Em soja, nitrato atua como o fator primário controlando a fixação de N_2 (Wu & Harper, 1991); em feijão a formação de nódulos é altamente afetada por nitrato (Leidi & Rodríguez-Navarro, 2000).

A presença de nitrato reduz o crescimento de nódulos em *Vigna subterranea*, no entanto em exposição a baixos níveis de nitrato, menores que 5 mM, o crescimento não é inibido; já concentrações superiores a 15 mM levam à senescência do nódulo, aliado à redução nos teores de ureídeos em seiva de xilema (Dakora et al., 1992); por outro lado, há relatos da indução de atividade de NR em bacterioides (Giannakis et al., 1988).

Serraj et al. (1992) relataram que o mecanismo de inibição da nodulação por nitrato e a tolerância ao nitrato são regulados por fatores translocados a partir da parte aérea. Relataram ainda que ocorre incremento na atividade de nitrato redutase em nódulos de soja após a aplicação de nitrato, sendo que parece haver correlação entre atividade de NR e inibição da fixação por nitrato, no entanto os mecanismos não são claramente definidos. Heckmann et al. (1989) propõe que a redução de nitrato por atividade de NR citossólica culmina com a inibição da fixação, sendo esta afirmação corroborada por dados apresentados por Serraj et al. (1992).

2.3 Absorção, transporte e redução de nitrato em plantas superiores

O nitrogênio é, ao lado do dióxido de carbono, o nutriente necessário em maior abundância pelas plantas superiores (Tischner, 2000), sendo entre todos os elementos minerais requeridos pelas plantas, o mais limitante ao crescimento, em termos de disponibilidade no

ambiente (Willians & Miller, 2001), já que, além de sua concentração no solo ser muito baixa, há perda por lixiviação e consumo microbiano.

Apenas poucas espécies de plantas (em sua maioria leguminosas) podem estabelecer uma relação de simbiose com procariotos que possuem a capacidade de fixar N_2 atmosférico. Por esta razão, as plantas tem desenvolvido mecanismos de resistência ao baixo suprimento de nitrogênio, o que inclui sistemas sensíveis e seletivos de absorção e transporte, bem como a possibilidade de crescimento utilizando diferentes fontes de nitrogênio. Isto envolve o desenvolvimento de um sistema de passos regulatórios na via de assimilação de nitrogênio e sua integração com a assimilação de carbono, de forma a manter um balanço carbono/nitrogênio para um crescimento ótimo (Tischner, 2000). Entre as várias fontes de nitrogênio disponível inclui-se a amônia, a qual é utilizada em condições especiais de solo, como baixa aeração; os aminoácidos, consumidos por plantas de áreas onde a nitrificação e mineralização são limitadas pelo clima (regiões árticas); e nitrato, o qual é a forma mais comum de nitrogênio disponível.

O nitrato é absorvido pelas raízes e pode então ser reduzido ou armazenado nos vacúolos, ou translocado para a parte aérea, onde será reduzido ou armazenado nos vacúolos foliares. O primeiro passo da redução de nitrato ocorre no citossol e envolve a ação da enzima nitrato redutase (NR), produzindo nitrito, o qual adentra os plastídeos, cloroplastos em folhas sendo reduzido a amônia por ação da enzima nitrito redutase (NiR), a qual é fixada via GS/GOGAT em aminoácidos, glutamina e glutamato, que por sua vez servem de substrato para reações de transaminação, para a produção de todos os outros aminoácidos necessários à síntese de proteínas. Em tabaco, a assimilação de nitrato mostra-se estritamente correlacionada com o transporte de nitrato, assimilação de amônia e síntese de aminoácidos, além da síntese

de açúcares em folhas (Stitt et al., 2002), mostrando forte correlação da síntese de açúcares em função da absorção e redução de nitrato.

No caso de amônia como fonte de nitrogênio, esta é imediatamente incorporada a aminoácidos nas raízes. Entretanto, tem sido relatada que concentrações de amônia da ordem de milimolar são encontradas em seiva de xilema em *Brassica napus* (Finnemann & Schjoerring, 1999) e cevada (Mattson & Schjoerring, 1996), em plantas crescendo com amônia como fonte de nitrogênio. A glutamina é o composto nitrogenado preferencialmente transportado para a parte aérea na maioria das plantas supridas por amônia.

2.3.1 Absorção e transporte de nitrato

O nitrato não se constitui apenas em fonte de suprimento de nitrogênio, mas age também como sinalizador para vários processos celulares (Crawford, 1995). A indução de enzimas envolvidas na assimilação de nitrato é apenas um dos mecanismos estimulados pela presença de nitrato. Tem sido demonstrado que o metabolismo de carboidratos é diretamente afetado pela presença de nitrato o qual altera a relação entre síntese de amido e síntese de sacarose, em benefício deste último, tendo como resultado final a produção de ácidos orgânicos, como oxoglutarato, que estão diretamente envolvidos na assimilação de amônia via GS/GOGAT.

A capacidade de absorção e transporte de nitrato não é eqüitativamente distribuída ao longo do eixo da raiz e não é idêntica em raízes de idades diferentes (Lazof et al., 1994), sendo que raízes mais velhas absorvem e transportam nitrato mais ativamente, e possuem atividade reduzida de nitrato redutase, o que é considerado um indicador de aumento na translocação de nitrato destas raízes para a parte aérea (Jiao et al., 2000). De forma geral, em concentrações baixas de suprimento de nitrato, a redução ocorre preferencialmente nas raízes, enquanto em altas concentrações o armazenamento e transporte para a parte aérea são auxiliares na manutenção do *status* de nitrogênio da planta (Agrell et al., 1997). A absorção e o transporte

do meio externo para a raiz depende da concentração externa de nitrato, considerando que o transporte via xilema depende da demanda da parte aérea e do conteúdo de compostos nitrogenados reduzidos presentes no floema (Saravitz et al., 1998).

O transporte e a assimilação de nitrato são diretamente regulados por variações na concentração de glutamina (Gojon et al., 1998) ou, ainda, pelo incremento na concentração total de aminoácidos solúveis que não o acúmulo de um aminoácido específico (Barneix & Causin, 1996; Padgett & Leonard, 1996). O mecanismo de transporte de nitrato é sugerido como um co-transporte, via membrana, H^+ /nitrato (Ullrich, 1987), sendo que K^+ é necessário para manter o balanço de cargas no ambiente celular. O incremento na concentração de CO_2 atmosférico também afeta o metabolismo de nitrato, assim como, a temperatura radicular afeta a absorção e o transporte. Outro fator ambiental que afeta a absorção e transporte de nitrato é a presença do poluente NO_2 , o qual adentra a planta via cutícula ou estômato, resultando em um incremento na concentração de nitrato e redução da concentração de compostos nitrogenados reduzidos, sendo então transportado para a raiz via floema, inibindo a absorção e o transporte de nitrato (Tischner et al., 1988).

A cinética de absorção do NO_3^- em cevada sugere a existência de três sistemas distintos, cada um com seu K_m . Um sistema, aparentemente constitutivo, é de baixa afinidade (K_m alto) e funciona apenas em concentrações elevadas de nitrato. Os outros dois são de alta afinidade e operam com eficiência quando a concentração externa de nitrato é baixa. Um destes dois últimos sistemas (K_m para $NO_3^- = 7 \mu M$) é constitutivo, enquanto o outro (K_m para $NO_3^- = 15$ a $34 \mu M$) é induzido pelo nitrato. A indução pode ser demonstrada experimentalmente, bastando simplesmente medir a absorção em baixas concentrações de nitrato após prévia exposição das raízes por tempo e concentrações crescentes do íon. As raízes induzidas dessa forma passam a absorver baixas concentrações de nitrato com maior velocidade em

comparação com as plantas não-induzidas. O significado desses três mecanismos distintos de absorção é a adaptação da planta para ambientes pobres ou ricos em NO_3^- (Sodek, 2004).

2.4 Aspectos fisiológicos da enzima nitrato redutase (NR)

A enzima nitrato redutase (NR) catalisa o primeiro passo na via de redução de nitrato e está localizada no citossol, entretanto há evidências de que NR pode ser encontrada também na superfície externa da membrana plasmática (Tischner, 2000). A reação leva à formação de nitrito e necessita de NADH ou NADPH, ou ambos, como doador de elétrons. Em plantas superiores, a enzima é um dímero, possuindo, entre outros domínios, um cofator MoCo (molibdênio-cobalto), que não está exclusivamente presente em NR, o qual tem sua síntese afetada por variações no suprimento de nitrogênio e salinidade (Sagi et al., 1997).

A atividade de NR é aceita como o passo limitante da via de assimilação de nitrato, sendo induzida pela presença de nitrato, sendo que esta indução requer luz quando em tecidos verdes. Entretanto, há evidências de que há repressão de síntese quando amônia é utilizada como fonte de suprimento de nitrogênio ou quando há aumento na concentração interna de compostos nitrogenados orgânicos. A presença de nitrato não é pré-requisito absoluto para a síntese de NR, tendo sido demonstrado que exposições a baixas concentrações de nitrato são suficientes para sua indução e que o fluxo de nitrogênio ou o *status* de nitrogênio da planta controlam sua expressão (Tischner, 2000).

Nitrato redutase é considerada como sendo um dos melhores exemplos de enzima induzida pelo substrato em plantas superiores, sendo que para a maioria das espécies sua atividade é baixa ou indetectável na ausência de nitrato no meio externo. No grupo das leguminosas, atividade de nitrato redutase constitutiva (não induzida) pode ser mensurada em espécies da família Fabaceae (Andrews et al., 1990; Aidar et al., 2003). Verificou-se que esta atividade foi pronunciada em folhas, caule e raiz de membros da tribo Loteae e em folhas de

todas as espécies, até então estudadas, da tribo Phaseoleae (*Cajanus cajan*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, etc), tanto na forma dependente de NADH como de NADPH como doador de elétrons. Em alguns casos, a atividade de nitrato redutase constitutiva foi detectada em caule, raiz e cotilédones de membros da tribo Phaseoleae porém foi sempre mais baixa que nas folhas da respectiva espécie (Andrews et al., 1990).

A síntese de NR é induzida pela exposição à luz vermelha e este efeito é revertido por luz vermelho extremo e vice-versa, indicando o envolvimento de fitocromo na sua regulação (Sivasankar et al., 1997). A indução de NR é inibida pela presença de compostos nitrogenados reduzidos, como amônia, e a elevação na concentração de aminoácidos solúveis, como glutamina e asparagina, demonstram-se potenciais inibidores (Sivasankar & Oaks, 1995; Camargos et al., 2006). Mudanças na concentração total destes aminoácidos, pela utilização de inibidores de GS ou GOGAT evidenciam uma interação complexa destes inibidores com outros pontos da assimilação de nitrato (Sivasankar et al., 1997). A presença de uma forma ativa de GS e conseqüente aumento na concentração de glutamina, causam repressão de NR.

A luz é reconhecida por estimular rapidamente a atividade de NR, enquanto com a transferência da planta para o escuro, esta atividade decresce rapidamente. Evidências demonstram que a fosforilação está envolvida nesta modulação, sendo que duas ou três quinases dependentes de Ca^{2+} , com certa especificidade para NR, estão envolvidas (Tischner, 2000), de forma que a fosforilação por si só não altera a atividade de NR, mas requer a ligação de uma proteína, de tamanho estimado entre 67-100 kDa. Em folhas de milho, a regulação da atividade de NR a partir de sinais ligados à presença e à ausência de luz envolve expressão gênica, síntese de NR e fosforilação/desfosforilação desta.

Em eucariotos, a nitrato redutase é conhecida como sendo uma enzima citossólica em organismos autotróficos, entretanto, em *Thalassiosira*, Jones & Morel (1988) sugeriram a

presença de uma forma de NR localizada na membrana plasmática, atuando tanto como uma bomba de prótons trans-membrana, como com atividade de NR, aceitando elétrons extracelularmente. Uma função de NR ligada à membrana na assimilação de nitrato foi sugerida pelo uso de inibidores de transportadores de nitrato em raízes de cevada (Ward et al., 1989), detectando então redução de nitrato fora da célula. Uma forma de NR ligada à plasmalema tem sido descrita para raízes de milho, demonstrando a existência de duas isoformas, uma dependente de NADH e outra dependente de NADPH. A presença desta forma de NR foi relatada também em cevada, cenoura e tabaco estimando-se também uma função na destoxificação de excesso de nitrato, sendo que as funções propostas até o momento para esta forma de NR seriam de atuar como um sensor para luz azul, para nitrato e uma proteção ao excesso de nitrato externo (Tischner, 2000).

2.5 Aspectos relevantes da espécie *Calopogonium mucunoides*

Calopogonium mucunoides é uma leguminosa tropical típica de região de cerrados, originária da América do Sul, é muito utilizada em adubação verde e como forrageira, apresentando grande capacidade de produção de biomassa (Seiffert et al., 1985; Costa, 1995), tendo a atividade de nitrogenase com pico máximo no estágio de florescimento (Souza et al., 1996). Apresenta hábito de crescimento rasteiro e trepador, de ciclo perene. Demonstra alta eficiência na fixação de nitrogênio, havendo relatos de cultivo em solos de baixo pH e pouca fertilidade; possui boa resistência à seca, mas não tolera baixas temperaturas.

Poucos são os estudos acerca do metabolismo de nitrogênio em *C. mucunoides*, mas demonstram que a leguminosa apresenta alta abundância relativa de ureídeos (RUA) quando fixando nitrogênio (Izaguirre-Mayoral & Vivas, 1996), demonstrando, ainda, certa tolerância do mecanismo de fixação de nitrogênio à exposição ao nitrato. Na presença de nitrato a

atividade de NR em nódulos decai, atingindo valores próximos a zero (Camargos et al., 2005). Estudos preliminares demonstraram que, quando a leguminosa fixando nitrogênio é submetida a receber nitrato, a concentração de ureídeos exportados via xilema não é drasticamente reduzida, como nas demais leguminosas reportadas pela literatura, parecendo demonstrar, assim, certa tolerância do mecanismo de fixação de nitrogênio à exposição ao nitrato. Outro aspecto peculiar do metabolismo é o fato de ocorrer acúmulo de ureídeos em tecidos, quando recebendo nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia.

Este trabalho visa acrescentar informações importantes sobre o metabolismo em leguminosas tropicais, em particular de clima de cerrado.

3. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito das fontes de nitrogênio (nitrato, amônia e uréia) sobre a nodulação e a fixação em *Calopogonium mucunoides*, através de:

- em plantas cultivadas recebendo nitrogênio mineral antes da inoculação, avaliar a formação de nódulos e a fixação de nitrogênio, mediante análise dos principais compostos nitrogenados translocados pela planta;
- em plantas plenamente noduladas, avaliar o efeito sobre a fixação na presença de nitrogênio mineral, avaliando-se as principais alterações no metabolismo de compostos nitrogenados;
- em plantas plenamente noduladas, avaliar os efeitos da exposição ao nitrogênio mineral sobre a atividade das enzimas nitrogenase e nitrato redutase;
- avaliar o efeito da exposição ao nitrogênio sobre o metabolismo de aminoácidos, a fim de tentar estabelecer uma relação entre tolerância/resistência do mecanismo de N-fixação e metabolismo/transporte de aminoácidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Cultivo das plantas

Sementes comerciais de *Calopogonium mucunoides* foram obtidas junto à Pirai Sementes (Piracicaba, Estado de São Paulo). As sementes foram germinadas em rolos de papel filtro com base imersa em água, em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25° C, durante 7-10 dias. Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos de 4 litros, com vermiculita, e inoculadas com suspensão obtida a partir de macerado de nódulos coletados de plantas da mesma espécie. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em Três Lagoas – MS (20°45'42; 51°40'42; 319m), sem controle de fotoperíodo (com temperaturas mínimas de 18,2±1,9 °C, no mês de abril, e máximas de 36,8±2,9 °C, nos meses de dezembro a fevereiro). Foram realizados cultivos entre os períodos de agosto a abril, uma vez que entre abril e maio as plantas iniciam o florescimento, como resposta à redução no fotoperíodo, o que estimula a reprodução nesta espécie.

4.1.1.1 Soluções Nutritivas

Foram preparadas duas soluções baseadas na solução de Hoagland e Arnon (1938), uma contendo NO_3^- (+ NO_3^-), 10 vezes concentrada, e outra sem NO_3^- (-N), conforme abaixo:

Solução + NO_3^- : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (50 mM); KNO_3 (50 mM); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mM); KH_2PO_4 (10 mM); H_3BO_3 (0,46 mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,091 mM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,65 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,20 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

Solução -N: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2mM); 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 (0,46 mM); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,091 mM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7,65 μM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3,20 μM); H_2MoO_4 (0,56 μM).

As duas soluções foram preparadas com macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro. O ferro foi adicionado à solução $+\text{NO}_3^-$ ou $-\text{N}$ apenas no momento de se aplicar a solução às plantas. Para isso, acrescentou-se à solução $+\text{NO}_3^-$ (após diluída 10x) ou $-\text{N}$, 1 ml/L, de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (33,2 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25 g/L) e NaOH (3,65 g/L).

Aos tratamentos $+\text{NH}_4^+$ e +Uréia foram fornecidas solução $-\text{N}$ acrescido de sulfato de amônio e uréia, respectivamente, como fonte de N.

4.1.2 Experimentação

4.1.2.1 Efeito do nitrogênio mineral na nodulação

As plantas passaram a receber solução nutritiva contendo nitrogênio logo após a transferência para vasos, tendo como base a solução nutritiva de Hoagland, na forma de nitrato (NO_3^- 15 mM), amônia (NH_4^+ 15 mM) e uréia (uréia 15 mM) (ver 4.1.1.1), a uma concentração de 15 mM de nitrogênio, antes da realização da inoculação. Os tratamentos foram realizados duas vezes por semana, onde foram fornecidos 100 ml de solução nutritiva por vaso; as plantas foram mantidas por um período de aproximadamente 45 dias, sendo coletadas em fase adulta, em estágio vegetativo. Plantas controle foram mantidas recebendo solução nutritiva sem adição de nitrogênio (sem N).

4.1.2.2 Efeito do nitrogênio mineral na fixação

As plantas foram mantidas em condições de nodulação plena, recebendo 100 ml de solução nutritiva sem nitrogênio por vaso, duas vezes por semana. Plantas plenamente noduladas, com cerca de 30-40 dias de cultivo, em estágio vegetativo, passaram a receber nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia, a depender do experimento em questão, a uma concentração de 15 mM de nitrogênio mineral. As plantas controle foram mantidas recebendo solução nutritiva sem presença de nitrogênio mineral.

Efeito do tempo de exposição ao nitrogênio mineral

As plantas foram mantidas recebendo 15 mM de nitrogênio mineral na forma de nitrato por 21 dias, com duas aplicações de solução nutritiva por semana, sendo cada aplicação de 100 ml de solução nutritiva por vaso. Em um segundo experimento, as plantas foram mantidas recebendo nitrogênio mineral por 5 dias, com duas aplicações de solução nutritiva contendo 15 mM de nitrogênio nas formas de nitrato e amônia (dia 0 e dia 4), sendo a coleta realizada no 5º dia. Estes experimentos tiveram como objetivo inicial verificar qual tempo de exposição ao nitrogênio mineral seria ideal para se obter resposta metabólica, sem, no entanto, afetar os parâmetros de crescimento. A partir dos mesmos, os experimentos subsequentes foram realizados com 5 dias de exposição ao nitrogênio mineral.

Efeito da concentração de nitrogênio mineral fornecida

As plantas foram mantidas recebendo nitrogênio mineral por 5 dias, com duas aplicações de solução nutritiva contendo nitrogênio nas formas de nitrato e amônia (dia 0 e dia 4), sendo a coleta realizada no 5º dia. Os tratamentos foram estabelecidos fornecendo-se concentrações crescentes de nitrogênio mineral (0, 5, 15 e 30 mM de nitrogênio mineral em solução), sendo a primeira aplicação de 500 ml e a segunda de 200 ml de solução nutritiva por vaso.

4.1.3 Coleta de material

A seiva do xilema foi extraída por exsudação, após corte transversal do caule, abaixo do primeiro nó caulinar, baseado na técnica descrita por McClure & Israel (1979), coletada e armazenada em microtubos, em freezer, para posteriores análises.

Os tecidos foram separados (folhas, caule, raiz, etc) e armazenados em freezer para posteriores análises de compostos nitrogenados.

Análises de atividade de nitrato redutase *in vivo*, alantoinase *in vitro*, e de nitrogenase foram conduzidas com as plantas intactas.

4.2 Extração de compostos nitrogenados para quantificação e análise qualitativa de aminoácidos

Através do método descrito por Bielecki & Turner (1966) os compostos nitrogenados foram extraídos para as análises posteriores.

Para 1g de material fresco, acrescentaram-se 10 ml de solução MCW (60% metanol, 25% clorofórmio, 15% H₂O). O material foi triturado com auxílio de um homogeneizador de tecidos tipo Polytron e em seguida centrifugado. Após centrifugação, acrescentaram-se 1 ml clorofórmio + 1,5 ml H₂O, para cada 4 ml sobrenadante, e agitou-se vigorosamente em funil de separação. Aguardou-se a separação de fases e utilizou-se a fase hidrossolúvel para análise de compostos nitrogenados (aminoácidos, ureídeos, amônia e nitrato).

O precipitado foi ressuspenso em solução NaOH 0,1 M, a uma relação de 10 ml de solução para cada grama de amostra (tecido fresco); após homogeneização, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para quantificação de proteínas.

4.3 Quantificação de compostos nitrogenados

4.3.1 Análise Quantitativa de Aminoácidos

Foi utilizado o método de Yemm & Cocking (1955) para quantificar-se as variações na concentração de aminoácidos solúveis totais presentes nos diferentes tecidos e em seiva de xilema da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

Do extrato de tecido ou seiva de xilema devidamente diluídos em água, em volume de 1 ml, juntou-se 500 µl tampão citrato e 200 µl solução ninhidrina 5% em éter monometílico de etilenoglicol + 1 ml solução KCN 0,0002 M. O ensaio foi aquecido a 100° C (banho-maria com água fervente) por 20 minutos e, após, resfriado por 10 minutos em água corrente. Acrescentou-se 1 ml de álcool etílico 60%, seguindo-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 570$ nm.

A concentração de aminoácidos solúveis totais foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução leucina (de 0 a 0,6 µmoles).

4.3.2 Análise Quantitativa de Ureídeos (Alantoína e Ácido Alantóico)

Foi utilizado o método de Vogels & Van Der Drift (1970) para quantificar-se as variações na concentração de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) presentes nos diferentes tecidos e em seiva de xilema da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

O ensaio consiste em duas fases:

Fase 1: Em tubos de ensaio, adicionou-se 1 gota de fenilhidrazina, 250 µl da amostra, 500 µl H₂O destilada e 250 µl de NaOH 0,5 M. O ensaio foi aquecido em banho-maria a 100° C durante 8 minutos e, em seguida, resfriado à temperatura ambiente. Nesta fase (hidrólise

alcalina) a alantoína é hidrolisada a ácido alantóico. Caso haja omissão desta fase no método, a análise indicará apenas a existência ou não de ácido alantóico.

Fase 2: Foi adicionado 250 µl de HCl 0,65 N e novamente aquecido a 100 °C durante 4 minutos, (hidrólise ácida) quando ocorre a hidrólise do ácido alantóico para glioxilato. O ensaio foi resfriado à temperatura ambiente e, então, foi adicionado 250 µl de tampão fosfato pH 7,0 0,4 M e 250 µl de solução de fenilhidrazina 0,33%. Após 5 minutos à temperatura ambiente, incubou-se o ensaio em banho de gelo por 5 minutos.

Acrescentou-se 1,25 ml de HCl concentrado previamente gelado e 250 µl de solução de ferrocianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 1,65%.

Retirou-se do banho de gelo e, após 15 minutos à temperatura ambiente, seguiu-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 535$ nm. A concentração de ureídeos foi estimada com base em curva padrão de solução alantoína (de 0 a 125 nanomoles).

4.3.3 Análise Quantitativa de Nitrato

Foi utilizado o método de Cataldo et al. (1975) para quantificar-se as variações na concentração de nitrato presente nos diferentes tecidos e em seiva de xilema da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

Do extrato de tecido ou seiva de xilema devidamente diluídos em água, em volume de 0,1 ml adicionou-se 0,4 ml ácido salicílico 5% em H_2SO_4 (p/v). Após 20 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se 9,5 ml de NaOH 2N, lentamente. Após resfriar a temperatura ambiente, seguiu-se a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 410$ nm. A concentração de nitrato foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução nitrato.(de 0 a 4 µmoles)

4.3.4 Análise Quantitativa de Amônia

Foi utilizado o método de McCullough (1967) para quantificar-se as variações na concentração de amônia solúvel presentes nos diferentes tecidos e em seiva de xilema da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

Do extrato de tecido ou seiva de xilema devidamente diluídos em água, em volume de 0,1 ml adicionou-se 0,5 ml de solução fenol (2,5 g fenol + 12,5 mg nitroprusiato de sódio em volume final de 250 ml) + 0,5 ml de solução fosfato (1,25 g NaOH + 13,4 g Na₂HPO₄.7H₂O + 2,5 ml NaOCl 5% em volume final de 250 ml). O ensaio é incubado por 1 hora a 37° C. Após, seguiu-se a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 630$ nm. A concentração de amônia foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução sulfato de amônia (de 0 a 0,1 μ moles).

4.3.5 Análise Quantitativa de Proteínas

Foi utilizado o método de Bradford (1976) para quantificar-se as variações na concentração de proteínas presentes nos diferentes tecidos e em diferentes estádios de desenvolvimento da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

Da fração hidróxido de sódio, à uma alíquota de 0,1 ml foi adicionado 5 ml de solução de Bradford. Após 5 minutos, seguiu-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 595$ nm. A concentração de proteínas foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução BSA (de 0 a 0,092 μ g).

4.4 Análise Qualitativa de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

Após a quantificação de aminoácidos solúveis totais, as amostras foram liofilizadas para remoção do solvente, ressuspendidas em água Milli-Q a uma concentração de 500 nmoles de aminoácidos/ml e filtradas em filtro Millipore 0,2 µm.

Os aminoácidos solúveis foram separados e analisados por HPLC de fase reversa como seus derivados de OPA (o-phthaldialdeído), baseado no método descrito por Jarret et al. (1986). Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-2 C18 e eluição em um gradiente linear formado pelas soluções de metanol 65 % e tampão fosfato pH 7,5 (50 mM de acetato de sódio, 50 mM de fosfato disódico, 1,5 ml de ácido acético, 20 ml de tetraidrofurano, 20 ml de metanol) num fluxo de 0,8 ml/min. O gradiente incrementou a proporção de metanol de 20 % a 28 % entre 0 e 5 min, de 28 % a 58 % entre 5 e 35 min, de 58 % a 75 % entre 35 e 40 min, 75 % a 95 % entre 40 e 56 min, 95 % a 96 % entre 56 a 60 min e 96 % a 100 % entre 60 e 61 min. O fluído da coluna foi monitorado por um detector de fluorescência Shimadzu (model RF350), operando em comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 480 nm. Os aminoácidos foram derivatizados utilizando-se 20 µl da amostra e 60 µl do reagente OPA. Após 2 minutos, foram injetados 20 µl no aparelho de HPLC. Os picos foram identificados com base em um padrão de aminoácidos Sigma (S-18) acrescido de asparagina, glutamina e Gaba. Os dados foram expressos em mol% (excluindo-se prolina e cisteína por não formarem um derivado estável com OPA).

4.5 Análise de Atividade Enzimática

4.5.1 Análise *in vivo* da atividade da enzima nitrato redutase (NR)

Utilizou-se o método descrito por Radin (1973) para avaliar-se a atividade da enzima nitrato redutase em diferentes tecidos da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

Coletou-se amostras de tecido fresco (1 g), que foram cortadas em pedaços menores, no caso de folhas e raiz, os quais foram colocadas em tubos contendo 10 ml de solução tampão fosfato pH 7,5 + KNO₃; as amostras foram infiltradas a vácuo para que a solução penetrasse nos tecidos. Incubou-se no escuro a 30° C, em banho-maria, por 1 hora. Alíquotas de 2 ml foram coletadas nos tempos 0' e 60', às quais foi acrescentado 1 ml de sulfanilamida 1% em HCl + 1 ml de solução naftil etileno 0,02%. Seguiu-se leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 540$ nm. A atividade da enzima NR foi determinada pela quantidade de nitrito produzida, utilizando-se curva padrão de solução nitrito (de 0 a 200 μ moles).

4.5.2 Análise *in vitro* da atividade da enzima alantoinase

Utilizou-se o método descrito por Gomes & Sodek (1984) para avaliar-se a atividade da enzima alantoinase, *in vitro*, em diferentes tecidos da leguminosa em questão, em plantas recebendo solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio.

Coletou-se amostras de tecido fresco (1 g), as quais foram masceradas, em gelo, em tampão de extração Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 1 mM de DTT. O mascerado foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos, a 2° C. Após centrifugação, o sobrenadante foi eluído em coluna Sephadex G-25 equilibrada com tampão de extração, para dessalinização.

O ensaio foi montado com volume final de 2 ml, contendo 0,5 ml de extrato + tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e 10 mM de alantoína. O ensaio foi incubado a 37° C por 30 minutos.

Foram retiradas alíquotas de 0,2 ml nos tempos 0 e 30, às quais foi adicionado 1 ml de HCl 32 mM para parar a reação e iniciar a hidrólise do ácido alantóico. Seguiu-se então a dosagem do ácido alantóico formado de acordo com o descrito por Vogels & Van der Drift (1970) (item 4.3.2, fase 2).

A atividade da enzima alantoinase foi determinada pela quantidade de ácido alantóico produzida, utilizando-se curva padrão de solução alantoína (ver dosagem de ureídeos).

4.5.3 Análise *in vivo* da atividade da enzima nitrogenase

Utilizou-se o método descrito por Hardy et al. (1975) para avaliar-se a atividade da enzima nitrogenase. A atividade da enzima nitrogenase foi avaliada, *in vivo*, através do método de redução de acetileno, onde o sistema radicular foi removido e acondicionado em frascos de vidro de aproximadamente 250 ml de volume, vedados com tampas de borracha. Introduziu-se 25 ml de acetileno nos frascos com uma seringa. Alíquotas de gás (0,5 mL) foram retiradas dos frascos com seringa e injetadas no cromatógrafo a gás para dosagem do etileno formado. O etileno foi dosado utilizando um sistema de cromatografia gasosa Shimadzu GC 148 ligado a um registrador Shimadzu Cromatopac C-R6A. Após testes iniciais, estabeleceu-se o tempo total de 1 hora, com medidas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

A atividade da enzima nitrogenase foi determinada pela quantidade de etileno produzida, utilizando-se um padrão de etileno (10 ppm) como referência.

4.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram apresentados representando a média de três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do Nitrogênio sobre a nodulação

As plantas foram cultivadas recebendo nitrogênio em solução antes da realização da inoculação (após a transferência para vasos). Os tratamentos foram estabelecidos da seguinte maneira: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N), plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM), plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de amônia (NH_4^+ 15 mM) e plantas recebendo solução nutritiva com 15 mM de uréia (uréia 15 mM), sendo mantidas recebendo estas soluções por um período aproximado de 6 semanas, ao que procedeu-se a coleta. Com isto, observou-se se o nitrogênio fornecido influenciou na nodulação (estabelecimento da relação simbiótica) tendo em vista a hipótese de que, em presença de nitrogênio no meio, ocorre inibição no estabelecimento da relação simbiótica.

Quando as plantas receberam nitrogênio antes e durante o período de nodulação, observou-se que o tratamento influenciou no número de nódulos presentes por planta, onde plantas recebendo nitrato (NO_3^- 15 mM) apresentaram menor número de nódulos, com uma média de 73 nódulos por planta, enquanto plantas que não receberam nitrogênio (sem N) e plantas que receberam amônia (NH_4^+ 15 mM) apresentaram maior número de nódulos por planta, acima de 140, não diferindo estes dois tratamentos entre si. Apesar do número menor de nódulos na presença de nitrato, nenhuma das fontes de nitrogênio aparentemente inibiu a nodulação, pois não houve diferença significativa na massa total dos nódulos, entre os tratamentos. Pode-se inferir que plantas que receberam nitrato (NO_3^- 15 mM) apresentaram menor número de nódulos, mas nódulos maiores, uma vez que não observou-se variação

significativa tanto para massa fresca (MF) quanto para massa seca (MS), entre os tratamentos (tabela 1).

A fonte de nitrogênio mostrou influenciar o crescimento das plantas, uma vez que plantas que receberam amônia (NH_4^+ 15 mM) apresentaram maior massa fresca e massa seca de folhas (32,38 e 8,46 g, respectivamente), diferindo dos demais tratamentos. O tratamento NH_4^+ 15 mM também apresentou maior massa fresca e massa seca de raiz, não diferindo apenas de plantas que receberam uréia (uréia 15 mM), mas ambos os tratamentos diferindo dos outros dois tratamentos (tabela 1).

Em se tratando de uma espécie de cerrado onde, por questões de baixo pH de solo, a forma mineral de nitrogênio mais comum no solo é a forma amoniacal, a resposta de crescimento ao tratamento com amônia pode indicar maior adaptabilidade para metabolizar esta forma de nitrogênio mineral, em detrimento, por exemplo, de nitrato. Já o fato de o tratamento uréia 15 mM apresentar maior massa de raiz do que os tratamentos NO_3^- 15 mM e sem N, uma vez que não houve variação na massa de folhas entre estes três tratamentos, aparentemente não tem uma explicação, considerando-se que não houve, por exemplo, variação na massa de nódulos.

Tabela 1: Influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre nodulação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema e em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. As plantas foram expostas à presença de nitrogênio antes da inoculação e cultivadas com a mesma solução durante 6 semanas. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tratamento	Aminoácidos	Ureídeos Totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Nitrato	Amônia	Proteína	Atividade da Nitrato Redutase	Atividade da Alantoinase	Massa Fresca	Massa Seca	Número de Nódulos
Folhas			$\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$				$\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$	$\mu\text{mol produto.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$		g.plant^{-1}		
sem N	22.17 A	4.74 A	2.03 A	2.7 AB	1.2 B	0.01 A	0.28 B	14.1 B	11.12 B	11.07 B	2.69 B	
NO_3^- 15 mM	9.12 B	5.01 A	2.76 A	2.24 AB	27.7 A	0.01 A	0.67 A	100.97 A	19.84 A	16.52 B	4.4 B	
NH_4^+ 15 mM	7.16 B	3.28 A	2.14 A	1.14 B	0.05 B	0.01 A	0.86 A	6.1 B	23.04 A	32.38 A	8.46 A	
uréia 15 mM	13.87 B	5.11 A	1.91 A	3.2 A	2.4 B	0.01 A	0.99 A	6.04 B	14.46 B	21.13 B	5.43 B	
Raiz												
sem N	6.95 A	6.28 A	3.68 B	2.45 A	0.94 B	0.01 A	0.64 B	0.4 B	3.75 B	16.81 B	1.94 B	
NO_3^- 15 mM	8.03 A	5.87 B	3.63 AB	2.24 A	2.09 A	0.01 A	0.61 B	20.37 A	6.48 B	23.31 B	2.61 B	
NH_4^+ 15 mM	6.51 A	6.51 A	4.37 A	2.14 A	0.1 B	0.01 A	0.58 B	8.66 B	17.38 A	44.6 A	5.14 A	
uréia 15 mM	6.63 A	5.74 B	3.42 B	2.32 A	2.05 A	0.01 A	1.05 A	5.41 B	8.45 B	31.08 A	3.63 A	
Nódulos												
sem N	15.98 B	12.31 B	3.94 B	8.36 B	0.64 A	0.01 A	1.65 A	0.16 A	5.49 B	1.07 A	0.18 A	160 A
NO_3^- 15 mM	25.24 A	14.62 A	4.81 AB	9.61 A	0.1 A	0.01 A	1.5 A	0.13 A	6.72 B	1.08 A	0.17 A	73 B
NH_4^+ 15 mM	21.86 A	15.19 A	5.6 AB	9.69 A	0.73 A	0.01 A	2.09 A	0.48 A	6.25 B	2.09 A	0.31 A	146 A
uréia 15 mM	16.77 B	14.75 A	6.92 A	7.83 B	0.38 A	0.01 A	1.97 A	1.16 A	10.05 A	1.68 A	0.23 A	103 AB
Seiva de Xilema			$\mu\text{mol.mL}^{-1}$									
sem N	5.65 A	1.72 B	0.22 B	1.50 A	0.01 B	0.01 A						
NO_3^- 15 mM	5.77 A	2.70 A	1.43 A	1.27 A	10.3 A	0.01 A						
NH_4^+ 15 mM	3.75 B	1.64 B	0.46 B	1.18 A	0.01 B	0.01 A						
uréia 15 mM	5.9 A	1.65 B	0.34 B	1.31 A	0.01 B	0.01 A						

Plantas que receberam nitrato em solução (NO_3^- 15 mM) apresentaram os maiores teores de ureídeos totais e de alantoína em seiva de xilema (2,70 e 1,43 $\mu\text{moles/ml}$), diferindo significativamente dos demais tratamentos. Aparentemente, o tratamento NO_3^- 15 mM interfere na forma de ureídeo translocado via xilema, uma vez que, neste tratamento, os teores de alantoína foram muito superiores aos dos demais tratamentos (1,43 $\mu\text{moles/ml}$, enquanto os demais tratamentos estiveram em torno de 0,22 a 0,46 $\mu\text{moles/ml}$). No entanto, não observou-se variação significativa nos teores de ácido alantóico translocados via xilema, estando entre 1,18 $\mu\text{moles/ml}$ (NH_4^+ 15 mM) e 1,50 $\mu\text{moles/ml}$ (sem N).

Considerando-se a presença de ureídeos em seiva de xilema como indicador do *status* de nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico pela planta, não é possível explicar o fato de plantas recebendo nitrato apresentarem maiores teores de ureídeos em seiva de xilema, uma vez que, embora não tenha sido observada variação significativa na massa fresca de nódulos entre os tratamentos, o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou o menor número de nódulos, mas, por outro lado, apresentou os maiores teores de ureídeos totais em seiva de xilema (tabela 1). No entanto, o fato de todos os tratamentos apresentarem altos teores de ureídeos em seiva de xilema corrobora a hipótese de que a presença de nitrogênio no meio não afeta a nodulação e a fixação em *Calopogonium mucunoides*.

Os teores de ureídeos presentes nos tecidos não indicam grande variação em função da fonte de nitrogênio, uma vez que os teores de ureídeos totais são elevados em todos os tratamentos para todos os tecidos avaliados e, nos casos em que há variação significativa, esta não ocorre de maneira tão expressiva.

Em folhas, não houve variação significativa nos teores de ureídeos totais, entre os tratamentos, variando entre 3,28 a 5,11 $\mu\text{moles/gMF}$; já em raiz, os tratamentos NO_3^- 15 mM e

uréia 15 mM apresentaram valores ligeiramente menores que os demais tratamentos, diferindo significativamente de 6,28 e 6,51 $\mu\text{moles/gMF}$, nos tratamentos sem N e NH_4^+ 15 mM, para 5,87 e 5,74 $\mu\text{moles/gMF}$, para os tratamentos NO_3^- 15 mM e uréia 15 mM, respectivamente. Nos nódulos, plantas que receberam solução nutritiva sem nitrogênio apresentaram teores pouco menores, embora a diferença seja significativa, de ureídeos totais do que os demais tratamentos (12,31 $\mu\text{moles/gMF}$, enquanto os demais tratamentos estiveram em torno de 15 $\mu\text{moles/gMF}$, não diferindo significativamente entre si).

Em folhas, não houve variação significativa nos teores de alantoína, estando em torno de 1,9 a 2,7 $\mu\text{moles/gMF}$. Em relação a ácido alantóico, o tratamento NH_4^+ 15 mM apresentou os menores teores (1,14 $\mu\text{moles/gMF}$), enquanto o tratamento uréia 15 mM apresentou teores bem mais elevados (3,2 $\mu\text{moles/gMF}$). Os demais tratamentos apresentaram teores intermediários desta forma de ureídeo (de 2,24 a 2,7 $\mu\text{moles/gMF}$) (tabela 1).

Em raiz, os maiores teores de alantoína foram observados em plantas que receberam amônia (NH_4^+ 15 mM), que apresentou 4,37 $\mu\text{moles/gMF}$, enquanto os tratamentos sem N e uréia 15 mM apresentaram teores ligeiramente menores, mas diferindo significativamente dos demais tratamentos (3,68 e 3,42 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente). Não observou-se variação significativa para os teores de ácido alantóico em raiz, estando em torno de 2 $\mu\text{moles/gMF}$. Esta baixa variação nos teores de ureídeos e mesmo na forma presente no tecido não é suficiente para afirmar que houve redução/aumento na síntese ou degradação, mas observa-se que a fonte de nitrogênio fornecida à planta não altera a concentração total de ureídeos presentes no tecido, ou o faz muito discretamente.

Em nódulos, observou-se uma maior “variação” nos teores de alantoína e ácido alantóico presentes, uma vez que os tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM apresentaram os maiores teores de ácido alantóico (em torno de 9,6 $\mu\text{moles/gMF}$) enquanto o tratamento uréia 15 mM apresentou teores ligeiramente maiores de alantoína, 6,92 $\mu\text{moles/gMF}$. O tratamento sem N

apresentou teores significativamente mais baixos de alantoína e de ácido alantóico, embora esta variação seja pequena (tabela 1).

A fonte de nitrogênio afetou pouco o transporte de aminoácidos, de maneira que plantas que receberam amônia (NH_4^+ 15 mM) apresentaram os teores de aminoácidos um pouco abaixo dos demais tratamentos, em seiva de xilema (3,75 $\mu\text{moles/ml}$), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Em relação ao transporte de nitrato, só observou-se presença de nitrato em seiva de xilema de plantas que receberam tratamento com nitrato (NO_3^- 15 mM), da ordem de 10,3 $\mu\text{moles/ml}$, sendo que nos demais tratamentos foi próximo a zero. Ao contrário do nitrato, a presença de amônia no meio não promoveu seu transporte via xilema, não tendo sido observada a presença de amônia em seiva de xilema, em todos os tratamentos, indicando, portanto, que a amônia disponível foi toda metabolizada pelo sistema radicular. O fato de o tratamento NO_3^- 15 mM apresentar nitrato em seiva de xilema é um indicativo da importância da parte aérea no metabolismo desta forma de nitrogênio mineral, o que é, em parte, corroborado pela alta concentração de nitrato em folhas de plantas que receberam este tratamento (27,7 $\mu\text{moles/gMF}$), sendo que nos demais tratamentos os teores de nitrato em folhas foram muito baixos. Em raiz, plantas que receberam nitrato (NO_3^- 15 mM) e plantas que receberam uréia (uréia 15 mM) apresentaram os maiores teores de nitrato, cerca de 2 $\mu\text{moles/gMF}$, enquanto nos demais tratamentos os valores foram mais baixos, diferindo estatisticamente dos dois outros tratamentos. Já em nódulos, os teores de nitrato foram muito baixos, de 0,1 $\mu\text{moles/gMF}$, em plantas que receberam nitrato (NO_3^- 15 mM), a 0,73 $\mu\text{moles/gMF}$, em plantas que receberam amônia (NH_4^+ 15 mM), não havendo variação significativa entre os tratamentos. Estes teores observados para nitrato em raiz de plantas que receberam nitrato em solução (NO_3^- 15 mM), e também em nódulos, indicam que o acúmulo de nitrato se dá principalmente na parte aérea; por outro lado, o fato de o tratamento uréia 15

mM apresentar teores de nitrato similares ao tratamento NO_3^- 15 mM, em raiz, não apresenta explicação aparente, uma vez que o nitrato não foi disponibilizado a este tratamento.

O mesmo comportamento observado em seiva de xilema é válido para tecidos, no caso de amônia solúvel, onde não observou-se presença de amônia em todos os tecidos avaliados, em todos os tratamentos.

O tratamento sem N apresentou os maiores teores de aminoácidos solúveis em folhas (22,17 $\mu\text{moles/gMF}$), enquanto nos demais tratamentos esteve em torno de 7 a 13 $\mu\text{moles/gMF}$. Por outro lado, os teores de proteína total em folhas foram menores no tratamento sem N (0,28 mg/gMF), diferindo dos demais tratamentos onde os teores de proteína estiveram em torno de 0,67 a 0,99 mg/gMF. Em raiz, não houve variação significativa nos teores de aminoácidos solúveis, estando em torno de 6,51 a 8,03 $\mu\text{moles/gMF}$, enquanto para proteína total o tratamento uréia 15 mM apresentou teores ligeiramente maiores que os demais tratamentos (1,05 mg/gMF), diferindo significativamente dos demais; já em nódulos não houve variação significativa nos teores de proteína total entre os tratamentos e, quanto a aminoácidos solúveis totais os tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM apresentaram os maiores teores neste tecido (25,24 e 21,86 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente), diferindo dos outros dois tratamentos. Não observou-se um comportamento linear no acúmulo de aminoácidos e proteína nos tecidos, em resposta à fonte de nitrogênio, uma vez que cada tratamento apresentou valores maiores ou menores para um destes metabólitos em um dado tecido, não sendo possível portanto estabelecer uma relação direta entre assimilação de uma forma de nitrogênio (fonte) e acúmulo de aminoácidos e/ou de proteína.

A presença de nitrato em seiva de xilema no tratamento NO_3^- 15 mM, enquanto nos demais tratamentos esteve ausente, e presença de teores maiores de nitrato em folhas de

plantas que receberam nitrato em solução (NO_3^- 15 mM) pode ser associado aos teores de atividade da enzima nitrato redutase, que, em folhas, apresentou maior atividade no tratamento que recebeu nitrato (100,97 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMF.h}$), diferindo dos demais tratamentos. Em raiz, a atividade foi muito maior em plantas que receberam nitrato (20,37 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMF.h}$), no entanto observou-se uma redução mais intensa de nitrato pela parte aérea, cerca de 5 vezes maior que em raiz. Em nódulos, a atividade da enzima esteve próxima a zero, não havendo variação significativa entre os tratamentos.

A atividade da enzima alantoinase, responsável pela transformação de alantoína em ácido alantóico e início do catabolismo de ureídeos, foi maior nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, em folhas (19,84 e 23,04 $\mu\text{moles alantoato/gMF.h}$, respectivamente), já em raiz, a maior atividade da enzima alantoinase foi observada no tratamento NH_4^+ 15 mM (17,38 $\mu\text{moles alantoato/gMF.h}$), enquanto em nódulos, a maior atividade observada foi no tratamento uréia 15 mM (10,05 $\mu\text{moles alantoato/gMF.h}$).

Não é possível correlacionar a atividade da enzima alantoinase ao teor de ureídeos presente nos tecidos, uma vez que, seria esperado que no tratamento/tecido onde observou-se maior atividade, a concentração de alantoína seria menor e/ou a concentração de ácido alantóico seria maior. Em folhas, os maiores teores de ácido alantóico observados estiveram nos tratamentos uréia 15 mM, enquanto a maior atividade da enzima foi observada nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM; por outro lado não houve variação significativa nos teores de alantoína neste tecido. Em raiz, não houve variação nos teores de ácido alantóico entre os tratamentos, e os maiores teores de alantoína foram observados no tratamento NH_4^+ 15 mM, enquanto a maior atividade da enzima foi observada neste mesmo tratamento, de maneira que, onde seria esperada uma redução nos teores de alantoína e aumento nos teores de ácido alantóico, ocorreu o “inverso”. O mesmo se repete em nódulos, onde os maiores teores de ácido alantóico foram observados nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, e os

menores teores de alantoína foram observados no tratamento sem N, enquanto a maior atividade da enzima foi observada no tratamento uréia 15 mM, tratamento que apresentou os maiores teores de alantoína neste tecido. Com isso, não se pode concluir que o aumento e/ou redução de alguma forma de ureídeo em um dado tecido seja resultado da degradação de alantoína pelo aumento na atividade da enzima alantoinase devendo-se esta variação a algum outro fator não avaliado neste experimento.

A partir deste experimento, foi possível concluir que independente da fonte de nitrogênio fornecida à espécie *Calopogonium mucunoides*, não se observou efeito negativo sobre a nodulação da planta, uma vez que a massa dos nódulos não difere independente do tratamento e, apesar de o tratamento NO_3^- 15 mM apresentar menor número de nódulos, esta redução não é expressiva a ponto de ocorrer inibição da nodulação.

5.2 Efeito do nitrogênio mineral sobre a fixação

5.2.1 Efeito do tempo de exposição

As plantas foram cultivadas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio por aproximadamente 30 dias (4 semanas), após o que foram estabelecidos os tratamentos. Realizou-se dois experimentos: no primeiro, plantas plenamente noduladas foram mantidas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N) e, outro lote, passou a receber solução nutritiva com 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM), por um período de 21 dias.

No segundo experimento, plantas plenamente noduladas foram mantidas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N) e, outros dois lotes, passaram a receber solução nutritiva com 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM) e com 15 mM de amônia (NH_4^+ 15 mM), por um período de 5 dias.

Com isto, observou-se a influência da presença do nitrogênio mineral sobre a fixação e manutenção da nodulação, além da influência do tempo de exposição ao nitrogênio mineral sobre a fixação e sobre os parâmetros de crescimento (acúmulo de massa).

Em plantas plenamente noduladas expostas ao nitrato (NO_3^- 15 mM) por 21 dias (tabela 2) observou-se aumento no número de nódulos em relação a plantas que não receberam nitrogênio (sem N), onde o tratamento sem N apresentou uma média de 72 nódulos por planta e o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou uma média de 109 nódulos por planta, diferindo significativamente entre si. No entanto, o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou menor massa de nódulos, 0,98 g de massa fresca e 0,12 g de massa seca, por planta, indicando, então presença de maior número de nódulos, mas de nódulos menores. Este comportamento foi inverso ao ocorrido no experimento anterior, onde o tratamento que recebeu nitrato apresentou menor número de nódulos e não houve variação em termos de massa fresca.

Houve variação significativa quanto à massa da parte aérea de plantas que não receberam nitrogênio para plantas que receberam 15 mM de nitrato, onde em termos de massa fresca observou-se 30,24 g e 57,16 g, respectivamente, e em termos de massa seca, 9,62 g e 14,63 g, respectivamente. Não observou-se variação significativa na massa de raiz, tanto para massa fresca quanto para massa seca. Este acúmulo de massa na parte aérea de plantas do tratamento NO_3^- 15 mM reflete o fato de este tratamento obter uma fonte adicional de nitrogênio, uma vez que não abandonou a fixação biológica e ainda estava absorvendo e assimilando nitrato.

Tabela 2: Influência da fonte de nitrogênio sobre a nodulação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema e em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato por 21 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tratamento	Aminoácidos	Ureídeos Totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Nitrato	Proteína	Atividade da Nitrato Redutase	Massa Fresca	Massa Seca	Número de Nódulos
Folhas			$\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$			$\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$	$\mu\text{mol NO}_2^- .\text{g}^{-1} .\text{h}^{-1}$	g.plant^{-1}		
sem N	17,9 B	2,65 B	1,26 B	1,39 B	0,1 B	1,34 A	7,51 B	30,24 B	9,62 B	
NO ₃ ⁻ 15 mM	25,43 A	7,11 A	3,36 A	3,68 A	25,43 A	0,99 A	87,5 A	57,16 A	14,63 A	
Raiz										
sem N	4,37 A	2,60 B	1,94 B	0,65 B	0,1 B	0,48 A	2,5 B	55,58 A	6,99 A	
NO ₃ ⁻ 15 mM	3,25 B	4,68 A	3,60 A	1,08 A	12,58 A	0,1 B	35,2 A	69,96 A	8,17 A	
Nódulos										
sem N	13,14 A	4,85 B	2,62 B	2,22 B	0,1 B	3,07 A	2,4 A	1,99 A	0,47 A	72 B
NO ₃ ⁻ 15 mM	7,58 B	8,13 A	5,44 A	2,70 A	18,16 A	2,43 B	0,5 B	0,98 B	0,12 B	109 A
Seiva de Xilema			$\mu\text{mol.mL}^{-1}$							
sem N	8,20 A	2,84 A	1,20 A	1,64 A	0,27 B					
NO ₃ ⁻ 15 mM	7,33 A	1,71 B	0,76 B	0,95 B	3,03 A					

Os teores de ureídeos em seiva de xilema foram maiores no tratamento sem N, mas não houve variação tão expressiva quanto seria esperado se houvesse o abandono da fixação biológica. Ureídeos totais variaram de 2,84 $\mu\text{moles/ml}$ (sem N) para 1,71 $\mu\text{moles/ml}$ (NO_3^- 15 mM); alantoína variou de 1,20 $\mu\text{moles/ml}$ (sem N) para 0,76 $\mu\text{moles/ml}$ (NO_3^- 15 mM) e ácido alantóico apresentou variação de 1,64 $\mu\text{moles/ml}$ (sem N) para 0,95 $\mu\text{moles/ml}$ (NO_3^- 15 mM) (tabela 2). Esta redução nos teores de ureídeos em seiva de xilema de plantas que receberam nitrato em solução aparentemente foi reflexo da menor quantidade, em termos de massa fresca, de nódulos neste tratamento, uma vez que o conteúdo de ureídeos pode indicar o *status* de nodulação e fixação de nitrogênio pela planta; no entanto o fato de não ocorrer grande redução nos teores de ureídeos neste tratamento é indicativo da tolerância do sistema simbiótico ao nitrato nesta espécie.

A fonte de nitrogênio aparentemente parece influenciar no acúmulo de ureídeos em tecidos, uma vez que plantas que receberam nitrato apresentaram maiores teores de ureídeos em tecidos do que plantas inteiramente dependentes da fixação. Isto parece ocorrer porque este tratamento manteve a nodulação, de maneira que o nitrato estaria atuando como fonte adicional de nitrogênio promovendo assim o acúmulo de ureídeos.

Em folhas o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou 7,11 $\mu\text{moles/gMF}$, cerca de três vezes maior que no tratamento sem N. O mesmo comportamento foi observado para alantoína, onde o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou 3,36 $\mu\text{moles/gMF}$; e para ácido alantóico, onde o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou 3,68 $\mu\text{moles/gMF}$ (tabela 2).

Em raiz e nódulos a mesma variação foi observada, onde, em raiz o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou 4,68 $\mu\text{moles/gMF}$, os teores de alantoína observados foram de 3,60 $\mu\text{moles/gMF}$ em NO_3^- 15 mM e, para ácido alantóico, 1,08 $\mu\text{moles/gMF}$; sendo em todos os

casos muito maior que no tratamento sem N. Já em nódulos, os teores observados para ureídeos totais foram de 8,13 $\mu\text{moles/gMF}$, em NO_3^- 15 mM; o mesmo comportamento se reflete para alantoína, onde NO_3^- 15 mM apresentou 5,44 $\mu\text{moles/gMF}$ e, para ácido alantóico; sendo estes teores cerca de duas vezes maiores que no tratamento sem N. Em relação a ácido alantóico esta diferença foi um pouco menor, onde sem N apresentou 2,22 $\mu\text{moles/gMF}$ e NO_3^- 15 mM apresentou 2,70 $\mu\text{moles/gMF}$, mas havendo variação significativa (tabela 2).

Este acúmulo de ureídeos em tecidos de plantas que receberam 15 mM de nitrato por 21 dias pode estar relacionado ao fato de que este tratamento dispunha de uma fonte adicional de nitrogênio, uma vez que não abandonou a fixação simbiótica e estava absorvendo e assimilando nitrato.

Os teores de nitrato em seiva de xilema de plantas do tratamento NO_3^- 15 mM foram da ordem de 3,03 $\mu\text{moles/ml}$, enquanto em plantas sem N foram próximos a zero. Não houve variação significativa nos teores de aminoácidos translocados via xilema, estando entre 7 e 8 $\mu\text{moles/ml}$. A presença de nitrato em seiva de xilema de plantas tratadas com 15 mM de nitrato indica não só a absorção, mas também o transporte para a parte aérea, sendo indicativo, portanto, da importância da parte aérea na assimilação de nitrato nesta espécie; por outro lado, a exposição ao nitrato por 21 dias não mostrou alterar o transporte de aminoácidos, uma vez que não houve variação significativa entre os tratamentos.

Os teores de nitrato em tecidos foram próximos a zero no tratamento sem N e, no tratamento NO_3^- 15 mM foram de 25,43 $\mu\text{moles/gMF}$ em folhas, 12,58 $\mu\text{moles/gMF}$ em raiz e de 18,16 $\mu\text{moles/gMF}$ em nódulos. A alta concentração de nitrato em tecidos de plantas do tratamento NO_3^- 15 mM é coerente com o fato de as plantas estarem absorvendo e metabolizando esta forma de nitrogênio mineral; os valores indicam que o acúmulo de nitrato

se dá principalmente em folhas, corroborando os dados de transporte de nitrato em seiva de xilema, no entanto há alta concentração de nitrato em nódulos o que não apresenta explicação aparente.

Houve variação significativa nos teores de aminoácidos solúveis totais em tecidos, de modo que, em folhas, NO_3^- 15 mM apresentou os maiores teores (25,43 $\mu\text{moles/gMF}$) enquanto em raiz e nódulos, o tratamento sem N apresentou os maiores teores (4,37 e 13,14 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente). Não houve variação significativa nos teores de proteína em folhas e, em raiz e nódulos, sem N apresentou os maiores teores, 0,48 e 3,07 mg/gMF, respectivamente. Em raiz e nódulos ocorreu uma resposta similar no acúmulo de aminoácidos solúveis totais e proteína, onde o tratamento sem N apresentou os maiores teores para estes dois metabólitos, no entanto este comportamento não se repetiu para folhas, onde não ocorreu variação significativa nos teores de proteína e os maiores teores de aminoácidos solúveis totais está presente no tratamento NO_3^- 15 mM, não sendo possível, portanto, estabelecer uma relação direta entre assimilação de uma forma de nitrogênio (fonte) e acúmulo de aminoácidos e/ou de proteína.

A atividade da enzima nitrato redutase foi estimulada no tratamento NO_3^- 15 mM, em folhas e raiz, sendo de 87,5 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$, em folhas, e de 35,2 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$, sendo muito maior que no tratamento sem N (tabela 2). A presença de nitrato em seiva de xilema e a alta concentração de nitrato em folhas pode ser relacionada à alta atividade de NR em folhas, mostrando novamente que o nitrato é preferencialmente reduzido nas folhas, em *Calopogonium mucunoides*. Em nódulos, a atividade da enzima nitrato redutase foi de 2,4 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$ no tratamento sem N e de 0,5 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$ em NO_3^- 15 mM, variando significativamente entre si.

Plantas plenamente noduladas tratadas com nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia por 5 dias não apresentaram variação no número de nódulos entre os tratamentos, estando em torno de 50 nódulos em média, por planta (tabela 3). Já em termos de massa fresca de nódulos o tratamento que recebeu 15 mM de amônia (NH_4^+ 15 mM) apresentou maior massa, 0,76 g, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Em termos de massa seca de nódulos, o tratamento que recebeu 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM) apresentou a menor massa, 0,06 g, diferindo significativamente dos demais tratamentos. O fato de que a nodulação foi mantida, em todos os tratamentos, indica que o tempo de exposição ao nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia não foi suficiente para alterar os parâmetros de crescimento e desenvolvimento dos nódulos, mantendo-se a nodulação em todos os tratamentos.

A fonte de nitrogênio mostrou alguma influência na massa fresca e massa seca de folhas e raiz, onde o tratamento com 15 mM de amônia (NH_4^+ 15 mM) apresentou maior acúmulo de massa, tanto em folhas quanto em raiz, sendo que a massa fresca de folhas representou 14,88 g e massa seca de 4,72 g e, em raiz, a massa fresca foi de 38,88 g e a massa seca de 4,47 g; diferindo significativamente para estes dois tecidos dos demais tratamentos (sem N e NO_3^- 15 mM) (tabela 3). Este maior acúmulo de massa em plantas que recebiam amônia, como fonte adicional de nitrogênio, uma vez que as plantas se mantiveram noduladas, mostra que a amônia alterou rapidamente o crescimento da planta, podendo este comportamento estar relacionado ao fato de esta espécie ser típica da região de cerrados onde, por questão de baixo pH de solo, a forma mais comum de nitrogênio disponível é a forma amoniacal podendo, portanto, estar representando uma característica adaptativa para assimilar nitrogênio na forma de amônia. Por outro lado, o fato de não haver alteração na nodulação, tanto em plantas que receberam amônia como também em plantas que receberam nitrato, é importante para realçar

que qualquer efeito do nitrogênio mineral sobre a fixação não está relacionado à alterações na nodulação, mas ao processo de fixação em si.

O teor de ureídeos em seiva de xilema não variou quantitativamente em termos de ureídeos totais, onde não houve variação significativa entre os tratamentos, estando em torno de 3,5 a 4,8 $\mu\text{moles/ml}$. No entanto observou-se variação na forma de ureídeo presente na seiva de xilema, onde plantas que não recebiam nitrogênio, ou seja, inteiramente dependentes da fixação (sem N) apresentaram maiores teores de alantoína, 2,72 $\mu\text{moles/ml}$, diferindo dos outros dois tratamentos (NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM) e plantas que recebiam 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM) apresentaram maiores teores de ácido alantóico, 3,03 $\mu\text{moles/ml}$, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Aparentemente o tratamento com nitrato interfere na forma de ureídeo translocado, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação, havendo um aumento, no caso de plantas expostas ao nitrato por 5 dias, nos teores de ácido alantóico translocados via xilema (tabela 3).

Tabela 3: Influência da fonte de nitrogênio sobre a nodulação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema e em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tratamento	Aminoácidos	Ureídeos Totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Nitrato	Amônia	Proteína	Atividade da Nitrato Redutase	Massa Fresca	Massa Seca	Número de Nódulos
Folhas	$\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$					$\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$		$\mu\text{mol NO}_2^- .\text{g}^{-1} .\text{h}^{-1}$	g.plant^{-1}		
sem N	1,59 B	4,76 A	0,70 B	4,06 A	5,26 B	0,01 A	2,40 A	226,04 B	6,82 B	2,52 B	
NO_3^- 15 mM	3,06 A	5,73 A	3,25 A	2,48 A	35,91 A	0,01 A	2,00 A	446,76 A	9,19 B	2,74 B	
NH_4^+ 15 mM	1,97 AB	4,21 A	1,12 B	3,08 A	3,29 B	0,01 A	2,30 A	140,58 B	14,88 A	4,72 A	
Raiz											
sem N	0,88 B	3,32 A	1,21 B	2,11 A	0,01 B	0,01 A	0,90 A	55,74 A	28,76 B	3,74 B	
NO_3^- 15 mM	1,82 A	5,18 A	2,75 A	2,42 A	6,01 A	0,01 A	0,50 B	94,97 A	24,21 B	3,11 B	
NH_4^+ 15 mM	0,98 AB	4,01 A	2,63 A	1,38 B	0,01 B	0,01 A	0,50 B	105,86 A	38,88 A	4,47 A	
Nódulos											
sem N	7,02 A	16,13 A	7,12 A	9,01 A	0,01 B	0,01 A	5,20 A	16,77 A	0,42 B	0,13 A	53 A
NO_3^- 15 mM	5,63 A	14,08 A	7,25 A	6,83 AB	4,25 A	0,01 A	3,10 B	3,74 B	0,34 B	0,06 B	52 A
NH_4^+ 15 mM	5,87 A	11,08 A	6,46 A	4,62 B	0,01 B	0,01 A	4,50 A	23,05 A	0,76 A	0,17 A	49 A
Seiva de Xilema	$\mu\text{mol.mL}^{-1}$										
sem N	0,19 A	4,25 A	2,72 A	1,53 B	0,01 B	0,01 A					
NO_3^- 15 mM	0,34 A	4,80 A	1,76 B	3,03 A	10,31 A	0,01 A					
NH_4^+ 15 mM	0,15 A	3,58 A	1,61 B	1,96 B	0,01 B	0,01 A					

Em tecidos, os teores de ureídeos totais também não apresentaram variação significativa entre os tratamentos, para todos os tecidos avaliados, estando na ordem de 4,2 a 5,7 $\mu\text{moles/gMF}$ em folhas, 3,3 a 5,1 $\mu\text{moles/gMF}$ em raiz e, em nódulos, entre 11,5 e 16,1 $\mu\text{moles/gMF}$. No entanto observou-se variação na forma de ureídeo presente nos tecidos, onde plantas que receberam 15 mM de nitrato apresentaram maiores teores de alantoína em folhas, diferindo dos demais tratamentos e plantas que não receberam nitrogênio, ou seja, plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N), apresentaram os menores teores de alantoína em raiz, diferindo significativamente entre os tratamentos. Em nódulos, não houve variações significativas nos teores de alantoína entre os tratamentos.

Em relação aos teores de ácido alantóico, não houve variações significativas em folhas; já em raiz, plantas que receberam 15 mM de amônia (NH_4^+ 15 mM) apresentaram os menores teores, diferindo significativamente dos outros dois tratamentos. Em nódulos, o tratamento sem N apresentou os maiores teores de ácido alantóico e o tratamento NH_4^+ 15 mM apresentou os menores teores.

Os altos teores de alantoína em folhas de plantas que receberam nitrato, acompanhada de altos teores de alantoína também em raiz deste tratamento, cerca de duas vezes maior em relação ao tratamento sem N, aparentemente não tem relação com a forma de ureídeo translocada via xilema, uma vez que no tratamento NO_3^- 15 mM a forma de ureídeo preferencialmente translocada foi ácido alantóico, neste experimento (tabela 3)

O fato de não haver redução nos teores de ureídeos totais em tecidos de plantas que recebiam nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia por 5 dias indica a mesma tendência para acúmulo de ureídeos, observada no experimento onde plantas noduladas foram expostas ao nitrato por 21 dias, o que não seria esperado em plantas que não se mantivessem

fixando, ou seja, se houvesse ocorrido o abandono da associação simbiótica em presença do nitrogênio mineral.

Os teores de aminoácidos solúveis totais em seiva de xilema não variaram significativamente entre os tratamentos, estando entre 0,15 e 0,34 $\mu\text{moles/ml}$, de maneira que a exposição ao nitrogênio mineral por 5 dias aparentemente não altera quantitativamente o transporte de aminoácidos via xilema. Ao contrário do nitrato, a presença de amônia no meio não promoveu seu transporte via xilema, não sendo observada presença de amônia solúvel em seiva de xilema em todos os tratamentos, indicando, portanto, que a amônia estaria sendo toda metabolizada pelo sistema radicular. Os teores de nitrato observados em seiva de xilema foram da ordem de 10,3 $\mu\text{moles/ml}$ em plantas que receberam nitrato (NO_3^- 15 mM) e próximos de zero nos demais tratamentos, indicando que, no tratamento NO_3^- 15 mM, o nitrato não só foi absorvido como há translocação para a parte aérea, que, portanto, está contribuindo para sua redução e assimilação.

Plantas que receberam 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM) apresentaram os maiores teores de aminoácidos solúveis totais em folhas e em raiz (3,06 e 1,82 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente), sendo que plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N) apresentaram os menores teores nos dois tecidos (1,59 e 0,88 $\mu\text{moles/gMF}$, para folhas e raiz, respectivamente). Em nódulos não ocorreu variação significativa nos teores de aminoácidos solúveis totais entre os tratamentos, estando em torno de 5,6 e 7,0 $\mu\text{moles/gMF}$. Desta maneira, apesar de não ter sido observada alteração significativa no teor de aminoácidos translocados via xilema, o tratamento com nitrato parece estimular o acúmulo de aminoácidos em tecidos de raiz e folhas; por outro lado, isto não ocorre para proteína.

Em folhas não houve variação nos teores de proteína, estando em torno de 2 a 2,4 mg/gMF. Já em raiz, o tratamento sem N apresentou os maiores valores (0,90 mg/gMF) e, em nódulos, o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou os menores valores (3,10 mg/gMF).

Não observou-se uma relação direta entre o acúmulo de aminoácidos e proteína nos tecidos, em resposta à fonte de nitrogênio, uma vez o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou maior acúmulo de aminoácidos, em folhas e raiz, enquanto o tratamento sem N apresentou maior acúmulo de proteína, em raiz, não sendo possível portanto estabelecer uma relação direta entre assimilação de uma forma de nitrogênio (fonte) e acúmulo de aminoácidos e/ou de proteína.

O tratamento NO_3^- 15 mM apresentou os maiores teores de nitrato em todos os tecidos, sendo que, em folhas esteve em torno de 35,9 $\mu\text{moles/gMF}$, em raiz, 6,01 $\mu\text{moles/gMF}$ e, em nódulos, apresentou 4,25 $\mu\text{moles/gMF}$. Não observou-se presença de amônia solúvel em todos os tecidos, em todos os tratamentos, estando todos os valores próximos a zero.

A presença de nitrato em seiva de xilema no tratamento NO_3^- 15 mM, enquanto nos demais tratamentos esteve ausente, e presença de teores maiores de nitrato em folhas de plantas que receberam nitrato em solução (NO_3^- 15 mM) pode ser associado à atividade da enzima nitrato redutase, que, em folhas, apresentou maior atividade no tratamento que recebeu nitrato, 446,76 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$; enquanto em raiz a atividade da enzima, neste tratamento, foi de 94,97 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$, indicando, mais uma vez, a importância da parte aérea para a assimilação de nitrato em *Calopogonium mucunoides*. Nos demais tratamentos, a atividade da enzima nitrato redutase foi de 55,74 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$ (sem N) e de 105,86 $\mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$ (NH_4^+ 15 mM), em raiz, não havendo variação significativa entre estes dois

tratamentos. Em nódulos a atividade da enzima foi mais baixa em plantas tratadas com 15 mM de nitrato ($3,74 \mu\text{moles NO}_2^-/\text{gMFh}$), diferindo significativamente dos demais tratamentos.

5.2.2 Efeito da concentração de nitrogênio mineral fornecida

As plantas foram cultivadas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio por aproximadamente 40 dias (cerca de 5 semanas), após o que foram estabelecidos os tratamentos. Um lote de plantas foi mantido recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N) e, outros lotes passaram a receber solução nutritiva com nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia, em diferentes concentrações, na seguinte seqüência: plantas recebendo 5 mM de nitrato (NO_3^- 5mM), plantas recebendo 15 mM de nitrato (NO_3^- 15mM), plantas recebendo 30 mM de nitrato (NO_3^- 30 mM), plantas recebendo 5 mM de amônia (NH_4^+ 5 mM), plantas recebendo 15 mM de amônia (NH_4^+ 15 mM) e plantas recebendo 30 mM de amônia (NH_4^+ 30 mM), por um período de 5 dias.

Com isto, observou-se a influência da concentração de nitrogênio mineral sobre a fixação e manutenção da nodulação, além da influência nos parâmetros de crescimento (acúmulo de massa).

Um segundo experimento, utilizando-se apenas os tratamentos com nitrato (NO_3^- 5 mM, NO_3^- 15 mM e NO_3^- 30 mM), além das plantas controle, recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N) foi conduzido para as análises confirmatórias da manutenção da atividade do complexo nitrogenase em presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato.

Observou-se que, os tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio mineral, na forma de nitrato ou amônia, não alteraram o número ou a massa dos nódulos, tanto em termos de massa fresca ou massa seca (tabela 4A). Não houve variação significativa no número de nódulos, entre os tratamentos, estando em torno de 68 a 96 nódulos/planta. A massa fresca dos

nódulos foi apenas mais baixa nos tratamentos NO_3^- 15 mM (0,76 g/planta) e NH_4^+ 15 mM (1,00 g/planta), que não diferiram entre si, mas diferiram significativamente dos demais tratamentos, onde observou-se uma média entre 1,42 e 2,67 g/planta; esta redução em termos de massa fresca nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM não apresenta uma explicação aparente, uma vez que não houve variação significativa entre os tratamentos em termos de massa seca de nódulos, que esteve entre 0,12 a 0,25 g/planta.

A manutenção da nodulação independente da concentração de nitrogênio mineral fornecido à plantas plenamente noduladas de *Calopogonium mucunoides* indica que o tempo de exposição ao nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia não foi suficiente para alterar os parâmetros de crescimento e desenvolvimento dos nódulos, mantendo-se a nodulação em todos os tratamentos.

Os tratamentos com concentrações crescentes de nitrato ou de amônia (de 5 a 30 mM) não influenciaram no acúmulo de massa, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, não havendo variação significativa entre os tratamentos, em termos de massa fresca ou de massa seca (tabela 4A).

A massa fresca da parte aérea foi de 26,94 a 50,76 g/planta, não havendo variação significativa; em termos de massa seca, os valores foram de 5,83 a 12,40 g/planta, não variando significativamente entre os tratamentos.

A massa fresca de raiz foi de 32,94 a 91,08 g/planta, enquanto a massa seca foi de 4,44 a 13,35 g/planta, não variando significativamente entre os tratamentos.

Tabela 4A: Influência da fonte e da concentração de nitrogênio sobre a nodulação e teores de compostos nitrogenados em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tratamento	Aminoácidos	Ureídeos Totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Nitrato	Amônia	Proteína	Massa Fresca	Massa Seca	Número de Nódulos
Folhas		$\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$				$\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$		g.plant^{-1}		
sem N	5,74 B	2,29 C	1,11 C	1,18 B	3,81 C	0,01 A	1,80 A	36,54 A	8,72 A	
5 mM NO_3^-	6,31 B	3,58 B	2,34 B	1,24 B	29,72 B	0,01 A	1,71 A	43,61 A	10,31 A	
15 mM NO_3^-	15,20 A	6,20 A	5,07 A	1,12 B	41,00 A	0,01 A	2,07 A	26,94 A	5,83 A	
30 mM NO_3^-	21,60 A	4,23 B	3,41 A	0,82 B	44,55 A	0,01 A	1,69 A	39,94 A	9,37 A	
5 mM NH_4^+	7,28 B	3,66 B	1,22 C	2,43 A	2,38 C	0,01 A	2,62 A	50,76 A	12,40 A	
15 mM NH_4^+	19,01 A	2,61 C	1,26 C	1,32 B	3,08 C	0,01 A	2,65 A	45,78 A	10,29 A	
30 mM NH_4^+	24,06 A	2,65 C	2,24 B	0,42 C	3,51 C	0,01 A	2,36 A	42,85 A	9,70 A	
Raiz										
sem N	4,14 A	3,11 B	1,83 A	1,27 A	0,45 B	0,01 A	0,95 A	54,59 A	7,65 A	
5 mM NO_3^-	4,00 A	3,21 B	1,83 A	1,38 A	3,34 B	0,01 A	0,38 B	63,66 A	8,39 A	
15 mM NO_3^-	5,88 A	3,05 B	1,59 B	1,46 A	33,58 A	0,01 A	0,55 B	32,94 A	4,44 A	
30 mM NO_3^-	4,43 A	3,72 A	2,16 A	1,56 A	29,05 A	0,01 A	0,33 B	54,33 A	7,38 A	
5 mM NH_4^+	4,18 A	3,94 A	3,27 A	0,66 B	3,56 B	0,01 A	0,61 B	91,08 A	13,35 A	
15 mM NH_4^+	4,31 A	3,01 B	1,39 B	1,61 A	0,68 B	0,01 A	0,49 B	63,11 A	8,11 A	
30 mM NH_4^+	5,80 A	4,11 A	3,11 A	0,99 A	2,28 B	0,01 A	1,09 A	51,63 A	6,46 A	
Nódulos										
sem N	9,03 A	5,70 B	2,76 A	2,94 B	0,01 C	0,01 A	5,62 A	1,78 A	0,25 A	96 A
5 mM NO_3^-	8,86 A	6,14 B	2,77 A	3,37 B	6,9 B	0,01 A	5,04 A	1,49 A	0,23 A	95 A
15 mM NO_3^-	5,24 B	10,52 A	1,01 B	9,51 A	41,04 A	0,01 A	3,92 A	0,76 B	0,12 A	75 A
30 mM NO_3^-	9,66 A	7,29 B	2,54 A	4,75 B	37,27 A	0,01 A	3,92 A	1,65 A	0,20 A	88 A
5 mM NH_4^+	10,67 A	6,95 B	2,32 A	4,64 B	0,01 C	0,01 A	5,45 A	1,42 A	0,15 A	73 A
15 mM NH_4^+	14,05 A	10,54 A	0,35 B	10,22 A	0,01 C	0,01 A	2,66 A	1,00 B	0,20 A	68 A
30 mM NH_4^+	10,22 A	12,34 A	3,24 A	9,10 A	0,01 C	0,01 A	3,63 A	1,45 A	0,20 A	73 A

O fato de não haver acúmulo significativo de massa em função do tratamento, em resposta à concentração de nitrogênio mineral fornecida, tem relação, principalmente, com o curto tempo de exposição, 5 dias, que não seria suficiente para uma variação significativa nos parâmetros de crescimento das plantas. Por outro lado, a ausência de variação neste sentido não explica o acúmulo de massa em folhas e raiz no tratamento que recebeu 15 mM de amônia no experimento anterior (tabela 3).

Os teores de ureídeos totais em seiva de xilema foram maiores apenas nos tratamentos NO_3^- 5 mM (9,32 $\mu\text{moles/ml}$) e 15 mM NH_4^+ (9,22 $\mu\text{moles/ml}$), que não diferiram entre si, mas diferiram dos demais tratamentos (tabela 4B). Não houve redução no nível de ureídeos totais em plantas que receberam nitrogênio mineral, independente da concentração fornecida, em comparação com plantas inteiramente dependentes da fixação, estando os teores de ureídeos totais em seiva de xilema entre 7,77 e 8,59 $\mu\text{moles/ml}$ nos demais tratamentos. Observou-se alguma variação na forma de ureídeo translocado via xilema, onde os tratamentos sem N e NO_3^- 30 mM apresentaram os menores teores de alantoína (3,85 e 2,98 $\mu\text{moles/ml}$, respectivamente) e os tratamentos NH_4^+ 15 mM e NH_4^+ 30 mM apresentaram os menores teores de ácido alantóico (1,75 e 2,21 $\mu\text{moles/ml}$), enquanto o tratamento NO_3^- 30 mM apresentou os maiores teores de ácido alantóico em seiva (5,60 $\mu\text{moles/ml}$). Esta alta concentração de ureídeos em seiva de xilema, independente da forma de nitrogênio mineral fornecido à planta ou da concentração, indica tolerância do sistema de fixação à presença de nitrogênio mineral, uma vez que, em termos de ureídeos totais, os teores observados em plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N), foram similares ao de quase todos os tratamentos que receberam nitrogênio mineral em solução (tabela 4B).

Tabela 4B: Influência da fonte e da concentração de nitrogênio sobre a composição nitrogenada em seiva de xilema de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tratamento	Aminoácidos	Ureídeos Totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Nitrato	Amônia
Seiva de Xilema	$\mu\text{mol.mL}^{-1}$					
sem N	0,45 C	7,77 B	3,85 B	3,91 B	0,01 C	0,01 A
5 mM NO₃⁻	0,07 C	9,32 A	4,89 A	4,42 B	0,01 C	0,01 A
15 mM NO₃⁻	2,04 B	8,51 B	4,71 A	3,79 B	2,63 B	0,01 A
30 mM NO₃⁻	1,21 B	8,59 B	2,98 B	5,60 A	5,78 A	0,01 A
5 mM NH₄⁺	0,42 C	8,37 B	5,01 A	3,36 B	0,01 C	0,01 A
15 mM NH₄⁺	2,72 B	9,22 A	7,47 A	1,75 C	0,01 C	0,01 A
30 mM NH₄⁺	7,78 A	8,17 B	5,95 A	2,21 C	0,01 C	0,01 A

Os teores de ureídeos em tecidos seguiram um padrão semelhante ao observado em seiva de xilema, não observando-se redução nos teores de ureídeos em resposta à presença de nitrogênio mineral e, em alguns casos, observando-se novamente acúmulo de ureídeos em tecidos de plantas que receberam nitrogênio mineral (tabela 4A).

Em folhas, o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou os maiores teores de ureídeos totais (6,20 $\mu\text{moles/gMF}$), enquanto os menores teores foram observados nos tratamentos sem N (2,29 $\mu\text{moles/gMF}$), NH_4^+ 15 mM (2,61 $\mu\text{moles/gMF}$) e NH_4^+ 30 mM (2,65 $\mu\text{moles/gMF}$). Em raiz, os maiores teores de ureídeos totais observados foram nos tratamentos NO_3^- 30 mM (3,72 $\mu\text{moles/gMF}$), NH_4^+ 5 mM (3,94 $\mu\text{moles/gMF}$) e NH_4^+ 30 mM (4,11 $\mu\text{moles/gMF}$). Já em nódulos, os maiores teores de ureídeos totais foram encontrados nos tratamentos NO_3^- 15 mM (10,52 $\mu\text{moles/gMF}$), NH_4^+ 15 mM (10,54 $\mu\text{moles/gMF}$) e NH_4^+ 30 mM (12,34 $\mu\text{moles/gMF}$).

Este acúmulo de ureídeos em tecidos em resposta à presença de nitrogênio mineral segue o padrão já observado nos demais experimentos, no entanto não se tem uma resposta gradativa, por exemplo, em folhas o maior “acúmulo” de ureídeos totais observado foi no tratamento NO_3^- 15 mM, sendo ligeiramente maior que no tratamento NO_3^- 30 mM e mais de duas vezes maior que nos tratamentos NH_4^+ 15 mM e NH_4^+ 30 mM; o mesmo comportamento se repetindo para raiz e nódulos. Não é possível, portanto, estabelecer uma relação entre concentração de nitrogênio mineral fornecida e acúmulo de ureídeos em tecidos, com base nos dados obtidos.

A fonte de nitrogênio mostrou alterar também a forma de ureídeo presente nos tecidos, assim como observado em seiva de xilema. Em folhas, os tratamentos, NO_3^- 15 mM e NO_3^- 30

mM apresentaram os maiores teores de alantoína (5,07 e 3,41 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente), enquanto os menores teores de alantoína foram observados nos tratamentos sem N (1,11 $\mu\text{moles/gMF}$), NH_4^+ 5 mM e NH_4^+ 15 mM (1,22 e 1,26 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente). Por outro lado, os maiores teores de ácido alantóico foram observados no tratamento NH_4^+ 5 mM (2,43 $\mu\text{moles/gMF}$) e os menores, no tratamento NH_4^+ 30 mM (0,42 $\mu\text{moles/gMF}$) (tabela 4A).

Em raiz, os tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM apresentaram os menores teores de alantoína (1,59 e 1,39 $\mu\text{moles/gMF}$, respectivamente), enquanto os menores valores de ácido alantóico foram observados no tratamento NH_4^+ 5 mM (0,66 $\mu\text{moles/gMF}$).

Em nódulos, os menores teores de alantoína foram observados nos tratamentos NO_3^- 15 mM (1,01 $\mu\text{moles/gMF}$), NH_4^+ 15 mM (0,35 $\mu\text{moles/gMF}$); enquanto os maiores teores de ácido alantóico foram observados nos tratamentos NO_3^- 15 mM (9,51 $\mu\text{moles/gMF}$) e NH_4^+ 15 mM (10,22 $\mu\text{moles/gMF}$) (tabela 4A). Esta aparente “inversão” na forma de ureídeo foi observada em vários experimentos, para seiva de xilema e, neste caso, também em nódulos, o que pode ter alguma relação com a fonte de nitrogênio fornecida.

Observou-se presença de nitrato em seiva de xilema apenas nos tratamentos NO_3^- 15 mM (2,63 $\mu\text{moles/ml}$) e NO_3^- 30 mM (5,78 $\mu\text{moles/ml}$), enquanto nos demais tratamentos esteve ausente. A maior concentração de aminoácidos solúveis totais em seiva de xilema foi observada no tratamento NH_4^+ 30 mM (7,78 $\mu\text{moles/ml}$) e as menores foram observadas nos tratamentos sem N (0,45 $\mu\text{moles/ml}$), NO_3^- 5 mM (0,07 $\mu\text{moles/ml}$) e NH_4^+ 5 mM (0,42 $\mu\text{moles/ml}$), o que indica que os tratamentos que recebiam maiores concentrações de nitrato e de amônia apresentaram maiores taxas de exportação de aminoácidos para a parte aérea.

Ao contrário do nitrato, a presença de amônia no meio não promoveu seu transporte via xilema, não tendo sido observada a presença de amônia em seiva de xilema, em todos os

tratamentos, indicando, portanto, que a amônia disponível foi toda metabolizada pelo sistema radicular.

A presença de nitrato em seiva de xilema de plantas que recebiam 15 ou 30 mM de nitrato em solução indica que, nestes tratamentos a parte aérea tem papel importante na redução e assimilação de nitrato e que no caso de concentrações mais baixas de nitrato, como no tratamento NO_3^- 5 mM, parece ocorrer preferencialmente no sistema radicular.

Em folhas, os teores de nitrato mais altos foram observados nos tratamentos NO_3^- 15 mM (41 $\mu\text{moles/gMF}$) e NO_3^- 30 mM (44,55 $\mu\text{moles/gMF}$) e teores intermediários foram observados no tratamento NO_3^- 5 mM (29,72 $\mu\text{moles/gMF}$), enquanto nos demais tratamentos os valores foram baixos (tabela 4A). Em raiz observou-se maiores teores de nitrato nos tratamentos NO_3^- 15 mM (33,58 $\mu\text{moles/gMF}$) e NO_3^- 30 mM (29,05 $\mu\text{moles/gMF}$), enquanto nos demais tratamentos observou-se baixos teores de nitrato solúvel, entre 0,45 e 3,56 $\mu\text{moles/gMF}$.

Comportamento similar ao observado em folhas, foi observado em nódulos, onde os teores de nitrato mais elevados estiveram nos tratamentos NO_3^- 15 mM (41,04 $\mu\text{moles/gMF}$) e NO_3^- 30 mM (37,27 $\mu\text{moles/gMF}$), enquanto o tratamento NO_3^- 5 mM apresentou valores intermediários de nitrato solúvel (6,9 $\mu\text{moles/gMF}$) e, nos demais tratamentos, os valores foram próximos a zero.

As concentrações de amônia solúvel em todos os tecidos, para todos os tratamentos avaliados, foram próximas a zero.

A fonte de nitrogênio, bem como a concentração utilizada, mostrou afetar o acúmulo de aminoácidos em tecidos. Em folhas, os tratamentos NO_3^- 15 e 30 mM e NH_4^+ 15 e 30 mM apresentaram as maiores concentrações de aminoácidos solúveis totais (entre 15,20 e 24,06

$\mu\text{moles/gMF}$), o que parece estar relacionado ao fato de estarem recebendo maiores concentrações de nitrogênio mineral em solução e manterem a nodulação, representando então duas fontes de nitrogênio para o metabolismo de compostos. Em raiz, não houve variação significativa nos teores de aminoácidos solúveis totais, estando na ordem de 4,00 e 5,88 $\mu\text{moles/gMF}$, enquanto em raiz o tratamento NO_3^- 15 mM apresentou os menores teores de aminoácidos solúveis totais (5,24 $\mu\text{moles/gMF}$) e os demais tratamentos não diferiram entre si, estando os valores entre 8,86 e 14,05 $\mu\text{moles/gMF}$ (tabela 4A).

Não observou-se variação significativa nos teores de proteína em folhas e em nódulos, entre os tratamentos, enquanto em raiz, os tratamentos sem N e NH_4^+ 30 mM apresentaram maiores concentrações (0,95 e 1,09 mg/gMF) e os demais tratamentos não diferiram entre si (tabela 4A). Este comportamento indica que a fonte de nitrogênio, ou a concentração de nitrogênio mineral fornecida à plantas noduladas de *Calopogonium mucunoides* não afeta drasticamente o acúmulo de proteína em tecidos, após uma exposição de 5 dias, mas afeta o acúmulo de aminoácidos solúveis totais, ureídeos e nitrato solúvel.

Quando analisou-se a atividade da enzima nitrogenase, observou-se redução na atividade apenas no tratamento NO_3^- 30 mM, sendo que os demais tratamentos (sem N, NO_3^- 5 mM e NO_3^- 15 mM) não diferiram entre si, apresentando atividade de nitrogenase entre 3,04 e 4,06 $\mu\text{moles etileno/gMF nódulos.h}$, enquanto o tratamento NO_3^- 30 mM apresentou atividade de 1,71 $\mu\text{moles etileno/gMF}$. Não observou-se variação no número de nódulos ou na massa fresca de nódulos entre os tratamentos (tabela 5). Estes dados evidenciam a tolerância do sistema de fixação em *Calopogonium mucunoides* à presença de nitrato, observando-se alguma inibição, embora não de forma total, no tratamento NO_3^- 30 mM.

Tabela 5: Influência da concentração de nitrato sobre a nodulação e a fixação e teores de compostos nitrogenados em seiva de xilema de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato por 5 dias. Os dados representam a média de três repetições; letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tratamento	Ureídeos Totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Nitrato	Atividade da Nitrogenase $\mu\text{mol etileno.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Massa Fresca g.plant^{-1}	Número de Nódulos
Nódulos							
sem N					4,06 A	0,64 A	123 A
5 mM NO_3^-					3,04 A	0,95 A	146 A
15 mM NO_3^-					3,42 A	0,70 A	122 A
30 mM NO_3^-					1,71 B	0,82 A	119 A
Seiva de Xilema							
			$\mu\text{mol.mL}^{-1}$				
sem N	5,35 A	2,92 A	2,42 B	0,01 C			
5 mM NO_3^-	5,66 A	2,45 A	3,22 A	3,35 C			
15 mM NO_3^-	5,46 A	2,88 A	2,57 B	10,45 B			
30 mM NO_3^-	4,70 A	1,37 B	3,33 A	23,12 A			

Não houve variação nos teores de ureídeos totais em seiva de xilema, mas observou-se, novamente, inversão na forma de ureídeo translocado via xilema, onde o tratamento NO_3^- 30 mM apresentou os menores teores de alantoína (1,37 $\mu\text{moles/ml}$) e os tratamentos sem N e NO_3^- 15 mM apresentaram os menores teores de ácido alantóico (2,42 e 2,57 $\mu\text{moles/ml}$). Observou-se presença de nitrato em seiva de xilema de plantas tratadas com nitrato, onde o tratamento NO_3^- 30 mM apresentou os maiores teores (23,12 $\mu\text{moles/ml}$), seguido pelo tratamento NO_3^- 15 mM (10,45 $\mu\text{moles/ml}$) e, no tratamento NO_3^- 5 mM os valores foram mais baixos (3,35 $\mu\text{moles/ml}$). A presença de concentrações altas de nitrato em seiva de xilema dos tratamentos NO_3^- 30 mM e NO_3^- 15 mM evidencia, mais uma vez, a importância da parte aérea para a redução e assimilação de nitrato em *Calopogonium mucunoides*.

Estes experimentos reforçaram a hipótese de que *Calopogonium mucunoides* possui o mecanismo de fixação pouco afetado pela presença de nitrogênio mineral, de maneira que apenas altas concentrações de nitrato mostraram algum efeito sobre a fixação. Não observou-se abandono da nodulação em virtude do aumento na concentração de nitrogênio fornecido e, mesmo com exposição prolongada ao nitrato (21 dias) as plantas se mantêm noduladas e o metabolismo de ureídeos parece ser promovido em virtude do fornecimento de uma fonte “adicional” de nitrogênio, levando ao acúmulo de ureídeos nos tecidos.

5.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no padrão de aminoácidos solúveis totais: variações qualitativas

A alteração na fonte de nitrogênio fornecida não proporcionou uma resposta padrão na composição de aminoácidos em seiva de xilema e tecidos de *Calopogonium mucunoides*.

Em plantas que receberam nitrogênio antes e durante o período de inoculação, poucas alterações foram observadas no que se refere aos principais aminoácidos do metabolismo de nitrogênio (tabela 6).

Em função do seu envolvimento direto na assimilação das fontes de nitrogênio testadas, durante a apresentação dos dados serão abordados principalmente os aminoácidos Gln, Glu, Asn e Asp, substratos e produtos do processo de assimilação de nitrogênio. Desta forma, uma maior síntese de Gln ou Asn, como produtos da assimilação, envolverá o maior consumo de Glu e Asp, seus respectivos substratos.

Em seiva de xilema (tabela 6), observou-se um pequeno aumento nos teores de Asp em plantas que receberam nitrato e redução em plantas que receberam amônia, em comparação com plantas inteiramente dependentes da fixação. Por outro lado, estas alterações não apresentam uma relação direta com os teores de Asn em seiva de xilema, uma vez que os tratamentos NH_4^+ 15 mM e uréia 15 mM apresentaram os menores teores deste aminoácido, não havendo alterações expressivas no tratamento NO_3^- 15 mM, em comparação com plantas inteiramente dependentes da fixação.

Tabela 6: Influência da fonte de nitrogênio no teor de aminoácidos em seiva de xilema e em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. As plantas foram expostas à presença de nitrogênio antes da inoculação e cultivadas com a mesma solução durante 6 semanas. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 1. ND: não detectado.

Tratamento	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gaba	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
	Mol%																	
Folhas																		
sem N	3,63	16,57	4,55	ND	1,92	ND	ND	ND	4,83	7,12	28,36	0,75	1,07	2,54	2,94	11,73	7,08	6,82
NO ₃ ⁻ 15 mM	5,00	23,30	1,33	3,84	3,92	3,91	2,49	6,53	5,43	4,64	15,43	0,81	1,93	2,07	ND	4,78	5,66	8,91
NH ₄ ⁺ 15 mM	14,90	26,83	1,88	5,46	4,44	2,87	1,93	ND	8,44	3,55	11,73	1,79	3,40	2,29	1,10	2,81	2,86	3,73
uréia 15 mM	6,33	16,11	5,52	ND	2,62	ND	12,46	ND	4,84	6,14	11,84	0,19	0,18	0,31	5,84	11,07	8,50	8,07
Raiz																		
sem N	9,65	14,00	15,39	4,22	126	1,31	0,63	ND	4,30	1,34	23,56	1,16	2,21	0,05	4,31	1,79	11,20	3,61
NO ₃ ⁻ 15 mM	3,93	17,16	8,24	ND	1,96	2,66	1,37	ND	4,43	1,36	26,01	1,11	1,47	1,49	4,83	2,69	12,75	8,55
NH ₄ ⁺ 15 mM	6,91	10,34	5,96	ND	1,44	1,32	0,60	2,36	7,22	9,36	20,08	1,32	4,70	1,89	6,43	2,50	8,48	9,09
uréia 15 mM	4,38	7,28	5,67	ND	1,32	1,60	2,34	ND	11,50	8,09	22,80	1,11	2,65	3,38	2,34	4,88	11,67	9,01
Nódulos																		
sem N	5,64	9,89	5,92	18,55	3,06	0,91	1,84	4,97	1,47	2,82	10,32	0,57	2,70	6,00	6,62	4,73	7,76	6,23
NO ₃ ⁻ 15 mM	6,17	31,64	7,70	3,30	1,75	1,18	ND	3,13	3,79	7,28	4,33	1,47	4,19	2,14	2,80	1,63	9,48	8,04
NH ₄ ⁺ 15 mM	7,30	36,31	4,13	7,52	2,68	0,63	0,64	2,64	1,02	3,04	10,60	0,79	1,87	3,66	3,65	2,31	5,49	5,75
uréia 15 mM	19,21	36,54	0,87	2,73	3,13	2,24	ND	4,17	ND	ND	19,00	1,09	1,55	2,23	2,43	0,43	1,73	2,67
Seiva de Xilema																		
sem N	4,87	ND	8,80	ND	16,80	1,24	9,87	ND	2,48	1,53	18,18	0,48	1,42	2,35	4,33	9,77	12,23	5,65
NO ₃ ⁻ 15 mM	11,52	6,14	6,83	4,01	12,23	ND	0,44	ND	2,26	12,24	10,57	0,75	1,43	1,54	0,48	12,24	5,34	11,91
NH ₄ ⁺ 15 mM	1,81	2,60	1,82	7,13	10,09	4,89	6,57	9,02	1,11	2,87	23,26	0,46	0,83	0,95	13,82	4,52	0,87	7,39
uréia 15 mM	6,93	ND	2,97	17,19	18,53	ND	4,91	ND	2,25	10,35	8,79	0,43	0,74	1,28	5,29	10,23	6,94	3,17

Observou-se incremento nos teores de Glu nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, uma vez que este aminoácido não foi detectado em seiva de xilema de plantas inteiramente dependentes da fixação, comportamento que se repetiu no tratamento uréia 15 mM. Os tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM apresentaram uma pequena redução nos teores de Gln em seiva de xilema, o que pode estar correlacionado ao pequeno aumento nos teores de Glu nestes tratamentos.

De maneira geral, os aminoácidos glutamina e Gaba apresentaram-se como dos principais aminoácidos translocados via xilema, neste experimento. Por outro lado, os teores de Asn observados foram bastante reduzidos (na faixa de 1,8 a 8,8%), tendo em vista que em leguminosas em geral esta amida normalmente representa o principal aminoácido envolvido no transporte de nitrogênio pelo xilema. O aminoácido Gaba respondeu aos tratamentos com nitrogênio, apresentando redução nos tratamentos NO_3^- 15 mM e uréia 15 mM e um pequeno acréscimo no tratamento NH_4^+ 15 mM. Existe uma estreita relação metabólica entre Gaba e Glu, pois o Gaba é formado a partir da descarboxilação do Glu, e com exceção do tratamento uréia 15 mM, as alterações inversas observadas nos demais tratamentos podem estar relacionadas com esta relação metabólica. Outra alteração observada esteve a nível de Leu, o aminoácido mais abundante depois de Gaba e Gln no controle. A Leu foi reduzida em todos os tratamentos, atingindo os menores teores no tratamento NH_4^+ 15 mM, em comparação com plantas inteiramente dependentes da fixação.

Em nódulos (tabela 6), o aminoácido Asp sofreu uma forte elevação no tratamento uréia 15 mM, estando em torno de 19% do total de aminoácidos deste tecido; este aumento parece estar correlacionado à uma redução nos teores de Asn, que neste tratamento esteve abaixo de 1%. O aminoácido Glu apresentou grande elevação, de 9% no tratamento sem N, para acima

de 30% nos demais tratamentos, no entanto não observou-se correlação com os teores de Gln presentes, que não sofreram alteração em função da fonte de nitrogênio, estando em teores relativamente baixos, entre 1,75 e 3% neste tecido. Observou-se variações expressivas nos teores de Ser, que em sem N estava em torno de 18% e, nos tratamentos NO_3^- 15 mM e uréia 15 mM esteve em torno de 3%. O aminoácido Gaba apresentou forte redução no tratamento NO_3^- 15 mM, similar ao observado em seiva de xilema, mas no tratamento uréia 15 mM observou-se aumento neste tecido, ao contrário do que foi observado em seiva de xilema. Em comparação com os demais tratamentos, uréia 15 mM apresentou os menores teores para os aminoácidos Leu e Lys, 1,73 e 2,67%, respectivamente, aparentemente sem correlação direta com os teores observados em seiva de xilema. Em comparação com os dados de seiva xilema, houve inversão nos teores dos aminoácidos Gln e Glu, pois, enquanto o nódulo apresentou, no geral, teores elevados de Glu e reduzidos de Gln, em seiva de xilema foi observado o contrário.

Em raiz (tabela 6), observou-se redução nos teores de Asp em todos os tratamentos, sendo mais expressiva nos tratamentos NO_3^- 15 mM e uréia 15 mM, o que, aparentemente, não é possível correlacionar com os teores de Asn neste tecido, que também sofreu redução em todos os tratamentos que receberam nitrogênio em solução, em comparação com plantas inteiramente dependentes da fixação. O aminoácido Glu sofreu redução nos tratamentos NH_4^+ 15 mM e uréia 15 mM, mas o aminoácido Gln não sofreu alterações em resposta à fonte de nitrogênio, estando em torno de 1% em todos os tratamentos. O aminoácido Gaba apresentou-se acima de 20% neste tecido, estando entre os principais aminoácidos solúveis. O aminoácido Lys aumentou significativamente em resposta ao fornecimento de nitrogênio, estando em torno de 3% no tratamento sem N e em torno de 9% nos demais tratamento.

Em folhas (tabela 6), o aminoácido Asp apresentou grande incremento no tratamento NH_4^+ 15 mM, enquanto o aminoácido Asn sofreu grande redução nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM. Por outro lado, Glu elevou-se nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, estando acima de 20%, mas sem correlação direta com os teores de Gln neste tecido, que sofreu elevação nestes tratamentos, mas atingindo apenas 4% do total de aminoácidos solúveis em folha. Aparentemente, os teores de Glu e Gln observados em folhas, da mesma maneira que os observados em raiz e nódulos, não se correlacionam com os teores destes aminoácidos transportados via xilema, estando em proporções inversas às observadas em seiva de xilema.

O aminoácido Gaba, que esteve acima de 28% em plantas inteiramente dependentes da fixação, reduziu em resposta ao fornecimento de nitrogênio, estando entre 11,73 e 15,43% nos demais tratamentos, no entanto manteve-se entre os principais aminoácidos solúveis neste tecido. Outra alteração em resposta à fonte de nitrogênio esteve em relação a Ile, que reduziu bastante nos tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM.

No experimento seguinte, onde foram utilizadas plantas plenamente noduladas tratadas com nitrato por 21 dias, algumas alterações foram observadas (tabela 7), no entanto seguindo padrão diferente daquele observado para plantas tratadas com nitrogênio antes da inoculação.

Em seiva de xilema (tabela 7), ao contrário do observado para plantas tratadas com nitrogênio antes e durante a inoculação (tabela 6), não observou-se presença do aminoácido não-protéico Gaba, que esteve presente entre 8 e 23% no experimento anterior, ao mesmo tempo que os teores de Asn observados aqui foram bastante elevados (acima de 30%), enquanto no experimento anterior não ultrapassaram 8%.

Em plantas noduladas tratadas com nitrato por 21 dias (tabela 7), observou-se redução nos teores de Asp em resposta ao nitrato, enquanto os teores de Asn foram elevados em ambos

os tratamentos, ocorrendo um pequeno acréscimo no tratamento com nitrato. No entanto, em termos de comparação, os teores de Asp presente em seiva de xilema foram muito baixos, sendo de pouco mais de 4% no tratamento sem N.

Os teores de Glu em seiva de xilema foram muito baixos, da ordem de 2%. O aminoácido Gln sofreu redução em resposta ao nitrato, sendo de cerca de 20% em sem N e 11% em NO_3^- 15 mM. Esta alteração nos teores de Gln aparentemente não tem correlação com os teores de Glu, porém em função dos baixos teores de Glu uma redução expressiva não seria possível.

Em nódulos (tabela 7), os teores de Asp reduziram em resposta ao nitrato, de 11% em sem N, para 6,8%. Embora os teores de Asn neste tecido dobraram, estes foram muito baixos e, quantitativamente, não refletem a grande redução observada nos teores de Asp. Glu sofreu grande redução em resposta ao nitrato, de 22 para 9%, ao contrário do experimento anterior, enquanto Gln sofreu acréscimo, de menos de 0,5% para 5% em NO_3^- 15 mM. O aminoácido Gaba, que não foi detectado em seiva de xilema, esteve presente em nódulos, sofrendo redução em resposta ao nitrato, da mesma forma que no experimento anterior. Os aminoácidos Arg e Ala responderam ao nitrato incrementando de pouco mais de 2% em sem N para 6,69 e 7,83%, para Arg e Ala, respectivamente.

Tabela 7: Influência do nitrato no teor de aminoácidos em seiva de xilema e em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato por 21 dias. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 2. ND: não detectado.

Tratamento	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gaba	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
	Mol%																	
Folhas																		
sem N	4,91	9,87	2,71	ND	2,59	ND	3,89	3,75	3,60	14,36	7,10	6,82	7,75	5,35	3,70	10,16	6,02	7,42
NO₃⁻ 15 mM	4,96	3,67	2,34	2,34	5,15	ND	10,41	7,06	8,61	5,56	7,00	5,32	9,28	5,66	1,71	6,30	5,27	6,34
Raiz																		
sem N	12,55	18,29	1,47	7,82	ND	ND	3,56	ND	4,43	8,15	4,12	8,25	3,67	4,20	ND	9,97	7,43	6,08
NO₃⁻ 15 mM	9,68	11,55	2,13	9,68	8,27	ND	5,03	ND	ND	7,19	8,38	4,50	9,38	1,53	6,10	7,86	5,88	2,85
Nódulos																		
sem N	11,52	22,84	0,80	3,17	0,43	ND	1,01	ND	2,72	2,13	12,05	6,13	10,70	2,72	0,33	7,47	7,60	6,96
NO₃⁻ 15 mM	6,81	9,72	1,72	5,13	5,14	ND	3,53	3,43	6,69	7,83	6,31	9,25	5,46	6,51	5,55	6,09	6,88	3,94
Seiva de Xilema																		
sem N	4,20	2,54	32,66	2,05	19,94	3,13	3,48	7,51	0,75	3,98	ND	1,36	3,98	1,27	2,20	2,02	5,25	3,67
NO₃⁻ 15 mM	2,50	1,95	40,04	2,24	11,69	4,08	3,14	8,29	1,06	3,29	ND	ND	4,44	1,60	2,33	2,05	6,32	4,98

Em raiz (tabela 7), Asp respondeu de maneira similar ao observado para nódulos e seiva de xilema, apresentando uma pequena redução em resposta ao nitrato, de 12,55 para 9,68%; de maneira similar, Asn sofreu um pequeno acréscimo em resposta ao nitrato, mas esteve presente em teores muito baixos neste tecido, não ultrapassando 2,1%. O aminoácido Glu sofreu redução em resposta ao nitrato e, reciprocamente, Gln sofreu acréscimo neste tecido, não tendo sido detectado no tratamento sem N e estando pouco acima de 8% em NO_3^- 15 mM. O aminoácido não-proteico Gaba respondeu de maneira inversa ao observado em nódulos, sofrendo incremento em resposta ao nitrato, de 4 para 8%.

Em folhas (tabela 7), não houve alteração nos teores de Asp e Asn em resposta ao nitrato, estando ambos os aminoácidos em teores baixos, 4,9% para Asp e pouco mais de 2% para Asn. O aminoácido Glu sofreu redução, de 9,8% em sem N, para 3,6% em NO_3^- 15 mM, resposta recíproca para Gln, que elevou-se de 2,5 para 5,1% em resposta ao nitrato, embora estando em teores baixos neste tecido. Os aminoácidos Arg e Ala responderam de forma inversa à presença de nitrato, de maneira que houve acréscimo nos teores de Arg e redução em Ala (tabela 7). O aminoácido Gly, similarmente ao observado para nódulos e raiz, sofreu incremento, de 3,8 para 10,4% em plantas recebendo nitrato.

O experimento foi repetido, tendo em vista que o longo período de exposição ao nitrogênio mineral (21 dias) alterou os parâmetros de crescimento, o que não era desejado. Desta maneira, utilizou-se plantas plenamente noduladas expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia por 5 dias. Observou-se, em seiva de xilema (tabela 8), um perfil de aminoácidos um pouco diferente em relação ao experimento anterior (tabela 7). Principalmente, os teores de Gln e Asn, os dois aminoácidos mais abundantes no experimento

anterior, foram bem mais baixos. Houve também algumas diferenças na resposta ao tratamento com N mineral.

Os teores de Asn em seiva de xilema (tabela 8) aumentaram expressivamente com a adição de nitrogênio mineral, de 9,11% em plantas inteiramente dependentes da fixação, para 17,8 e 19 % em plantas recebendo nitrato e amônia, respectivamente. Esta resposta observada para Asn não apresentou correlação com o observado para Asp, que não sofreu variação expressiva em resposta à fonte de nitrogênio.

Os teores de Glu foram muito baixos, com um acréscimo quantitativamente pequeno em plantas recebendo nitrogênio; do mesmo modo, os teores de Gln observados foram baixos, com variação muito pequena.

Observou-se grande aumento nos teores de Arg em plantas que receberam nitrato, o que não foi observado no experimento anterior, de 5,6% em plantas inteiramente dependentes da fixação, para 14,5%. Incremento em resposta à presença de nitrogênio mineral também foi observado para os teores de Ala, que em plantas inteiramente dependentes da fixação esteve em torno de 10% e esteve em torno de 22% em NO_3^- 15 mM e 16,9% em NH_4^+ 15 mM.

Em nódulos (tabela 8), os teores de Asp diminuíram em resposta à presença de nitrogênio mineral, enquanto não observou-se alteração recíproca nos teores de Asn, que foram baixos em todos os tratamentos. O aminoácido Glu foi preponderante neste tecido, acima de 27% no tratamento sem N e apresentando um pequeno aumento em NO_3^- 15 mM, estando em torno de 32% neste tratamento; no entanto, como é característico para este tecido, os teores de Gln foram muito baixos, não apresentando resposta em nenhum tratamento em função da fonte de nitrogênio.

Tabela 8: Influência da fonte de nitrogênio no teor de aminoácidos em seiva de xilema e em tecidos de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 3. ND: não detectado.

Tratamento	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gaba	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
	Mol%																	
Folhas	17,21	37,01	0,31	4,61	0,13	ND	3,13	5,44	3,49	9,86	13,68	0,61	1,77	1,23	ND	ND	ND	1,52
sem N	11,23	35,89	1,25	6,56	1,06	ND	1,94	13,34	9,73	1,88	9,89	0,35	0,95	1,42	ND	4,02	ND	0,46
NO₃⁻ 15 mM	4,54	26,12	3,81	1,47	0,82	ND	1,93	13,97	8,53	4,86	15,43	0,07	3,87	1,53	ND	5,59	2,85	4,62
NH₄⁺ 15 mM																		
Raiz																		
sem N	3,46	7,52	2,99	4,16	1,90	ND	2,87	2,78	5,62	5,48	25,40	1,67	3,18	7,52	2,26	7,90	9,18	6,11
NO₃⁻ 15 mM	9,90	12,32	6,31	4,82	1,26	ND	1,24	ND	2,68	4,03	39,35	1,04	1,57	0,69	0,38	3,50	5,23	5,68
NH₄⁺ 15 mM	28,17	5,16	6,75	ND	0,32	ND	0,97	ND	9,47	2,21	37,07	2,93	0,64	0,91	ND	ND	0,94	4,48
Nódulos																		
sem N	9,62	27,75	4,23	1,43	0,63	1,05	3,63	4,47	3,28	3,15	16,07	3,58	ND	4,03	1,70	3,99	9,08	2,32
NO₃⁻ 15 mM	4,77	31,90	2,39	17,94	1,98	ND	1,63	7,25	1,27	2,38	12,63	0,80	1,25	1,12	0,73	3,76	6,37	1,82
NH₄⁺ 15 mM	2,74	28,19	3,85	27,46	1,52	ND	0,90	6,96	0,24	1,82	15,45	4,51	0,01	0,28	0,15	ND	4,44	1,42
Seiva de Xilema																		
sem N	2,91	0,21	9,11	1,95	3,23	1,39	0,94	0,33	5,60	10,32	ND	4,31	2,20	10,31	7,76	10,18	16,59	12,66
NO₃⁻ 15 mM	2,39	1,69	17,83	0,63	4,18	ND	3,03	ND	14,53	22,32	ND	0,05	0,71	ND	ND	4,41	17,95	10,27
NH₄⁺ 15 mM	3,62	3,41	19,07	1,28	3,39	1,82	6,14	0,90	7,35	16,93	ND	0,03	2,16	4,67	0,80	7,14	10,89	10,39

O aminoácido Ser apresentou grande incremento neste tecido em função da aplicação de nitrogênio mineral, de 1,4% em sem N, para 17,9 e 27,4% em NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, respectivamente; efeito semelhante não foi observado no experimento anterior. O aminoácido Gaba, que não foi detectado em seiva de xilema, apresentou-se entre os principais aminoácidos presentes, cerca de 16% em sem N, sofrendo pequeno decréscimo em NO_3^- 15 mM (tabela 8).

Em raiz (tabela 8), observou-se grande incremento nos teores de Asp, especialmente em plantas que receberam amônia, que apresentaram 28,17% do total de aminoácidos solúvel no tecido. Asn sofreu pequeno incremento em resposta ao nitrogênio mineral, de 3% em sem N, para pouco mais de 6% nos demais tratamentos, o que não foi possível correlacionar com o aumento de Asp observado no tecido. O aminoácido Glu aumento de 7%, em sem N, para 12% em NO_3^- 15 mM, ao contrário do observado no experimento anterior, enquanto o aminoácido Gln foi baixo em todos os tratamentos. O aminoácido Gaba foi o aminoácido preponderante presente neste tecido, sofrendo grande acréscimo em resposta ao nitrogênio mineral, atingindo 37 e 39% em NH_4^+ 15 mM e NO_3^- 15 mM, respectivamente.

Em folhas (tabela 8), os teores de Asp foram contrários aos observados em raiz, sofrendo decréscimo em resposta à aplicação de nitrogênio mineral (tabela 8), mas não ocorrendo aumento expressivo de Asn neste tecido, estando em teores baixos em todos os tratamentos, 0,3% em sem N e 3,8% em NH_4^+ 15 mM. Glu foi o aminoácido mais expressivo no tecido, acima de 35% em sem N e NO_3^- 15 mM, sofrendo redução no tratamento NH_4^+ 15 mM, mas sem correlação com os teores de Gln no tecido, que foi baixo em todos os tratamentos. O aminoácido não-proteico Gaba apresentou comportamento similar ao observado em nódulos, apresentando redução em resposta ao nitrato (tabela 8).

Em um experimento complementar foram estudadas concentrações crescentes de nitrato ou amônia, aplicadas durante 5 dias em plantas plenamente noduladas, do mesmo modo que no experimento anterior. Entretanto, ao contrário dos experimentos anteriores, foi analisado apenas seiva de xilema.

Observou-se um aumento nos teores de Asn (tabela 9) em plantas recebendo nitrato ou amônia, para todas as dosagens fornecidas, de 13% em plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N) para até 29%, em NO_3^- 15 mM, por exemplo; por outro lado houve redução nos teores de Asp em seiva de xilema, em plantas tratadas com 15 ou 30 mM de nitrato ou amônia, e uma pequena redução em plantas tratadas com NH_4^+ 5 mM. Ficou evidente, neste caso, que houve uma correlação direta entre a redução de Asp e aumento no teor de Asn.

Tabela 9: Influência da fonte e da concentração de nitrogênio no teor de aminoácidos em seiva de xilema de *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato e de amônia por 5 dias. A composição percentual corresponde à dosagem total de aminoácidos apresentada na tabela 4B. ND: não detectado.

Tratamento	Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Gaba	Tyr	Met	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
	Mol%																	
Seiva de Xilema																		
sem N	6,56	6,90	13,47	19,43	2,05	4,17	6,60	4,66	2,74	1,70	6,56	ND	1,07	4,01	1,51	2,25	9,36	6,96
5 mM NO₃⁻	6,78	3,87	20,11	5,19	1,22	4,54	4,72	ND	6,04	10,10	2,46	3,84	0,76	5,38	1,17	3,01	10,71	10,12
15 mM NO₃⁻	0,52	0,35	29,65	22,06	9,13	5,59	2,65	1,20	1,45	4,35	2,87	1,03	0,08	2,15	1,84	2,15	9,43	3,50
30 mM NO₃⁻	1,29	0,95	25,91	23,25	6,64	2,64	5,07	1,56	1,54	5,95	2,50	ND	ND	6,45	1,59	2,34	8,37	3,93
5 mM NH₄⁺	3,94	4,01	19,10	17,35	2,60	5,08	3,16	ND	8,06	7,75	2,03	0,83	ND	4,07	1,04	2,66	10,13	8,20
15 mM NH₄⁺	1,56	1,67	28,20	18,17	11,38	2,42	4,48	ND	1,57	1,12	2,54	ND	1,01	7,16	2,34	2,93	9,20	4,25
30 mM NH₄⁺	0,64	1,40	23,59	22,08	13,57	7,21	6,82	5,00	0,76	2,20	1,77	ND	2,66	1,90	ND	1,55	5,25	3,59

O aminoácido Glu sofreu redução em função da concentração de nitrogênio mineral, tanto em plantas tratadas com nitrato como amônia, sendo que a redução foi mais expressiva para as concentrações mais altas.

Da mesma maneira que ocorreu para os aminoácidos Asp e Asn, houve uma relação inversa entre Glu e Gln, pois nas concentrações mais elevadas de nitrogênio mineral os teores de Gln aumentaram para os tratamentos que receberam 15 ou 30 mM de nitrato ou amônia.

Quanto aos outros aminoácidos, a Arg apresentou aumento nos teores presentes em seiva de xilema em plantas recebendo 5 mM de nitrato ou amônia, porém não em concentrações mais elevadas de nitrogênio. A Ala aumentou em todos os tratamentos com nitrato e no tratamento NH_4^+ 5 mM, sendo mais expressivo neste último e no tratamento NO_3^- 5 mM. Por outro lado, houve redução no teor de Lys nos tratamentos com 15 ou 30 mM de nitrato ou amônia e um pequeno aumento nos tratamentos com 5 mM de nitrato ou amônia.

O aminoácido não-proteico Gaba que não foi detectado em seiva de xilema nos experimentos anteriores em que plantas noduladas foram expostas ao nitrogênio mineral (tabelas 7 e 8), aparece em baixas concentrações em todos os tratamentos, sendo ligeiramente maior no tratamento sem N (tabela 9).

6. DISCUSSÃO

6.1 Efeito do nitrogênio sobre a nodulação

O cultivo de plantas de *Calopogonium mucunoides* recebendo nitrogênio em solução antes e durante a inoculação, não foi limitante à formação de nódulos, uma vez que todos os tratamentos apresentaram nodulação efetiva. De forma geral, não houveram variações estatisticamente significativas entre os tratamentos, em relação ao número e massa dos nódulos, com exceção do tratamento com nitrato onde o número de nódulos foi de quase metade do número encontrado nos demais tratamentos (tabela 1). Por outro lado, a massa nodular não foi afetada, não havendo, portanto, um efeito acentuado sobre o processo de nodulação em relação à fonte de nitrogênio. Isto evidencia que, em *Calopogonium mucunoides*, ocorre o oposto do que já foi observado em soja, onde ocorre maior diminuição na massa de nódulos do que no número (Sodek & Silva, 1996).

Muitos autores reportam que nitrato afeta vários eventos da nodulação, desde a inibição da deformação do pêlo radicular (Truchet & Dazzo, 1982), inibição da iniciação da infecção e divisão das células corticais (Majjik et al., 1987), redução do número e distribuição dos sítios de ligação de lectinas recém-sintetizadas (Sherwood et al., 1984), inibição da formação do cordão de infecção (Munns, 1968; Malik et al., 1987) e aumento do número de infecções abortadas (Munns, 1977, citado por Streeter, 1988). Puiatti (1997) infere que, em soja, o nitrato pode ter atuado afetando um ou mais destes eventos.

Embora citado que o NO_3^- (>2 mM) inibe o crescimento do nódulo, em soja (Streeter, 1981; Eardly et al., 1984, citado por Streeter, 1988; Sodek & Silva, 1996), em *Calopogonium mucunoides* não houve variação na massa dos nódulos entre os tratamentos, mesmo

considerando-se que a concentração de nitrogênio fornecida foi elevada, 15 mM. Puiatti (1997) observou que, em soja, concentrações da ordem de 5 mM de nitrato inibiam a nodulação, quando cultivadas em hidroponia, ao passo que, em concentrações mais baixas, por exemplo a 1,5 mM, estimulou a nodulação e a massa nodular em plantas inoculadas e cultivadas em hidroponia. No presente trabalho, com *Calopogonium mucunoides*, utilizou-se concentrações de 15 mM de nitrato, 3 vezes maiores do que as concentrações consideradas baixas por Puiatti (1997) e que tinham efeito inibitório em soja, de maneira que, em *Calopogonium mucunoides*, o efeito do nitrogênio sobre a massa nodular foi nulo.

Puiatti (1997) observou, em soja, que plantas cultivadas em vermiculita apresentaram pouca inibição da nodulação pelo nitrato, a concentrações de 5 mM, e a massa nodular não foi alterada; no entanto concentrações semelhantes de nitrato tiveram efeitos drásticos em hidroponia.

Conforme citado por Puiatti (1997), uma possível explicação para este menor efeito inibitório de NO_3^- em vermiculita, seria o menor contato direto entre NO_3^- e raiz e/ou nódulo, uma vez que, diferentemente da hidroponia onde estas estruturas estão em tempo permanente expostas ao NO_3^- da solução nutritiva, em vermiculita parte desse estaria retido entre os grânulos da argila e parte poderia ter sido perdida por lixiviação em razão da alta CTC (Capacidade de Troca Catiônica) da argila e da carga negativa do NO_3^- ; além disso, como a absorção de N pelas plantas depende da concentração de nitrato no meio, essa é muito mais intensificada em hidroponia do que em meio sólido. Esses fatores, de certa forma, funcionariam como atenuador da concentração de NO_3^- ao qual as raízes e nódulos estariam expostos, indo de encontro com as colocações de Hinson (1975) e Eaglesham (1989), de que o efeito do NO_3^- na nodulação é um mecanismo predominantemente “raiz-localizado” e não ligado ao status de N na “planta-toda”.

No entanto, no presente trabalho com *Calopogonium mucunoides*, utilizou-se concentrações de 15 mM de nitrogênio em solução, e, dado que o tempo de exposição ao nitrogênio foi prolongado, esta hipótese de que a vermiculita poderia minimizar o efeito da exposição ao nitrato não poderia se aplicar aqui, já que, novas doses estariam sendo aplicadas antes de que o efeito da dose anterior “desaparecesse” por lixiviação.

Diferentemente do nitrato, as demais fontes de nitrogênio utilizadas no presente trabalho, não tiveram influência nenhuma quanto ao número de nódulos formados ou a sua massa, não havendo variação em relação ao controle (tabela 1).

Dados semelhantes foram encontrados em outros estudos. Em *Vigna mungo*, diferentes genótipos foram avaliados quanto à nodulação e à fixação em presença de uréia, tendo sido observado que os genótipos avaliados nodularam e apresentaram fixação satisfatória em presença desta fonte de nitrogênio (Singh & Usha, 2002). Esta resposta de nodulação e fixação em presença de uréia é similar à observada no presente trabalho, uma vez que não houve alteração na massa dos nódulos em plantas que receberam uréia, em comparação com o controle (sem N) e, da mesma maneira, não ocorreu redução nos teores de ureídeos translocados via xilema. Em plantas de soja que receberam amônia, concentrações da ordem de 10 mM tem efeito inibitório tanto na nodulação quanto na fixação, ao passo que concentrações menores (entre 1-3 mM) apresentaram efeito positivo na nodulação e N-fixação (Gan et al., 2004).

Já em plantas de *Pisum sativum*, em condições de salinidade, foi observado maior acúmulo de biomassa quando recebendo 5 mM de nitrogênio na forma de NH_4NO_3 , em relação a plantas que recebiam a mesma concentração de nitrogênio na forma de nitrato ou

amônia separadamente (Figueira & Caldeira, 2005). Figueira & Caldeira (2005) relataram que é possível estabelecer simbiose efetiva em *Pisum sativum* sob salinidade mediante o uso de um N-fertilizante apropriado.

Em *Vigna radiata* a relação entre nitrato no solo e nodulação não foi significativa; em condições de baixos teores de nitrato; no entanto *Vigna* não apresentou nodulação tão eficiente quanto soja apresentando cerca de 1/3 do número de nódulos observado em soja, o que parece estar relacionado não só ao efeito supressivo do nitrato, mas a baixos teores de *Bradyrhizobium* no solo (Herridge et al., 2005).

Em *Alnus maritima*, Laws & Graves (2005) observaram que plantas que receberam baixas concentrações de NH_4NO_3 formaram mais nódulos do que plantas que não receberam esta fonte adicional de nitrogênio; relataram também que a nodulação decaí linearmente de 0,25 a 4 mM de nitrato de amônia e que plantas recebendo de 4 a 8 mM de NH_4NO_3 não apresentaram nódulos, enquanto o fornecimento de 0,5 mM resultou em plantas vigorosas com cerca de 70 nódulos por planta.

Em *Lolium perenne*, o fornecimento de nitrogênio mineral atua estimulando a rebrota (Louahlia et al., 1999). Em *Crotalaria*, a presença de nitrogênio mineral estimulou o crescimento, quando comparado com plantas que não recebiam nitrogênio, ao passo que o nitrogênio mineral não inibia a nodulação, observando-se presença de nódulos independente da fonte de nitrogênio (Mendonça e Schiavinato, 2005). Em soja tratada com 1,0 e 5,0 mM de nitrato, observou-se aumento de massa fresca em folha e raiz, em comparação com plantas que não receberam nitrogênio (Arriagada & Cassini, 1994).

Em *Vigna unguiculata*, a aplicação de adubação nitrogenada no solo, na forma de uréia, afeta diversos parâmetros metabólicos, tais como nodulação, atividade de NR e conteúdo de nitrito em raiz e nódulos (Singh & Usha; 2003). Estudando 29 genótipos de *Vigna unguiculata* quanto à tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrogênio no solo, Singh & Usha (2003) observaram que 3 genótipos (EC-170442-3; EC-244390 e EC-240900) mantiveram a N-fixação efetiva, sem que a aplicação de nitrogênio causasse distúrbio ao sistema simbiótico, sendo que o genótipo EC-170442-3 nodulou e fixou N-atmosférico de maneira satisfatória mesmo sob aplicação de altos teores de nitrogênio.

Em *Calopogonium mucunoides*, a redução na nodulação em plantas que recebiam 15 mM de nitrato, não foi suficiente para se afirmar que houve inibição da nodulação, uma vez que não houve variação na massa dos nódulos quando comparado aos demais tratamentos. Por outro lado, concentrações muito abaixo das fornecidas neste experimento para *Calopogonium mucunoides* são suficientes para inibir o estabelecimento da nodulação em *Alnus maritima*, conforme observado por Laws & Graves (2005).

O nitrogênio presente no meio pode influenciar, além do processo de nodulação, a atividade de N-fixação. Desta maneira, uma alteração na atividade (total) da fixação de nitrogênio pode estar relacionada diretamente ao grau de nodulação mas, ao mesmo tempo, relacionada à atividade da nitrogenase independentemente de efeitos sobre o grau de nodulação. Verificar alterações no padrão de compostos nitrogenados translocados via xilema é uma maneira de avaliar a atividade assimilatória do nódulo, pois a translocação de ureídeos via xilema, compostos diretamente associados com a N-fixação, está intimamente relacionada com a taxa de N-fixação.

Vários são os trabalhos que demonstram uma relação estreita entre os teores de ureídeos translocados via xilema com a atividade de N-fixação (Atkins et al., 1980; Pate et al., 1980; Atkins et al., 1983; Drevon et al., 1988; Schubert, 1986; Streeter, 1988; Dakora et al., 1992; Bacanamwo & Harper, 1997; Bacanawmo & Purcell, 1999; Leidi & Rodríguez-Navarro, 2000; Amarante & Sodek, 2006) e que, consequentemente, os ureídeos do xilema podem ser usados como indicadores desta atividade (Herridge & Rose, 2000; Herridge et al., 2005). Nas leguminosas como soja (Puiatti, 1997; Amarante & Sodek, 2006) e outras leguminosas, como *Vigna* (Pate et al., 1992) e *Arachis* (Peoples et al., 1991), o nitrato causa uma grande redução nos teores de ureídeos no xilema, reflexo da inibição da fixação de N provocada pelo nitrato, enquanto ocorre aumento de NO_3^- nos exsudatos do xilema (Puiatti, 1997).

No caso de *Calopogonium mucunoides*, não houve variação nos teores de ureídeos totais translocados via xilema entre os tratamentos sem N (plantas inteiramente dependentes da nodulação), NH_4^+ 15 mM e uréia 15 mM (plantas recebendo amônia e uréia, respectivamente), no entanto NO_3^- 15 mM (plantas recebendo nitrato) apresentaram maiores teores de ureídeos totais em seiva, diferindo significativamente dos demais tratamentos (tabela 1). A ausência de redução nos teores de ureídeos translocados via xilema indica que a presença de nitrogênio no meio externo não influenciou na fixação, em *Calopogonium mucunoides*, uma vez que observou-se altos teores de ureídeos sendo translocados em seiva de xilema em todos os tratamentos avaliados.

Como não houve variação na massa dos nódulos entre os tratamentos, mas observou-se redução no número de nódulos em plantas que receberam NO_3^- 15 mM, neste caso não é possível correlacionar redução no número de nódulos à redução na N-fixação, uma vez que o nível de ureídeos em seiva de xilema, para este tratamento, foi superior ao observado, por exemplo, para plantas controle (sem N) (tabela 1).

Em soja, o nível de ureídeos decresce com o incremento no fornecimento de nitrogênio à planta (Osborne & Riedell, 2006), sendo que esta relação teor de ureídeos no xilema/atividade de N-fixação é considerada um bom indicador do status de fixação de nitrogênio pela planta (Kaushal et al., 2004). Por outro lado, foi relatado que em soja cultivares que apresentam melhor índice de N-fixação possuem também maior massa de nódulos (Zhang et al., 1997). Em *Calopogonium mucunoides*, a diminuição no número de nódulos em plantas que receberam nitrato não influenciou na massa dos nódulos, uma vez que não observou-se variação entre os tratamentos em termos de massa. Já no que compete ao índice de N-fixação, esta redução no número de nódulos no tratamento com nitrato não foi significativa para que ocorresse redução na taxa de fixação, uma vez que o nível de ureídeos translocados via xilema, indicativo da atividade de N-fixação, foi elevado também neste tratamento (tabela 1).

Em *Calopogonium mucunoides*, a manutenção da nodulação e os altos teores de ureídeos em seiva de xilema de plantas que receberam nitrogênio fixado em solução podem representar um indicativo de manutenção da fixação de nitrogênio pela planta em condições de exposição ao nitrogênio na forma de nitrato, amônia ou uréia. Em plantas que receberam 15 mM de nitrato, por exemplo, onde houve redução no número de nódulos, os teores de ureídeos totais translocados via xilema foram superiores aos demais tratamentos (tabela 1).

Por outro lado, o fluxo de nitrogênio fixado é responsável pela manutenção da fixação e a redução no mesmo está associada ao processo de redução/abandono da fixação (Smith et al.; 2002). Em todos os tratamentos, observou-se transporte de compostos nitrogenados oriundos da fixação, ureídeos, em seiva de xilema de *Calopogonium mucunoides*. Os maiores teores observados, para ureídeos totais, foram em NO_3^- 15 mM, enquanto os demais tratamentos não

diferiram entre si. Isto está de acordo com uma nodulação efetiva em todos os tratamentos, pois não houve inibição da nodulação independente da fonte de nitrogênio mineral presente.

No entanto, uma variação nos teores de aminoácidos solúveis totais foi observada no tratamento NH_4^+ 15 mM, que apresentou menores teores deste metabólito em seiva de xilema, em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si (tabela 1).

Além dos efeitos das fontes de nitrogênio sobre a nodulação e o transporte de N no xilema, foram também avaliados os tecidos dessas plantas quanto ao conteúdo de compostos nitrogenados e algumas enzimas do seu metabolismo. A atividade da enzima nitrato redutase foi avaliada, tendo em vista ser esta uma enzima tipicamente induzida pelo substrato (Tischner, 2000), de maneira que, em plantas que não recebiam nitrato (plantas controle e plantas recebendo amônia ou uréia), a presença de NR em folhas, por exemplo, sugere a presença de uma isoforma constitutiva da enzima (Andrews et al., 1990), enquanto que em plantas recebendo nitrato (NO_3^- 15 mM) o aumento na atividade de NR pode ser correlacionado com a absorção e transporte de nitrato pela planta, aumentando assim a redução e metabolismo deste.

Em folhas, NO_3^- 15 mM apresentou a maior atividade da enzima nitrato redutase, o que condiz com o fato de ser esta uma enzima induzida pelo substrato (Tischner, 2000); por outro lado, a atividade de NR em folhas e raiz dos demais tratamentos (controle e plantas recebendo nitrogênio na forma de amônia ou uréia) estão próximas ao descrito como atividade de uma isoforma residual ou constitutiva, comum em leguminosas principalmente da tribo Phaseolae (Andrews et al., 1990; Aidar et al., 2003).

A atividade da enzima alantoinase, responsável pela transformação de alantoína em ácido alantóico e início do catabolismo de ureídeos, foi maior em folhas nos tratamentos NO_3^- 15 mM, não apresentando variação significativa comparado a NH_4^+ 15 mM, mas ambos

diferindo significativamente de sem N e uréia 15 mM (tabela 1). No entanto, não é possível correlacionar a atividade da enzima alantoinase ao teor de ureídeos presente neste tecido, uma vez que, seria esperado que no tratamento/tecido onde se observou maior atividade, a concentração de alantoína seria menor e/ou a concentração de ácido alantóico seria maior. Os teores de alantoína e ácido alantóico observados em folhas não foram correspondentes aos de atividade da enzima alantoinase, uma vez que os tratamentos não diferiram entre si para os teores de alantoína, embora a atividade da enzima alantoinase tenha sido maior em plantas recebendo nitrato e amônia; por outro lado, uréia 15 mM apresentou os maiores teores de ácido alantóico e menor atividade da enzima alantoinase, enquanto NH_4^+ 15 mM apresentou os menores teores de ácido alantóico e maior atividade da enzima, comportamento inverso ao esperado.

Hussain et al. (1992) relata que, em soja, no cultivar nts1007, a aplicação de nitrogênio reduziu os teores de alantoína em caule e raiz; no entanto, em *Calopogonium mucunoides*, esta relação não ocorre, uma vez que o tratamento sem N está entre os que apresentaram os menores teores de alantoína nestes tecidos.

Em soja, no cultivar nts1007 com tendência à hipernodulação, os teores de alantoína são muito elevados, especialmente em nódulos; esta alta concentração foi atribuída ao aumento da fixação pela super-abundância na nodulação. Neste mesmo cultivar, quando nitrogênio foi aplicado como fonte externa, os teores de alantoína decrescem, em caule e raiz (Hussain et al., 1992). Em *Calopogonium mucunoides*, os maiores níveis de alantoína observados em nódulos estiveram no tratamento uréia 15 mM, enquanto que as plantas controle (sem N) apresentaram os menores teores deste metabólito em nódulos; no entanto, os tratamentos não diferiram entre si para número e massa de nódulos, inversamente ao proposto por Hussain et al. (1992), de

que o aumento na nodulação estaria relacionado ao aumento nos teores de alantoína em nódulos.

Os teores de ureídeos totais observados em folhas de *Calopogonium mucunoides* mantiveram-se entre 3 e 5 $\mu\text{moles/gMF}$, não diferindo estatisticamente entre os tratamentos (tabela 1). Estes valores são superiores aos observados por Ramos et al. (2005) em folhas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (considerado menos eficiente), mas são inferiores aos observados para soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* (considerado mais eficiente). Por outro lado, os teores de ureídeos observados em nódulos de *Calopogonium mucunoides*, da ordem de 12 a 16 $\mu\text{moles/gMF}$, são similares aos observados para soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*, em se tratando de plantas bem irrigadas (Ramos et al., 2005).

Em raiz, a maior atividade da enzima alantoinase, responsável pela degradação de alantoína em ácido alantóico, foram observados no tratamento NH_4^+ 15 mM. Da mesma maneira que o observado em folhas, não há correlação entre os teores de ácido alantóico observados e a atividade da enzima alantoinase neste tecido, uma vez que não observou-se variação nos teores de ácido alantóico entre os tratamentos, ao passo que houve maior atividade da enzima alantoinase no tratamento NH_4^+ 15 mM (tabela 1).

Em nódulos, o tratamento uréia 15 mM apresentou a maior atividade da enzima alantoinase, mas também não houve correlação entre esta atividade e os teores de ureídeos no tecido, uma vez que, neste tratamento, ocorreram os maiores teores de alantoína, onde seria esperado que houvesse uma relação inversa, uma vez que a enzima degrada alantoína em ácido alantóico. Por outro lado, também não houve incremento nos teores de ácido alantóico que estiveram entre os mais baixos, ao lado do tratamento controle (sem N), enquanto os

tratamentos NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM apresentaram teores superiores deste metabólito, mas menor atividade da enzima alantoinase (tabela 1).

Em feijão comum, a presença de nitrogênio mineral inibiu a nodulação, mas quando presente em baixos teores, o efeito inibitório podia ser revertido pela presença de fósforo (Leidi & Rodríguez-Navarro; 2000). Foi relatado também que o aumento na atividade de NR em nódulos parecia estar relacionado à inibição da fixação e, posteriormente, da nodulação (Leidi & Rodríguez-Navarro; 2000). Em *Calopogonium mucunoides*, a atividade de NR em nódulos não mostrou ser estimulada por nitrogênio mineral, em nenhum dos tratamentos, mostrando-se sempre em torno de 0,2 μmoles de nitrito formado/gMFh (tabela 1), o que sugere, em função da ausência de um efeito positivo do nitrato, apenas a presença de uma isoforma constitutiva da enzima (Andrews et al., 1990), coerente com a manutenção da fixação em plantas crescendo em presença de nitrogênio mineral, inferida pelos altos teores de ureídeos presentes em nódulos e translocados via xilema.

A assimilação de nitrato em plantas noduladas de *Vigna unguiculata* pode atuar como fonte adicional de nitrogênio na fase reprodutiva, sendo a espécie tolerante a teores moderados de nitrato, da ordem de 5 mM (Silveira et al., 2001). A nodulação e manutenção da fixação em *Calopogonium mucunoides* em presença de nitrogênio mineral, e a absorção, translocação e redução de nitrato em plantas noduladas, pode estar atuando como uma fonte complementar à planta, uma vez que alguns parâmetros, como, por exemplo, a concentração de ureídeos em nódulos, foram superiores em plantas recebendo nitrogênio mineral, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação.

O acúmulo de ureídeos em tecidos, como folhas e nódulos é reportado como fator que desencadeia o abandono da fixação em soja em condições de seca (Sinclair et al., 2003;

Purcell et al., 2004; King & Purcell, 2005), no entanto plantas de *Calopogonium mucunoides*, em condições de boa irrigação, não houve redução nos teores de ureídeos em tecidos de plantas que receberam nitrogênio em solução, em comparação com o controle (sem N), e as plantas se mantiveram noduladas e com o mecanismo de fixação ativo (inferido pelos teores de ureídeos translocados em seiva de xilema), o que aparentemente difere da hipótese de que o aumento nos teores de ureídeos em tecidos estaria envolvido com o abandono da fixação, para esta espécie.

Em soja, observou-se um maior acúmulo de massa fresca e conteúdo de nitrogênio em folhas e raiz de plantas tratadas com nitrato entre 1,0 e 5,0 mM, em comparação com plantas que não recebiam nitrogênio (Arriagada & Cassini, 1994); no presente trabalho, com *Calopogonium mucunoides*, não observou-se alterações em termos de massa em plantas que recebiam nitrato (em comparação com o controle), no entanto, plantas que receberam amônia apresentaram acúmulo em termos de MF em folhas e raiz, sendo que, em raiz, também observou-se acúmulo de massa no tratamento que recebeu uréia. Arriagada & Cassini (1994) também relataram que quando o nitrogênio é removido por 27 dias, a massa fresca de nódulos aumenta e esta reduz com a aplicação de nitrato; no entanto, observaram que a atividade da enzima nitrato redutase reduz quando o nitrato é removido por 27 dias. Por outro lado, a aplicação de nitrogênio como fertilizante inicial acelera o crescimento em soja, mas tem impacto negativo na fixação (Osborne & Riedell; 2006). Já em ervilha, há relatos de que a nodulação com *Rhizobium* acelera a senescência de folhas (Palma et al.; 2006).

A partir deste experimento, pode-se concluir que o fornecimento de nitrogênio para *Calopogonium mucunoides* antes e durante o período de nodulação não gerou uma resposta negativa em relação à nodulação, ao contrário da maioria das espécies reportadas na literatura.

Por outro lado, os altos teores de ureídeos, tanto translocados via xilema, quanto presentes em tecidos, indicam a manutenção do processo de fixação mesmo em presença de uma fonte externa de nitrogênio.

6.2 Efeito do nitrogênio mineral sobre a fixação

6.2.1 Efeito do tempo de exposição

As informações obtidas com plantas cultivadas recebendo nitrogênio antes e durante a inoculação (6.1) indicaram que a espécie estudada não é sensível à presença de nitrogênio no meio, no tocante à nodulação, uma vez que não houve variações em termos de massa de nódulos em plantas que receberam nitrogênio, quando comparadas ao controle (sem N).

No entanto, a exposição ao nitrogênio afeta o processo de simbiose por duas maneiras; afetando a formação dos nódulos, o que pode ocorrer em diversas fases do processo de nodulação (Truchet & Dazzo, 1982; Majjik et al., 1987; Sherwood et al., 1984; Munns, 1968; Malik et al., 1987; Munns, 1977; Streeter, 1988), e afetando a fixação em si, até culminar com a substituição do processo de fixação pela absorção e assimilação do nitrogênio (Oghoghorie & Pate, 1971; Matsumoto et al., 1977; Pate et al., 1979, 1980; Paterson & Larue, 1983; McNeil & Larue, 1984).

Pate et al. (1981) sugere que o NO_3^- atua inibindo a formação de uma segunda população de nódulos; sendo o fato relatado por Puiatti (1997) como de ocorrência normal em soja, além de atuar inibindo o crescimento dos nódulos já formados, não alterando, dessa forma, o peso específico do nódulo. Isso sugere que, na associação simbiótica em soja, a

atividade do nódulo é mais sensível ao efeito inibitório de NO_3^- do que a própria nodulação, confirmando o sugerido por Streeter (1988).

No presente trabalho, quando plantas plenamente noduladas foram expostas à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato, por 21 dias, observou-se que houve alteração quanto ao acúmulo de massa, sendo que plantas noduladas recebendo nitrogênio mineral na forma de nitrato (NO_3^- 15 mM) apresentaram maiores valores para MF e MS de folhas, entretanto não houve variação significativa em raiz. O tratamento NO_3^- 15 mM apresentou menor MF e MS de nódulos, mas maior número de nódulos, indicando que nódulos menores estavam presentes neste tratamento, contra nódulos maiores em plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N) (tabela 2). Este comportamento foi diferente do observado quando plantas de *Calopogonium mucunoides* foram submetidas à exposição ao nitrato antes da inoculação, onde não houve redução da massa fresca total de nódulos, mas houve redução no número dos mesmos, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação (ver 6.1); por outro lado, em soja foi observado comportamento similar a este, quando plantas que recebiam nitrato apresentavam redução na massa dos nódulos, apresentando presença de nódulos menores, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação (Sodek & Silva, 1996).

Observou-se aumento em termos de massa total, em folhas e raiz de plantas de *Calopogonium mucunoides* tratadas com NO_3^- 15 mM, o que pode ser devido ao fato de que a nodulação foi mantida (tabela 2), e o nitrogênio mineral pode estar atuando como fonte adicional de nitrogênio, conforme sugerido por Silveira et al. (2001), onde teores moderados de nitrato eram assimilados por plantas noduladas de *Vigna unguiculata* e atuava como fonte adicional de nitrogênio durante o período reprodutivo.

Em soja, em condições de alagamento, o decréscimo na fixação é maior do que o acúmulo de biomassa (Bacanamwo & Purcell, 1999). A adição de nitrato contribui para a redução da sensibilidade do sistema de fixação ao alagamento, o que aparentemente provém tolerância do sistema de N-fixação, uma vez que plantas inteiramente dependentes da fixação mostram-se mais sensíveis ao alagamento do que as que são suplementadas com nitrogênio inorgânico antes da inoculação (Bacanamwo & Purcell, 1999).

Em *Calopogonium mucunoides*, quando reduziu-se o período de exposição de plantas noduladas ao nitrogênio mineral para 5 dias, esta variação em termos de massa entre sem N e NO_3^- 15 mM deixou de existir, mostrando que este tempo de exposição não afetou os parâmetros de crescimento, no entanto MS de nódulos de NO_3^- 15 mM apresentou menores valores, diferindo significativamente de sem N, mas não houve variação significativa em MF e quanto ao número de nódulos (tabela 3). Por outro lado, plantas expostas ao nitrogênio mineral na forma de amônia (NH_4^+ 15 mM) pelo mesmo período, 5 dias, apresentaram alterações no padrão de crescimento, diferindo significativamente de sem N e NO_3^- 15 mM quanto a MF e MS de folhas e raiz, e quanto a MF de nódulos, mas não apresentando diferença significativa quanto a MS de nódulos em relação a sem N, ambos diferindo de NO_3^- 15 mM (tabela 3).

Em soja, foi observado que ocorria redução na massa fresca de nódulos e na N-fixação, pelo método de redução de acetileno, em plantas recebendo 5 mM de NO_3^- , em relação a plantas que não recebiam nitrogênio ou plantas que recebiam 1 mM de NO_3^- (Yashima et al., 2005). Por outro lado, estes autores relataram que baixas concentrações de nitrato promovem a nodulação e a N-fixação. O efeito inibitório de 5 mM de nitrato ou o efeito promotor de 1 mM de nitrato não é diretamente controlado pelo nitrato em si, mas possivelmente pelo C ou N requerido pela planta (Yashima et al., 2005).

Em soja, muitos estudos reportam para o fato de que nitrato é o maior inibidor da simbiose soja-*Bradyrhizobium*, segundo Gan et al. (2004), que verificaram o efeito sobre o crescimento, nodulação e capacidade de N-fixação durante todo o ciclo de crescimento em soja recebendo nitrogênio mineral da ordem de 10 mM na forma de nitrato, amônia ou nitrato de amônia. Esses autores relataram que ambas as fontes suprimem significativamente o número de nódulos, massa fresca, e N₂ total fixado pela planta; no entanto, plantas que recebiam apenas amônia foram mais eficientes no acúmulo de biomassa, massa fresca de nódulos, acúmulo de N total e N₂ fixado.

Fujikake et al. (2003) observaram que o incremento no diâmetro de nódulos de soja cessa um dia após exposição a 5 mM de nitrato, enquanto em ausência de nitrato os nódulos crescem rapidamente. Por outro lado, o efeito inibitório de nitrato foi parcialmente reduzido pela adição de 3% de sacarose ao meio. Observaram também que 5 mM de nitrato estimulou a translocação e distribuição de carbono, e que o carbono em nódulos decresce de 9 para 4% com a adição de 5 mM de nitrato. O decréscimo no suprimento de fotoassimilados para os nódulos pode estar envolvido na rápida e reversível inibição do crescimento de nódulos de soja pela presença de nitrato (Fujikake et al., 2003).

Fujikake et al. (2002) já haviam relatado que 5 mM de nitrato suprimia o crescimento de nódulos de soja e que o crescimento era recuperado ao se suprimir o fornecimento de nitrato. Também relataram que plantas que receberam nitrato e tiveram o fornecimento suprimido apresentaram maior atividade de redução de acetileno pela enzima nitrogenase do que plantas que não foram tratadas com nitrato (0 nitrato), o que possivelmente estaria relacionado ao aumento de fotoassimilados.

O efeito do nitrogênio sobre a N-fixação pode ser mensurado com base nas alterações dos compostos translocados via xilema. Muitos autores relatam que existe uma relação estreita entre os teores de ureídeos translocados via xilema com a atividade de N-fixação (Atkins et al., 1980; Pate et al., 1980; Atkins et al., 1983; Drevon et al., 1988; Schubert, 1986; Streeter, 1988; Dakora et al., 1992; Bacanamwo & Harper, 1997; Bacanawmo & Purcell, 1999; Leidi & Rodríguez-Navarro, 2000; Amarante & Sodek, 2006), o que permite que os teores de ureídeos do xilema possam ser usados como indicadores desta atividade (Herridge & Rose, 2000; Kaushal et al., 2004; Herridge et al., 2005).

Em ervilha (*Pisum sativum* L.) foi observado que, em condições de salinidade, os teores de ureídeos em seiva de xilema apresentam acréscimo em plantas tratadas com amônia (Zdunik-Zastocka & Lips, 2003).

Puiatti (1997) observou que, plantas de soja adultas (já noduladas), ao serem expostas ao NO_3^- , tanto em hidroponia quanto em vermiculita, apresentaram, nos exsudatos do xilema, acentuada diminuição no teor de ureídeos totais e aumento no teor de NO_3^- , sendo que o efeito negativo de NO_3^- na atividade fixadora de N_2 do nódulo foi mais pronunciado em hidroponia, em meio líquido, do que em vermiculita. Esses resultados evidenciam que o NO_3^- é um potente inibidor da atividade da N_2 ase (Gibson & Harper, 1985; Drevon et al., 1988; Streeter, 1988; Eaglesham, 1989) e que a planta quando submetida a escolha entre o N combinado e N_2 da fixação, “prefere” o primeiro (Wery et al., 1986). No entanto, em *Calopogonium mucunoides*, a exposição ao NO_3^- 15 mM levou à redução nos teores de ureídeos translocados via xilema, quando comparado ao tratamento sem N, quando as plantas foram expostas ao nitrato por 21 dias (tabela 2), mas esta redução foi muito menor à relatada por Puiatti (1997)

para plantas de soja. Por outro lado, não houve variação significativa nos teores de aminoácidos totais translocados via xilema. Em tecidos, NO_3^- 15 mM mostrou maiores teores de ureídeos em todos os tecidos avaliados, diferindo significativamente de sem N, estando, em folhas, próximos aos relatados por Ramos et al. (2005) para plantas de soja em condições de boa irrigação.

Este acúmulo de ureídeos em tecidos de plantas que receberam nitrato parece ocorrer pelo fato de não haver abandono da fixação biológica por NO_3^- 15 mM e existir uma fonte adicional de nitrogênio no sistema, pela absorção de nitrogênio mineral na forma de nitrato.

A presença de nitrato em seiva de xilema de plantas de *Calopogonium mucunoides* que receberam NO_3^- 15 mM mostra que, não só o nitrato foi absorvido, como está sendo translocado para a parte aérea, conforme já proposto por Atkins et al. (1980). A importância da parte aérea na assimilação de nitrato, parece ser corroborada pela alta atividade de nitrato redutase em folhas de NO_3^- 15 mM. Em soja, quando plantas são submetidas a receber nitrato, ocorre também aumento nos teores de nitrato em seiva de xilema, no entanto a redução nos teores de ureídeos é drástica, quando comparado a plantas controle (Puiatti, 1997), enquanto em *Calopogonium mucunoides* esta redução é bem menos expressiva.

O efeito da exposição ao nitrato foi refletido também em tecidos de *Calopogonium mucunoides* (tabela 2). Em nódulos, a presença de nitrato reduziu os teores de atividade de nitrato redutase, que mostravam-se próximos aos relatados por Giannakis et al. (1988) para plantas de soja que não estavam recebendo nitrato, sem N neste caso, indicando a presença de uma isoforma de NR constitutiva nesta espécie (Andrews et al., 1990). Leidi & Rodríguez-Navarro (2000) sugeriram que a atividade de NR em nódulos estaria relacionada com o abandono da fixação e inibição da nodulação, sendo esta hipótese levantada por Serraj et al.

(1992), que propôs que o aumento da atividade de NR em nódulos estaria envolvido no processo de “abandono” da fixação. No caso de *Calopogonium mucunoides*, a presença de nitrato não afetou a fixação e a nodulação foi mantida, por outro lado plantas que receberam nitrato não apresentaram atividade de redução de nitrato em nódulos, uma vez que a atividade de NR em nódulos de plantas recebendo nitrato (NO_3^- 15 mM) foi próxima de zero (tabela 2).

Ao contrário do observado para *Calopogonium mucunoides*, que mantém a nodulação e a N-fixação em presença de nitrato, mas que, nesta condição, ocorre diminuição da atividade de redução de nitrato em nódulos, Saxena et al. (1996) observou que, em lentilha, a tolerância a três teores de nitrato, de 0, 4 e 8 mM, está relacionada ao aumento da atividade de NR em nódulos, de maneira que plantas inoculadas com linhagens resistentes à presença de nitrato no solo apresentam maior atividade de NR em nódulos quando tratadas com maiores teores de nitrato.

A importância da raiz na assimilação de nitrato, em *Lotus japonicus*, revelou a importância de transportadores de baixa afinidade, em plantas crescendo sob nutrição com nitrato, mostrando que a biossíntese de prolina está envolvida neste processo, atuando como osmolito (Marquez et al., 2005).

Macduff et al. (2002) observaram que em plantas de *Trifolium repens* que estavam fixando e foram tratadas com nitrato apresentaram baixo transporte de nitrato em relação a plantas que não estavam fixando. O incremento no efluxo de nitrato e a baixa translocação de nitrato no xilema são colocadas como possíveis explicações para a baixa taxa de absorção e transporte (Macduff et al., 2002).

Singh e Usha (2003) reportam que o potencial de produção em áreas de cultivo de *Vigna unguiculata* é comprometido porque esta compete com não-leguminosas pelo nitrogênio do solo, oriundo da fertilização. Estudando 29 genótipos de *Vigna unguiculata* quanto à tolerância do sistema simbiótico à fertilização nitrogenada, Singh & Usha (2003) observaram que parâmetros tais como nodulação, atividade de NR em raiz e nódulos, e conteúdo de nitrito em raiz e nódulos são afetados pela aplicação de uréia, mas que 3 genótipos são capazes de manter a N-fixação sem que a aplicação de nitrogênio no solo cause distúrbio no sistema.

Em *Calopogonium mucunoides*, quando as plantas foram expostas ao nitrogênio mineral por 5 dias, não observou-se redução nos teores de ureídeos totais presentes em seiva de xilema, não havendo variação significativa entre os tratamentos, mas NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM apresentaram menores teores de alantoína em relação a sem N, enquanto NO_3^- 15 mM apresentou maiores teores de ácido alantóico em relação aos outros tratamentos. Aminoácidos solúveis totais presentes em seiva de xilema não variaram entre os tratamentos (tabela 3).

Por outro lado, a concentração de compostos nitrogenados provenientes da fixação, tais como ureídeos, são constantemente relacionados à manutenção da fixação (Smith et al., 2002) e que estes teores podem ser utilizados como importante indicador do status de N-fixação da planta (Kaushal et al., 2004; Herridge et al., 2005). Em *Calopogonium mucunoides*, plantas expostas ao nitrogênio mineral por 5 dias mantiveram a translocação de compostos de maneira que não houve variação significativa entre os tratamentos para aminoácidos solúveis totais e para ureídeos totais translocados via xilema (tabela 3). No entanto, o fato de as plantas de *Calopogonium mucunoides* obterem nitrogênio inteiramente pela fixação ou por uma fonte adicional de nitrato parece influenciar na forma de ureídeo translocado via xilema. Plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N) translocaram mais alantoína, enquanto plantas

obtendo nitrato (NO_3^- 15 mM) translocaram mais ácido alantóico, o que não é possível explicar por meio das informações disponíveis na literatura.

Em *Arachis hipogea*, a exposição ao nitrato por 5 dias induz redução na atividade da enzima nitrogenase, atuando principalmente como efeito externo, enquanto que após 30 dias de exposição, o conteúdo de nitrogênio nas raízes aumenta e ocorre inibição da nodulação e do desenvolvimento dos nódulos, ocorrendo portanto um efeito sistêmico (Daimon & Yoshioka, 2001).

Em *Hippophae rhamnoides*, a inibição da nodulação por NH_4NO_3 é sistêmica, afetando tanto o número de nódulos como a massa fresca total (Gentili & Huss-Danell, 2002). No entanto, o aumento no fornecimento de fósforo estimulou sistemicamente o número de nódulos e a biomassa e preveniu a inibição da nodulação por NH_4NO_3 ; por outro lado o estímulo por fósforo foi específico para nodulação, não sendo possível explicar se houve estímulo também na N-fixação

Tal como observado para seiva de xilema de plantas noduladas que receberam nitrogênio por 5 dias, em folhas de *Calopogonium mucunoides*, não observou-se variação significativa nos teores de ureídeos totais, mas NO_3^- 15 mM apresentou maiores teores de alantoína que os demais tratamentos. Já em raiz, sem N apresentou os menores teores de alantoína e NH_4^+ 15 mM apresentou os menores teores de ácido alantóico. Em nódulos, não houve variação significativa para os ureídeos totais e para alantoína, mas NH_4^+ 15 mM apresentou os menores teores de ácido alantóico e sem N apresentou os maiores. O tratamento NO_3^- 15 mM apresentou os maiores valores para aminoácidos totais em folhas e raiz, e não houve variação significativa em nódulos (tabela 3).

A redução nos teores de ureídeos totais presentes em tecidos e em seiva de xilema é expressiva em plantas de *Macrotyloma geocarpum* L. e de *Vigna subterranea* L. obtendo nitrato, quando comparadas a plantas inteiramente dependentes da fixação (Dakora et al., 1992), o mesmo ocorrendo para soja, mais especificamente observado em seiva de xilema (Puiatti, 1997; Amarante & Sodek, 2006). No entanto, não se observou a mesma redução em *Calopogonium mucunoides*, onde tecidos de plantas que receberam nitrato apresentaram maiores teores de ureídeos em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação (tabela 3). Em seiva de xilema, a redução observada é bem menos acentuada do que o relatado na literatura para outras espécies, como *Glycine max* (Vadez et al., 2000) e *Vigna subterranea* (Dakora et al., 1992).

Por outro lado, a inibição da fixação, em condições de seca, é relacionada por vários autores ao acúmulo de ureídeos em tecidos (Sinclair et al., 2003; Purcell et al., 2004; King & Purcell, 2005). No entanto, em *Calopogonium mucunoides*, em condições de boa irrigação, observou-se que quando plantas plenamente noduladas passam a obter uma segunda fonte de nitrogênio, na forma de nitrogênio mineral, ocorre um aumento nos teores de ureídeos em tecidos (tabelas 2 e 3), o que é mais evidenciado quando o tempo de exposição é aumentado (tabela 2), mas este acúmulo não inibiu a fixação ou a nodulação, uma vez que as plantas se mantêm noduladas e fixando, o que pode ser inferido pelos teores de ureídeos exportados via xilema.

6.2.2 Efeito da concentração de nitrogênio mineral fornecida

O efeito inibitório do nitrato sobre a fixação abrange não só o metabolismo de NO_3^- dentro do nódulo (Kanayama et al., 1990; Hunt & Layzell, 1993), como o efeito direto de NO_3^- na membrana, causando desestabilização dessa, alterando o transporte de ácidos dicarboxílicos (malato e succinato) através da mesma (Blumwald et al., 1985; Udvardi & Day,

1989; Bergensen & Turneer, 1993, citado por Vassileva & Igatov, 1996). Outra hipótese versa em torno de que o efeito de NO_3^- inibindo a atividade de fixação de N_2 pela N_2 ase pode estar mais associado com a limitação de O_2 para os bacteróides do que com o metabolismo de NO_3^- no nódulo, onde haveria a formação de uma possível barreira à difusão de O_2 no nódulo induzida pelo NO_3^- (Tayzell et al., 1990; Vessey & Waterer, 1992; Hunt & Layzell, 1993; Denison & Harter, 1995).

Serraj et al. (1992) propôs que há correlação entre o aumento na atividade de nitrato redutase em nódulos e a inibição da fixação. No presente trabalho, observou-se nos tópicos anteriores (6.1 e 6.2.1) que, em *Calopogonium mucunoides*, a manutenção da nodulação após a exposição ao nitrogênio ocorria independente da fonte de nitrogênio fornecida e que, para o caso específico do nitrato, a atividade da enzima nitrato redutase em nódulos foi reduzida a valores próximos a zero, após a exposição a este tratamento. O fato de não estar ocorrendo redução de nitrato em nódulos e a planta manter-se fixando nitrogênio, pode ter correlação com a hipótese proposta por Serraj et al. (1992), de que o “abandono” da fixação estaria aliado ao metabolismo de nitrato pelo nódulo; desta maneira, em o nitrato não sendo metabolizado pelo nódulo, não ocorreria o “abandono” da fixação.

A ausência de um efeito inibitório da fonte de nitrogênio, tanto na nodulação como da fixação em *Calopogonium mucunoides*, poderia estar relacionada à concentração da fonte de N usada nos experimentos. Entretanto, mesmo com a elevação da concentração de nitrato ou amônia a 30 mM, não houve queda no número ou MS e MF dos nódulos, sugerindo que a falta de sensibilidade à fonte de nitrogênio não parece estar relacionada à concentração (tabela 4A). Curiosamente, as plantas que receberam 15 mM de nitrato (NO_3^- 15 mM) e 15 mM de amônia

(NH_4^+ 15 mM) apresentaram menor MF de nódulos, porém quanto a número e MS de nódulos, não foram significativamente menores.

Alguns autores reportam para a existência de certa tolerância do sistema de fixação à presença de nitrato, no entanto todos estes relatos reportam para concentrações moderadas, significativamente menores do que as utilizadas nestes experimento com *Calopogonium mucunoides*. Em *Vigna unguiculata*, por exemplo, foi observada certa tolerância do sistema de fixação a concentrações moderadas de nitrato (da ordem de 5 mM) (Silveira et al., 2001). Em *Calopogonium mucunoides*, a concentração de nitrogênio mineral não reduziu severamente a nodulação, havendo variação em MF de nódulos para os tratamentos que receberam 15 mM de nitrato ou de amônia, o que não se repetiu para os tratamentos com as maiores concentrações de nitrogênio (30 mM) (tabela 4A).

Como já considerado anteriormente, o efeito do nitrogênio sobre a fixação é mais facilmente observado através das alterações nos compostos translocados via xilema. Quando tratadas com concentrações crescentes de nitrogênio na forma de nitrato ou amônia, plantas plenamente noduladas de *Calopogonium mucunoides* apresentaram algumas alterações nos compostos metabólicos translocados.

Em relação a ureídeos totais translocados via xilema, houve apenas pequenas variações em função da concentração da fonte de nitrogênio, mesmo entre as fontes, sendo que foi significativo o nível maior encontrado na seiva do xilema nos tratamentos NO_3^- 5 mM e NH_4^+ 15 (tabela 4B). Esta é uma demonstração clara de que as fontes de nitrogênio, mesmo em concentrações altas, não inibem a fixação de nitrogênio em *Calopogonium mucunoides*.

Em termos dos dois componentes dos ureídeos, alantoína e ácido alantóico, houve algumas alterações significativas em relação não apenas a concentração da fonte usada, mas

também com a natureza da fonte. Quando tratadas com amônia, as plantas apresentaram uma relação alantoína/ácido alantóico bastante alta (acima de 4), enquanto que em plantas recebendo nitrato, esta relação foi em torno de 1, a não ser na concentração mais alta (30 mM) quando caiu bastante (aproximadamente 0,5) (tabela 4B). O significado dessas mudanças, entretanto, não tem explicação no momento. Por outro lado, estas alterações também foram observadas nos tecidos dessas plantas (tabela 4A).

Em nódulos, os teores observados para ácido alantóico foram muito mais altos do que alantoína, com exceção de plantas controle e plantas recebendo 5 mM de nitrato, onde as duas formas de ureídeo presente apresentaram concentrações similares (tabela 4A). Estes teores são contrários aos observados em seiva de xilema, por exemplo, onde havia uma relação bastante clara entre a fonte de nitrogênio (amônia ou nitrato) e a forma de ureídeo (tabela 4B).

Já em raiz, o comportamento é similar ao observado em seiva de xilema, onde a relação alantoína/ácido alantóico é maior em plantas que receberam amônia, enquanto em plantas controle (sem N) e plantas que receberam nitrato, independente da concentração, as duas formas de ureídeo estão presentes em concentrações semelhantes.

Por outro lado, em folhas, não houve uma relação direta entre a fonte de nitrogênio e a forma de ureídeo presente no tecido, de maneira que em plantas que receberam maiores concentrações de nitrato (15 e 30 mM), a relação alantoína/ácido alantóico é mais elevada, sendo que nos demais tratamentos, com exceção do maior nível de amônia (30 mM), esta relação reduz bastante (tabela 4A).

Os teores de aminoácidos translocados via xilema foram maiores no tratamento que recebeu 30 mM de amônia (NH_4^+ 30 mM), seguido por NO_3^- 15 mM, NO_3^- 30 mM e NH_4^+ 15

mM, que não diferiram entre si, e sem N, NO_3^- 5 mM e NH_4^+ 5 mM que apresentaram os menores teores, e não diferiram entre si.

Em tecidos, a concentração de nitrogênio fornecida alterou alguns parâmetros de acúmulo de compostos. Observou-se variações significativas em relação a aminoácidos solúveis totais em folhas, onde NO_3^- 15 mM, NO_3^- 30 mM, NH_4^+ 15 mM e NH_4^+ 30 mM apresentaram os maiores valores, não diferindo entre si, enquanto NO_3^- 15 mM apresentou os menores teores em nódulos diferindo dos demais tratamentos, que não diferiram entre si (tabela 4A). Este maior acúmulo de aminoácidos em folhas, nos tratamentos que receberam maiores concentrações de nitrato ou amônia, pode representar uma resposta positiva à concentração de nitrogênio recebida, ocorrendo portanto acúmulo de aminoácidos neste tecido, no entanto esta resposta não foi observada para os demais tecidos e, em seiva de xilema, não houve uma resposta proporcional à concentração de nitrogênio recebida, com relação aos teores de aminoácidos totais translocados.

Os maiores teores de nitrato em seiva foram observados em NO_3^- 30 mM e, posteriormente em NO_3^- 15 mM, não sendo detectado para os demais tratamentos, indicando que, em concentrações moderadas de nitrato, este não é translocado via xilema, uma vez que em plantas recebendo 5 mM de nitrato (NO_3^- 5 mM) os teores de nitrato em seiva de xilema foram próximos a zero (tabela 4B). Isto sugere que o volume de nitrato absorvido pela raiz não supera a capacidade da raiz para reduzi-lo e todo nitrato absorvido acaba sendo assimilado na raiz. Em NO_3^- 15 mM e NO_3^- 30 mM esta translocação de nitrato excedente pelo xilema indicam, portanto, não só a absorção de nitrato pela planta mas também uma maior assimilação de nitrato pela parte aérea, conforme já proposto por Atkins et al. (1980), da mesma maneira como observado nos experimentos anteriores (6.1 e 6.2.1).

Uma forte evidência, que suporta a hipótese de que *Calopogonium mucunoides* apresenta tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato, está na manutenção da atividade de redução de acetileno pela enzima nitrogenase.

Ao avaliar-se a atividade da enzima nitrogenase em plantas noduladas recebendo concentrações crescentes de nitrato, observou-se que só ocorreu alguma inibição na atividade da enzima, embora não completa, em NO_3^- 30 mM (plantas recebendo solução nutritiva contendo 30 mM de nitrato). Plantas recebendo 5 mM e 15 mM de nitrato (NO_3^- 5 mM e NO_3^- 15 mM, respectivamente) apresentaram atividade próxima a sem N (plantas noduladas que não receberam nitrato em solução), não apresentando variação significativa, o que indica que a espécie apresenta tolerância do sistema de fixação à presença de nitrogênio mineral na forma de nitrato (tabela 5).

Silveira et al. (2001) relatou que *Vigna unguiculata* apresentava tolerância do sistema de fixação a presença de concentrações moderadas de nitrato, 5 mM, mas que concentrações superiores inibiam a nitrogenase. Em *Calopogonium mucunoides* a fixação não foi inibida pela presença de nitrato e, apenas em plantas recebendo altas concentrações de nitrato (30 mM), se observou redução na atividade da enzima nitrogenase, mas não observa-se total inibição, que varia de 3-4 (em sem N, NO_3^- 5 mM e NO_3^- 15 mM) para 1,7 μmoles de etileno/gMF nódulos por hora. Por outro lado, a presença de nitrato também não alterou o número e MF de nódulos neste experimento, que não diferiram significativamente entre os tratamentos, portanto suportando os dados anteriores de que a nodulação era mantida em presença de nitrogênio externo.

Em *Alnus maritima*, a atividade de nitrogenase é suprimida após fornecimento de 2-4 mM de nitrato de amônia (Laws & Graves, 2005), pelo método de redução de acetileno; no

entanto, a atividade ressurgiu após irrigação livre de nitrogênio. Já em *Cicer arietinum*, Mann et al. (2001) observaram que o etileno está envolvido no mecanismo de funcionamento de nódulos e é adversamente afetado por nitrato. Em ervilha, Voisin et al. (2002) observaram que a inibição da fixação por nitrato foi absoluta com altas concentrações de nitrogênio mineral, mas não com baixas concentrações.

Em *Calopogonium mucunoides*, altas concentrações de nitrato (30 mM) reduziram a atividade de redução de acetileno pela nitrogenase, mas não houve inibição total, ao contrário do que foi observado por Voisin et al. (2002) em ervilha.

Fujikake et al. (2002) observaram que, após exposição de plantas noduladas de soja a 5 mM de nitrato, e posterior tratamento livre de nitrato, a atividade de redução de acetileno pela enzima nitrogenase é superior em relação a plantas que não foram tratadas anteriormente com nitrato, o que possivelmente está relacionado com o aumento de fotoassimilados.

A partir destes experimentos, pode-se concluir que o fornecimento de nitrogênio mineral para plantas noduladas de *Calopogonium mucunoides* não afeta a nodulação, que é mantida. A N-fixação persiste, mesmo sob altas concentrações de nitrogênio mineral, observando-se algum declínio, embora não inibição total, apenas após o fornecimento de 30 mM de NO_3^- , ao contrário de a maioria das espécies reportadas na literatura. Estes dados inferem que a espécie em questão apresenta, portanto, tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrogênio, tanto com relação ao estabelecimento da nodulação quanto à manutenção da fixação.

6.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no padrão de aminoácidos solúveis totais: variações qualitativas

A alteração na fonte de nitrogênio fornecida não proporcionou uma resposta padrão na composição de aminoácidos em seiva de xilema e tecidos de *Calopogonium mucunoides*.

Em plantas que receberam nitrogênio antes e durante o período de inoculação, poucas alterações foram observadas no que se refere aos principais aminoácidos do metabolismo de nitrogênio.

Tendo em vista o envolvimento direto na assimilação das fontes de nitrogênio testadas, o enfoque durante a apresentação dos dados esteve principalmente sobre os aminoácidos Gln, Glu, Asn e Asp, substratos e produtos do processo de assimilação de nitrogênio. Desta forma, uma maior síntese de Gln ou Asn, como produtos da assimilação, envolverá o maior consumo de Glu e Asp, seus respectivos substratos.

Quando as plantas foram expostas à presença de nitrogênio antes da inoculação, observou-se que NH_4^+ 15 mM (plantas recebendo amônia em solução) apresentou maiores teores de Asp em folhas, e redução de Asn, embora em menores proporções, neste tratamento e no tratamento NO_3^- 15 mM. Estes dois tratamentos apresentaram aumento nos teores de Glu, o que não foi acompanhado de redução nos teores de Gln, que foi baixo em todos os tratamentos (tabela 6).

Plantas que receberam uréia (uréia 15 mM) apresentaram os maiores teores de Gly, 12,46%, em folhas, enquanto plantas controle (sem N), plantas inteiramente dependentes da fixação, apresentou os maiores teores de Gaba, 28,36%, embora este aminoácido tenha se apresentado em teores elevados em todos os tratamentos, o mesmo ocorrendo em tecidos de raiz, apresentando como menores valores 11%, em folhas, e 20%, em raiz. Atkins et al. (1983) reportou que, em *Lupinus albus*, a concentração de Gaba em tecidos foliares é elevada,

estando entre os aminoácidos preponderantes neste tecido. Em soja, Gaba constitui até 60% dos aminoácidos solúveis em tecidos foliares (Lima & Sodek, 2003).

Em soja, a aplicação de nitrato eleva os teores de Asn em folhas (Amarante, 2002), o que em *Calopogonium mucunoides* não foi observado; ao contrário, plantas que receberam nitrato apresentaram cerca de 1,3% de Asn em folhas, ao lado de 4,5% em plantas inteiramente dependentes da fixação.

Bacanamwo & Harper (1997) reportaram que o acúmulo de Asn na parte aérea está envolvido na regulação e controle da atividade de nitrogenase por feedback, sendo o mesmo mecanismo reafirmado por Vadez et al. (2000). O aumento de Asn está sempre relacionado à redução em Gln e ureídeos, como resposta à exposição ao nitrato, o que é correlacionado com a inibição da N-fixação (Amarante, 2002). No entanto, em *Calopogonium mucunoides*, não observou-se esta reposta “integrada” de aumento de Asn e redução de Gln, ou de redução nos teores de ureídeos como resposta à exposição ao nitrogênio, sendo que os teores de ureídeos observados em tecidos e em seiva de xilema, bem como a manutenção da nodulação, indicam que a espécie manteve a N-fixação mesmo em presença de fonte externa de nitrogênio (ver 6.1).

Em *Calopogonium mucunoides*, plantas que não receberam nitrogênio (sem N) apresentaram os maiores teores de Asn, em raiz, ocorrendo redução com a aplicação de nitrogênio, independente da fonte. Por outro lado, esta redução não foi acompanhada de acréscimo de Asp neste tecido, que apresentou maiores teores no tratamento sem N.

Glu foi elevado nos tratamentos sem N e NO_3^- 15 mM, apresentando redução nos tratamentos NH_4^+ 15 mM e uréia 15 mM, não observando-se aumento nos teores de Gln no tecido, que foi muito baixa em todos os tratamentos. Os altos valores observados para Asp e

Glu, em raiz podem indicar um estímulo na síntese e/ou acúmulo destes aminoácidos em tecidos de raiz, o que pode evidenciar estímulo na via de síntese do Asp neste tecido. No entanto uréia 15 mM apresentou os menores teores de Lys, 3,61%, aminoácido sintetizado a partir do Asp, enquanto nos demais tratamentos lisina esteve em torno de 9% em raiz (tabela 6).

Em soja, os principais aminoácidos observados em raiz de plantas inteiramente dependentes da fixação são Asn, Asp, Glu, Ser, Gaba, Gln e Ala (Puiatti & Sodek, 1999; Amarante, 2002), no entanto relaciona-se que o aumento nos teores de Asn é devido ao aumento da assimilação de nitrato pelas raízes, estando sempre relacionado à redução nos teores de Asp e aumento nos teores de Gln.

Em *Calopogonium mucunoides*, observa-se redução nos teores de Asn em raízes de plantas que recebem fonte adicional de nitrogênio, seja na forma de nitrato, amônia ou uréia, de maneira que plantas inteiramente dependentes da fixação apresentam maiores teores de Asn em raízes. Por outro lado, não observou-se abandono da fixação, o que é inferido pelos teores de ureídeos em seiva de xilema (ver 6.1). De acordo com Bacanamwo & Harper (1997) e Vadez et al. (2000), o aumento nos teores de Asn desencadeia o processo que leva ao abandono da fixação, em presença de nitrogênio mineral. Em *Calopogonium mucunoides* este comportamento não foi observado, uma vez que não observou-se aumento nos teores de Asn e que a nodulação e fixação foram mantidas, o que pode-se inferir pelos teores de ureídeos presentes em seiva de xilema (ver 6.1).

O aumento nos teores de Asn estaria relacionado à redução nos teores de Asp, Ala e Glu (Lohaus, 1998); no entanto em *Calopogonium mucunoides*, os teores de Asn em raiz são mais elevados no tratamento sem N, mas Glu e Asp não apresentam menores teores em relação aos

demais tratamentos, observando-se redução apenas nos teores de Ala, embora os teores de Ala sejam próximos para sem N e NO_3^- 15 mM. Em soja, o *stress* de nitrogênio promove redução nos teores de Asn em tecidos e em seiva de xilema, mas Asp apresenta aumento em seiva de xilema e em raiz (Lima & Sodek, 2003).

Em plantas de soja plenamente noduladas expostas ao nitrato por 7 dias, observou-se que ocorria redução nos teores de Glu e aumento nos teores de Asn e Gln em folhas, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação (Amarante, 2002). Em plantas de *Calopogonium mucunoides* cultivadas recebendo nitrogênio mineral na forma de nitrato antes da inoculação, esta variação não foi observada uma vez que os teores de Glu, Asn e Glu são similares em plantas inteiramente dependentes da fixação e em plantas recebendo nitrato.

Stitt et al. (2002) relacionou o aumento nos teores de Ser e Gly à redução nos teores de Asn, uma vez que Asn seria o doador do grupo amino para a síntese destes dois aminoácidos. No caso de *Calopogonium mucunoides* recebendo nitrogênio mineral desde a fase inicial do desenvolvimento, esta correlação não é possível pois, embora os teores de Asn tenham se mostrado baixos em folhas, especialmente em NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, Ser e Gly não são representativos em todos os tratamentos, à exceção de Gly em uréia 15 mM, 12,46%, mas para este tratamento os teores de Asn são maiores que nos demais tratamentos, representando 5,52% do total de aminoácidos solúveis.

Da mesma forma, não é possível correlacionar os teores de Asn à fonte de nitrogênio, como ocorre para a maioria das leguminosas reportadas na literatura, onde plantas recebendo nitrogênio mineral apresentam maiores teores de Asn do que plantas inteiramente dependentes da fixação (Atkins et al., 1980; Pate et al., 1980; Atkins et al., 1983; Drevon et al., 1988;

Schubert, 1986; Streeter, 1988; Dakora et al., 1992; Bacanamwo & Harper, 1997; Leidi & Rodríguez-Navarro, 2000).

No caso de *Calopogonium mucunoides*, os teores de Asn são próximos para todos os tratamentos, em maior ou menor significância, sendo que, em folhas, NO_3^- 15 mM e NH_4^+ 15 mM, plantas recebendo nitrato e amônia, respectivamente, apresentaram menores teores que os demais e, em raiz, o tratamento sem N (plantas inteiramente dependentes da fixação) apresentou maiores teores que os demais tratamentos. Já em seiva de xilema, sem N e NO_3^- 15 mM apresentaram teores semelhantes de Asn (15,39 e 8,24%, respectivamente), enquanto NH_4^+ 15 mM e uréia 15 mM, plantas recebendo nitrogênio mineral na forma de amônia e de uréia, respectivamente, apresentaram os menores teores (tabela 6).

Atkins et al. (1983) reportou que, em *Lupinus albus*, durante o desenvolvimento e crescimento Asn pode chegar a 89-93% em folhas; no caso de *Calopogonium mucunoides* Asn mostrou-se entre os principais aminoácidos tanto em tecidos quanto em seiva de xilema, mas não ultrapassando 15% (raiz no tratamento sem N), no entanto Glu e Asp também se mostraram em teores elevados, sendo que Glu mostrou-se alto em todos os tecidos, para todos os tratamentos.

Em soja, a exposição à amônia eleva os teores de Gln e Asn e reduz os teores de Asp em seiva de xilema (Amarante, 2002), no entanto, em *Calopogonium mucunoides*, plantas que recebiam amônia tiveram os teores de Asp reduzidos, mas também reduziram os teores de Asn e Gln, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação.

Em plantas de *Calopogonium mucunoides* que receberam nitrato, os teores de Asp em seiva de xilema foram superiores aos dos demais tratamentos, inclusive em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação, o que não ocorre em soja, onde plantas que receberam

nitrato apresentam redução nos teores de Asp em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação (Amarante, 2002).

Em *Calopogonium mucunoides*, os teores de Asp em nódulos foram mais elevados em uréia 15 mM, onde apresentou 19,21%, enquanto os teores de Asn foram menores. Glu apresentou-se sofreu elevação independente da fonte externa de nitrogênio, enquanto Gln foi baixo em todos os tratamentos, incluindo o tratamento sem N.

O tratamento NO_3^- 15 mM apresentou os menores teores para o aminoácido não-proteico Gaba, cerca de 4%, enquanto nos demais tratamentos foi superior a 10%. Em soja, os teores de Gaba em tecidos, especialmente folhas, são elevados, constituindo até 60% do total de aminoácidos solúveis (Lima & Sodek, 2003), enquanto em *Lupinus albus* é reportado que está entre os principais aminoácidos solúveis, principalmente em tecidos foliares (Atkins et al., 1983).

Em seiva de xilema, NH_4^+ 15 mM apresentou os menores teores de Asp e de Asn, 1,81 e 1,82%, respectivamente, sendo que este último também esteve em teores mais baixos em uréia 15 mM, 2,97%, quando comparados aos tratamentos sem N e NO_3^- 15 mM. Em soja, plantas noduladas tratadas com amônia apresentaram elevação nos teores de Asn em seiva de xilema (Amarante, 2002).

O tratamento uréia 15 mM apresentou os maiores teores de Ser e de Ala em seiva de xilema, 17,19 e 10,35%, respectivamente, sendo que este último também foi elevado no tratamento NO_3^- 15 mM. Os tratamentos NO_3^- 15 mM e uréia 15 mM apresentaram os menores teores do aminoácido não-proteico Gaba, 10,57 e 8,79%, respectivamente, enquanto nos demais tratamentos esteve acima de 18% (tabela 6). Lima & Sodek (2003) observaram, em plantas de soja recebendo solução nutritiva sem nitrogênio, que Gaba em seiva de xilema

estava presente em teores de até 4,8%, decaindo para menos de 1% quando recebendo nitrato em solução.

O aminoácido Gln mostrou-se mais elevado em seiva de xilema, onde os teores de Asn foram menores que os de Gln. Lohaus (1998) reporta que quando os teores de Gln aumentam, Asn é reduzida e vice-versa. O fato de que em tecidos, Asn aparece em maiores teores, enquanto Gln está entre 1,3 e 4% pode estar relacionado a esta afirmativa.

Amarante (2002) observou que, em plantas de soja plenamente noduladas expostas a 5 mM de amônia por 4 dias, ocorria aumento nos teores de Asn e Gln em seiva de xilema, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação. Em plantas de *Calopogonium mucunoides* cultivadas recebendo 15 mM de amônia antes da inoculação observou-se redução nos teores de Asn em seiva de xilema, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação e não observou-se variação nos teores de Gln.

Por outro lado, nos experimentos seguintes, onde foram utilizadas plantas plenamente noduladas tratadas com nitrato por 21 dias (Experimento 2, tabela 7) e plantas plenamente noduladas tratadas com nitrato ou amônia por 5 dias (Experimento 3, tabela 8), algumas alterações foram observadas, no entanto seguindo padrão diferente daquele observado para plantas tratadas com nitrogênio antes da inoculação.

O tempo de exposição ao nitrogênio mineral pareceu influenciar na concentração de alguns aminoácidos em *Calopogonium mucunoides*. Plantas plenamente noduladas expostas ao nitrato por 21 dias (NO_3^- 15 mM) apresentaram menores teores de Glu em folhas do que plantas inteiramente dependentes da fixação (sem N), 3,67 e 9,87% respectivamente (tabela 7), no entanto plantas expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato (NO_3^- 15 mM) ou de

amônia (NH_4^+ 15 mM) por 5 dias apresentaram maiores teores de Glu em folhas do que as plantas que foram expostas ao nitrato por 21 dias, estando acima de 20% (tabela 8).

Em plantas noduladas expostas ao nitrato por 21 dias, o aminoácido Asn mostrou-se baixo em folhas, mas em ambos os tratamentos (tabela 7), o que não justifica a hipótese de que Asn estaria atuando como doador do grupo amino para síntese dos aminoácidos Ser e Gly, conforme proposto por Stitt et al. (2002), pois no tratamento sem N não identificou-se a presença de Ser e os teores de Gly são baixos para justificar esta hipótese, sendo que apenas NO_3^- 15 mM apresentou teores de Gly mais elevados, mas Ser não apresentou-se em teores significativos.

Em plantas de soja plenamente noduladas expostas ao nitrato por 7 dias, foi observado que ocorria redução nos teores de Glu e aumento nos teores de Gln, em folhas (Amarante, 2002), semelhante ao observado para plantas de *Calopogonium mucunoides* plenamente noduladas expostas ao nitrato por 21 dias. Amarante (2002) observou também aumento nos teores de Asn em folhas de plantas de soja noduladas expostas ao nitrato por 7 dias, o que não foi observado em plantas de *Calopogonium mucunoides* noduladas recebendo nitrato por 21 dias, onde os teores de Asn em folhas se mantêm próximos aos observados em plantas inteiramente dependentes da fixação.

Por outro lado, em *Calopogonium mucunoides*, plantas plenamente noduladas expostas ao nitrato por 21 dias, NO_3^- 15 mM, apresentaram maiores teores de Gly em folhas do que as plantas inteiramente dependentes da fixação. Em raiz, os teores de Met aumentam em plantas expostas ao nitrato por 21 dias, enquanto em nódulos a exposição ao nitrato provocou redução nos teores de Asp, Glu, Gaba e Met. No entanto, observou-se variação expressiva apenas nos teores de Gln e Asn, dentre os aminoácidos translocados via xilema comparando-se plantas

inteiramente dependentes da fixação, sem N, e plantas expostas ao nitrato por 21 dias, NO_3^- 15 mM, de maneira que os aminoácidos predominantes foram as amidas transportadoras, Asn e Gln (tabela 7). Aparentemente, ocorreu inversão nos teores de amidas translocadas, em resposta ao nitrato, uma vez que a soma de Asn + Gln equivale a cerca de 51% do total de aminoácidos exportados, nos dois casos.

Amarante (2002) observou que em plantas de soja noduladas expostas ao nitrato por 7 dias ocorria aumento nos teores de Asn e redução nos teores de Gln, similar ao observado para plantas noduladas de *Calopogonium mucunoides* expostas ao nitrato por 21 dias. Por outro lado, o aumento nos teores de Asn e redução nos teores de Gln é relatado como sendo fator desencadeador do processo de abandono da N-fixação em soja (Bacanamwo & Harper, 1997; Vadez et al., 2000) e que estas alterações ocorrem acopladas à redução nos teores de ureídeos (Amarante, 2002).

No presente trabalho, com *Calopogonium mucunoides*, a redução nos teores de ureídeos em seiva de xilema não foi tão expressiva, em plantas noduladas expostas ao nitrato por 21 dias, quanto o relatado para plantas de soja, e não ocorreu abandono da nodulação (ver 6.2.1).

Lima & Sodek (2003) observaram que, em soja, o *stress* por nitrogênio alterou os teores de Asn translocados via xilema, de 70% em plantas recebendo nitrogênio para 31% em plantas sem suprimento de nitrogênio, mas Gln pareceu pouco influenciada pela fonte de nitrogênio.

Já Amarante (2002) observou que em soja nodulada recebendo nitrato por 7 dias, ocorria aumento nos teores de Glu e redução nos teores de Asn em nódulos, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação, enquanto em raiz ocorria aumento nos teores de Asn. No presente estudo, em plantas de *Calopogonium mucunoides* noduladas que receberam nitrato por 21 dias, observou-se que os teores de Glu em nódulos são menores que em plantas

inteiramente dependentes da fixação, e que os teores de Asn são baixos em nódulos e em raiz, em ambos os tratamentos.

Tendo em vista o longo período de exposição ao nitrogênio mineral (21 dias), no experimento subsequente foram utilizadas plantas plenamente noduladas expostas ao nitrogênio mineral na forma de nitrato ou amônia por 5 dias, tendo então se observado um perfil de aminoácidos um pouco diferente em relação ao experimento anterior (plantas expostas ao nitrogênio mineral por 21 dias). Principalmente, os teores de Gln e Asn, os dois aminoácidos mais abundantes no experimento anterior, foram bem mais baixos, em seiva de xilema. Houve também algumas diferenças na resposta ao tratamento com N mineral.

Em plantas plenamente noduladas expostas ao nitrogênio mineral por 5 dias, observou-se que em folhas ocorreu redução nos teores de Asp, em plantas recebendo NH_4^+ 15 mM, mas o aumento nos teores de Asn neste tratamento foram muito baixos para se estabelecer uma relação recíproca (tabela 8).

As variações nos teores de Glu não foram tão expressivas, ultrapassando 25% nos três tratamentos.

Em plantas de soja noduladas que receberam nitrato por 7 dias os teores de Asn e Gln elevam-se em folhas, enquanto Glu diminui, em comparação com plantas inteiramente dependentes da fixação (Amarante, 2002). Em *Calopogonium mucunoides* não observou-se esta relação, uma vez que tanto em plantas inteiramente dependentes da fixação quanto em plantas noduladas recebendo nitrato ou amônia por 5 dias os teores de Glu em folhas são elevados e os teores de Asn e Gln são baixos.

Em raiz, Asp aparece em maior concentração em NH_4^+ 15 mM, mas não há redução nos teores de Asn, que foram baixos em todos os tratamentos, embora plantas que receberam NO_3^-

15 mM ou NH_4^+ 15 mM apresentaram concentrações deste aminoácido ligeiramente maiores do que em plantas inteiramente dependentes da fixação (tabela 8).

O aminoácido não-proteico Gaba apresentou valores elevados em folhas, raiz e nódulos, nos três tratamentos, mas não foi detectado em seiva de xilema. Em soja, Gaba aparece em grandes quantidades, principalmente em folhas, mas em seiva de xilema os teores são baixos (Lima & Sodek, 2003). Em comparação aos teores observados para plantas noduladas expostas ao nitrato por 21 dias, os teores de Gln observados em seiva de xilema de plantas expostas ao nitrogênio mineral por 5 dias são relativamente baixos, entre 3,3 e 4%, enquanto plantas expostas ao nitrato por 21 dias apresentavam pouco mais de 10%.

Em plantas de soja noduladas expostas ao nitrato por 7 dias, os teores de Asn aumentam em raiz, em relação a plantas inteiramente dependentes da fixação (Amarante, 2002); em *Calopogonium mucunoides* os teores de Asn são baixos em raiz e nódulos, tanto em plantas inteiramente dependentes da fixação quanto em plantas noduladas que receberam nitrato ou amônia por 5 dias.

Em um experimento complementar, onde foram estudadas concentrações crescentes de nitrato ou amônia (de 0 a 30 mM), aplicadas durante 5 dias em plantas plenamente noduladas, do mesmo modo que no experimento anterior, analisou-se apenas as variações no padrão de aminoácidos presentes em seiva de xilema.

O comportamento observado foi similar ao de plantas submetidas a 15 mM de nitrogênio mineral por 5 dias, isto é, não houve variação expressiva no padrão de aminoácidos exportados via xilema entre os tratamentos que recebiam concentrações crescentes de nitrato ou de amônia, 5, 15 e 30 mM. Os teores de Asn em seiva de xilema foram elevados em todos os

tratamentos, caracterizando-se como o principal aminoácido transportado via xilema (tabela 9).

Asp mostrou maiores concentrações em plantas inteiramente dependentes da fixação e em plantas que recebiam 5 mM de nitrato ou de amônia (sem N, NO_3^- 5 mM e NH_4^+ 5 mM, respectivamente), tratamentos em que os teores de Asn foram ligeiramente menores. Comportamento similar foi observado em feijão, onde plantas que recebiam 1 mM de nitrato apresentavam maiores teores de Asp em seiva de xilema do que plantas que recebiam 10 mM de nitrato (Leidi & Rodríguez-Navarro, 2000).

O aminoácido Gln apresentou pequeno acréscimo em NO_3^- 15 mM, NO_3^- 30 mM, NH_4^+ 15 mM e NH_4^+ 30 mM, em relação aos demais tratamentos (15 e 30 mM de nitrato e 15 e 30 mM de amônia, respectivamente), da ordem de 6 até 13% do total de aminoácidos em seiva de xilema (em NO_3^- 30 mM e em NH_4^+ 30 mM, respectivamente) ao lado de 1 a 2% nos tratamentos sem N, NO_3^- 5 mM e NH_4^+ 5 mM (plantas inteiramente dependentes da fixação e plantas recebendo 5 mM de nitrato e 5 mM de amônia, respectivamente) (tabela 9). Em feijão, plantas recebendo menores concentrações de nitrato (1 mM) apresentaram maiores teores de Gln em seiva de xilema do que plantas que recebiam 10 mM de nitrato (Leidi & Rodríguez-Navarro, 2000).

Em soja, plantas inteiramente dependentes da fixação apresentavam maiores teores de Gln do que plantas que assimilavam nitrato, em seiva de xilema (Puiatti & Sodek, 1999). Este comportamento reportado para plantas de feijão e de soja é contrário ao observado para *Calopogonium mucunoides*, onde plantas recebendo maiores concentrações de nitrato e de amônia, 15 ou 30 mM, apresentaram maiores teores de Gln em seiva de xilema do que plantas que recebiam 5 mM de nitrato ou de amônia ou de plantas inteiramente dependentes da fixação.

Os teores de Ala foram mais baixos nos tratamentos sem N, NH_4^+ 15 mM e NH_4^+ 30 mM, menores que os apresentados no experimento anterior (plantas recebendo 15 mM de nitrato ou amônia por 5 dias), o que não tem explicação aparente.

Em soja em condições de alagamento, Ala mostra elevar-se em seiva de xilema (Puiatti & Sodek, 1999; De Sousa & Sodek, 2003), comportamento que parece não ter nenhuma correlação com a variação nos teores de Ala observados para *Calopogonium mucunoides*.

De forma geral, não observou-se em nenhum dos experimentos a resposta clássica de drástica redução nos teores de Gln e aumento nos teores de Asn, atrelada à redução nos teores de ureídeos, em seiva de xilema de plantas noduladas quando tratadas com nitrogênio, geralmente associada à inibição da nodulação e da N-fixação em leguminosas tropicais, o que corrobora a resposta observada para *Calopogonium mucunoides* onde não observou-se o efeito negativa de “abandono” da nodulação ou da fixação em presença de nitrogênio mineral no meio.

A ausência de efeitos drásticos sobre o metabolismo de aminoácidos, bem como a manutenção da nodulação e da fixação de nitrogênio em presença de altas concentrações de nitrato ou amônia, além da translocação via xilema e acúmulo de ureídeos em tecidos, indicam ser esta uma espécie que apresenta tolerância do sistema de fixação à presença de nitrogênio no meio, podendo esta característica ser explorada no tocante à utilização como modelo de estudo para a elucidação dos mecanismos que levam ao “abandono” ou à tolerância das leguminosas à presença de nitrogênio no meio.

7 CONCLUSÕES

Ao contrário de muitas outras leguminosas, em *Calopogonium mucunoides*:

- a presença de nitrogênio no meio não inibe a nodulação, que ocorre de maneira efetiva;
- a N-fixação só é afetada por altas concentrações de nitrato (30 mM), não ocorrendo, no entanto, inibição total, mas apenas redução na atividade da enzima nitrogenase;
- a atividade da enzima nitrogenase se mantém mesmo após exposição a concentrações de 15 mM de nitrato;
- a forma de ureídeo (alantoína ou ácido alantóico) translocado via xilema ou acumulado em tecidos (alantoína ou ácido alantóico) parece estar relacionada à fonte de nitrogênio;
- o metabolismo de aminoácidos com envolvimento direto na assimilação de nitrogênio (Asp, Asn, Glu e Gln) não mostrou uma resposta padrão com a alteração na fonte de nitrogênio utilizada.

8. LITERATURA CITADA

- Agrell, D.; Larsson, C.M.; Larsson, M.; Mackwn, C.T.; Rufty, T.W., 1997. Initial kinetics of ^{15}N -nitrate labelling of root and shoot N fractions of barley cultured at different relative addition rates of nitrate-N. *Plant Physiol. Biochem.* 35:923-931.
- Aidar, M.P.M.; Schmidt, S.; Moss, G.; Stewart, G.R.; Joly, C.A., 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. *Plant Cell Environ.* 26:389-399.
- Alves, B.J.R.; Resende, A.S.; Urquiaga, S.; Boddey, R.M., 2000. Biological nitrogen fixation by two tropical forage legumes assessed from the relative ureide abundance of stem solutes: N-^{15} calibration of the technique in sand culture. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 56:165-76.
- Amarante, L., 2002. Transporte e metabolismo de glutamina em soja (*Glycine max* (L.) Merrill): uma relação estreita com a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- 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.
- Amarante, L.; Sodek, L., 2006. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. *Biol. Plant.* 50:405-410.
- Andrews, M.; Defaria, S.M.; McInroy, S.G.; Sprent, J.I., 1990. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. *Phytochemistry.* 29:49-54.
- Arriagada, F.O.G.; Cassini, A., 1994. Effect of inoculated soybeans with *Bradyrhizobium-japonicum* to N-nitrate in different phases its growth. *Arq. Biol. Tecnol.* 37:539-549.
- Atkins, C.A.; Pate, J.S.; Griffiths, G.; White, S.T., 1980. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO_3^- -grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Plant Physiol.* 66:978-983.

- Atkins, C.A.; Pate, J.S.; Peoples, M.B.; Joy, K.W., 1983. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71:841-848.
- Bacanamwo, M.; Harper, J.E., 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. *Physiol. Plant.* 100:371-377.
- Bacanamwo, M.; Purcell, L.C., 1999. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. *J. Exp. Bot.*, v.50, p.689-696. 1999.
- Barneix, A.J.; Causin, H.F., 1996. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J. Plant Physiol.* 149:358-362.
- Becana, M.; Sprent, J.I., 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiol. Plant.* 70:757-765.
- Bergersen F.J.; Turner, G.L., 1993. Fixing soybean bacteroides in flowchamber reactions. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.* 251:95-102.
- Bielecki, R.L.; Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17: 278-293
- Blumwald, E.; Fortin, M.G.; Rea, P.A.; Verma, D.P.S.; Poole, R.J., 1985. Presence of host-plasma membrane type H⁺-ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiol.* 78: 655-672.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Camargos, L.S.; Aguiar, L.F.; Azevedo, R.A., 2006. Site of nitrate reduction in jack bean (*Canavalia ensiformis*) changes from leaf to root during development. *New Zea. J. Crop Hort. Sci.* 34:131-137.
- Camargos, L.S.; Aguiar, L.F.; Sodek, L., 2005. Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta ao nitrato. *Anais do X Congresso*

- Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal, Recife, Brasil.
- Cataldo, D.A.; Harron, M.; Schrader, L.E.; Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6:71-80.
- Chalk, P.M., 1998. Characterization of novel inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). II. Variation in N₂ fixation, NO₃ uptake and their interactions. *Euphytica*. 103:45-54.
- Cheng, J.; Hipkin, C.R.; Gallon, J.R., 1999. Effects of inorganic nitrogen compounds on the activity and synthesis of nitrogenase in *Gloeotheca* (Nageli) sp. ATCC 27152. *New Phytol.* 141:61-70.
- Chopra, J.; Kaur, N.; Gupta, A.K., 2003/4. The role of ammonium assimilating enzymes in lentil roots and nodules. *Biol. Plant.* 47:105-109.
- Corbesier, L.; Havelange, A.; Lejeune, P.; Barnier, G.; Perilleux, C., 2001. N content of phloem and xylem exudates during the transition to flowering in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24:367-375.
- Costa, N.L., 1995. Nitrogen fertilization and association of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) with tropical forage legumes. *Pesq. Agrop. Bras.* 30:401-408.
- Crawford, N.M., 1995. Nitrate – nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell.* 7:859-868.
- Daimon, H.; Yoshioka, M., 2001. Responses of root nodule formation and nitrogen fixation activity to nitrate in a split-root system in peanut (*Arachis hypogaeae* L.). *J. Agr. Crop Sci.* 187:89-95.
- Dakora, F.D.; Atkins, C.A.; Pate, J.S., 1992. Effect of NO₃ on N₂ fixation and nitrogenous solutes of xylem in two nodulated West African geocarpic legumes, Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) and Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.). *Plant Soil.* 140:255-262.
- Date, R.A., 1973. Nitrogen a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. *Soil Biol. Biochem.* 5:5-18.

- Denison, R.F.; Harter, B., 1995. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. *Plant Physiol.* 107:1355-1364.
- Dianda, M.; Chalifour, F.P., 2002. Effect of mineral nitrogen and plant genotype on the growth and nodulation of *Faidherbia albida*. *Can. J. Bot.* 80:241-254.
- Drevon, J.J.; Heckmann, M.O.; Soussana, J.F.; Salsac, L., 1988. Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* 26:197-203.
- Eaglesham, A.R.J., 1989. Nitrate inhibition of root-nodule symbiosis in doubly rooted soybean plants. *Crop Sci.* 29:115-119.
- Emes, M.J.; Fowler, M.W., 1979. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. *Planta.* 144:249-253.
- Figueira, E.M.D.; Caldeira, G.C.N., 2005. Effect of nitrogen nutrition on salt tolerance of *Pisum sativum* during vegetative growth. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168:359-363.
- Finneman, J.; Schjoerring, J.K., 1999. Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiol. Plant.* 105:469-477.
- Fujikake, H.; Yamazaki, A.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Matsushashi, S.; Ito, T.; Mizuniwa, C.; Kume, T.; Hashimoto, S.; Ishioka, N.S.; Watanabe, S.; Osa, A.; Sekine, T.; Uchida, H.; Tsuji, A.; Ohyama, T., 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *J. Exp. Bot.* 54:1379-1388.
- Fujikake, H.; Yashima, H.; Sato, T.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Ohyama, T., 2002. Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N-2-fixation activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 48:211-217.

- Gan, Y.B.; Stulen, I.; van Keulen, H.; Kuiper, P.J.C., 2003. Effect of N fertilizer top-dressing at various reproductive stages on growth, N₂ fixation and yield of three soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes. *Field Crop. Res.* 80:147-155.
- Gan, Y.B.; Stulen, I.; van Keulen, H.; Kuiper, P.J.C., 2004. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DV g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean. *Plant Soil.* 258:281-292.
- Gentili, F.; Huss-Danell, K., 2002. Phosphorus modifies the effects of nitrogen on nodulation in split-root systems of *Hippophae rhamnoides*. *New Phytol.* 153:53-61.
- Giannakis, C.; Nicholas, D.J.D.; Wallace, W., 1988. Utilization of nitrate by bacterioids of *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean root nodule. *Planta.* 174:51-58.
- Gibson, A.H.; Harper, J.E., 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 25:497-501.
- Givan, C.V., 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry.* 18:375-382.
- Gojon, A.; Dapoigny, L.; Lejay, L.; Tillard, P.; Rufty, T.W., 1998. Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on ¹⁵NO₃⁻ uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant Cell Environ.* 21:43-53.
- Gomes, M.A.F.; Sodek, L., 1984. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Physiol. Plant.* 62:105-109.
- Gordon, A.J.; Minchin, F.R.; Skot, L.; James, C.L., 1997. Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* 114:937-946.
- Goss, M.J.; de Varennes, A.; Smith, P.S.; Ferguson, J.A., 2002. N₂- fixation by soybeans grown with different levels of mineral nitrogen, and the fertilizer replacement value for a following crop. *Can. J. Soil Sci.* 82:139-145.

- Halbleib, C.M.; Ludden, P.W., 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130:1081-1084.
- Hardy, R.F.W.; Holsten, R.D.; Jackson, E.J.; Burns, R.C., 1975. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation. Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1188-1207.
- Hardy, R.W.F.; Havelka, V.P., 1975. Nitrogen fixation research: a key to world food. *Science.* 188:633-643.
- Heckmann, M.O.; Drevon, J.J.; Saglio, P.; Salsac, L., 1989. Effect of oxygen and malate on NO_3^- inhibition of nitrogenase in soybean nodules. *Plant Physiol.* 90:224-229.
- Herridge, D.; Rose, I., 2000. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crop. Res.* 65:229-248.
- Herridge, D.F.; Robertson, M.J.; Cocks, B.; Peoples, M.B.; Holland, J.F.; Heuke, L., 2005. Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. *Aust. J. Exp.Agric.* 45:269-277.
- Hinson, K., 1975. Nodulation responses from nitrogen applied to soybean half-root systems. *Agron. J.* 67:799-804.
- Hoogland, D.R.; Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, University of California Agricultural Experimental Station, 39 p.
- Hunt, S.; Layzell, D.B., 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 44:483-511.
- Hussain, A.K.M.A.; Yamakawa, T.; Ikeda, M.; Ishizuka, J., 1992. Effects of nitrogen application on physiological-characteristics of nitrate-tolerant mutants of soybean. *J. Fac. Agric. K. Univ.* 37:139-147.
- Izaguirre-Mayoral, M.L.; Vivas, A.I., 1996. Symbiotic N_2 -fixation in tropical legume species growing at high geographic elevation. *Symbiosis.* 21:49-60.

- Jarret, H.W.; Cooksy, K.D.; Wllist, T.; Anderson, J.M., 1986. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica column. *Anal. Biochem.* 153:189-198.
- Jiao, G.; Barabas, N.K.; Lips, S.H., 2000. Nitrate uptake, storage and reduction along the root axes of barley seedlings. In: Martins-Loncao, M.A. (Ed.) *Nitrogen in a sustainable ecosystem – from the Cell to the Plant*. Amsterdam: Kluwer, p.1-8.
- Jones, G.J.; Morel, F.M.M., 1988. Plasmalemma redox activity in the diatom *Thalassiosira* – a possible role for nitrate reductase. *Plant Physiol.* 87:143-147.
- Kanayama, Y.; Watanabe, I.; Yamamoto, Y., 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. II. Nitrite accumulation and formation of nitrosylleghemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol.* 21:341-346.
- Kaushal, T.; Onda, M.; Ito, S.; Yamazaki, A.; Fujikake, H.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Takahashi, Y.; Ohya, T., 2004. Effect of placement of urea and coated urea fertilizers on yield and quality of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50:1245-1254.
- Kaushal, T.; Suganuma, T.; Fujikake, H.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Takahashi, Y.; Ohya, T., 2002. Effect of deep placement of calcium cyanamide, coated urea, and urea on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seed yield in relation to different inoculation methods. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48:855-863.
- King, C.A.; Purcell, L.C., 2005. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiol.* 137:1389-1396.
- Laws, M.T.; Graves, W.R., 2005. Nitrogen inhibits nodulation and reversibly suppresses nitrogen fixation in nodules of *Alnus maritima*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130:496-499.
- Layzell, D.B.; Hunt, S.; Palmer, G.R., 1990. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules. Pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂. *Plant Physiol.* 92:1101-1107.

- Lazof, D.B.; Rincon, M.; Rufty, T.W.; Mackown, C.T.; Carter, T.E., 1994. Aluminium accumulation and associated effects on $^{15}\text{NO}_3$ influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance. *Plant Soil*. 164:291-297.
- Lee, S.H.; Ashley, D.A.; Boerma, H.R., 1991. Regulation of nodule development in supernodulating mutants and wild-type soybean. *Crop Sci*. 31:688-693.
- Leidi, E.O.; Rodríguez-Navarro, D.N., 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N_2 fixation in bean. *New Phytol*. 147:337-346.
- Lohaus, G., 1998. Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois low protein and Illinois high protein strains of maize. *Planta*. 205:181-188.
- Louahlia, S.; Macduff, J.H.; Ourry, A.; Humpherys, M.; Boucad, J., 1999. Nitrogen reserve status affects the dynamics of nitrogen remobilization and mineral nitrogen uptake during recovery of contrasting cultivars of *Lolium perenne* from defoliation. *New Phytol*. 142:451-462.
- Macduff, J.H.; Abberton, M.T.; Raistrick, N.; Michaelson-Yeates, T.P.T., 2002. Low nitrate uptake white clover genotype- Nitrogen relations of a low nitrate uptake inbred line of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Soil*. 238:191-204.
- Malik, N.S.A; Calvert, H.E.; Bauer, W.D., 1987. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. *Plant Physiol*. 84:266-271.
- Mann, A.; Nandwal, A.S.; Kundu, B.S.; Sheokand, S.; Kumar, B.; Datta, D.; Sheoran, A., 2001. Effect of nitrate and aminoethoxyvinylglycine on *Cicer arietinum* L. nodules. *Biol. Plant*. 44:131-135.
- Marquez, A.J.; Betti, M.; Garcia-Calderon, M.; Pal'ove-Balang, P.; Diaz, P.; Monza, J., 2005. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot*. 56:1741-1749.

- Matsumoto, T.; Yatazawa, M.; Yamamoto, Y., 1977. Effects of exogenous nitrogen-compounds on the concentrations of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 18:613-624.
- Mattson, M.; Schjoerring, J.K., 1996. Ammonia emission from young barley plants: influence of N-source, light/dark cycles and inhibition of glutamine synthetase. *J. Exp. Bot.* 47:477-484.
- 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 soybeans. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta.* 17:297-304.
- McNeill, D.L.; Larue, T.A., 1984. Effect of nitrogen source on ureides in soybean. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- Mendonca, E.H.M.; Schiavinato, M.A., 2005. Growth of *Crotalaria juncea* L. supplied with mineral nitrogen. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48:181-185.
- Michaelson-Yeates, T.P.T.; Macduff, J.H.; Abberton, M. T.; Raistrick, N., 1998. Nodule function in symbiotic bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) and Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) is tolerant of nitrate in root medium. *Ann. Bot.* 82:687-690.
- Mifflin, B.J.; Lea, P.J., 1980. Ammonia assimilation. In: Mifflin, B. J (Ed.). *The biochemistry of plants: amino acids and derivatives*. New York: Academic Press, p.169-202.
- Munns, D.N., 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. III. Effects of nitrate on root hairs and infection. *Plant Soil.* 29:33-47.
- Oaks, A.; Hirel, B., 1985. Nitrogen Metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:345-365.

- Oghoghorie, C.G.O.; Pate, J.S., 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). Plant Soil Spec. Vol. (Lie, T.A and Mulder, E.G, eds.), pp.185-202.
- Osborne, S.L.; Riedell, W.E., 2006. Soybean growth response to low rates of nitrogen applied at planting in the northern Great Plains. J. Plant Nutr. 29:985-1002.
- Padgett, P.E.; Leonard, R.T., 1996. Free amino acid levels and regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. J. Exp. Bot. 47:871-883.
- Palma, J.M.; Jimenez, A.; Sandallo, L.M.; Corpas, F.J.; Lundqvist, M.; Gomez, M.; Sevilla, F.; del Rio, L.A., 2006. Antioxidative enzymes from chlroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. J. Exp. Bot. 57:1747-1758.
- Pate, J.S.; Atkins, C.A.; Hamel, K.; Mcneil, D. L.; Layzell, D. B., 1979. Transport of organic solutes in phloem and xylem of nodulated legume. Plant Physiol. 63:1082-1088.
- Pate, J.S.; Atkins, C.A.; White, S.T.; Rainbird, R.M.; Woo, K.C., 1980. Nitrogen, nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. Plant Physiol. 65:961-965.
- Paterson, T.G.; Larue, T.A., 1983. N₂ fixation (C₂H₂) and ureide content of soybeans: Environmental effects and source sink manipulations. Crop Sci. 23:819-824.
- Puatti, M., 1997. Mecanismos envolvidos na inibição da nodulação e fixação de N₂ pelo NO₃⁻ em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merril cv. Santa Rosa) cultivadas em hidroponia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Purcell, L.C.; Serraj, R.; Sinclair, T.R.; De, A., 2004. Soybean N₂ fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. Crop Sci. 44:484-492.
- Radin, J.W., 1973. “*In vivo*” assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. Plant Physiol. 51:332-336.

- Ramos, M.L.G.; Parsons, R.; Sprent, J.I., 2005. Differences in ureide and amino acid content of water stressed soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. *Pesq. Agrop. Bras.* 40:453-458.
- Sagi, M.; Lips, H.S., 1998. The levels of nitrate reductase and MoCo in annual ryegrass as affected by nitrate and ammonium nutrition. *Plant Sci.* 135:17-24.
- Sanzalvarez, S.; Delcampo, F. F., 1994. A comparative-evaluation of the symbiotic N₂- fixation and physiological performance of 36 native legume species collected in a tropical savanna during the rainy and dry seasons. *Symbiosis.* 16:225-247.
- Saravitz, C.H.; Devienne-Barret, F.; Raper, C. D.; Chaillou, S.; Lamaze, T., 1998. Nitrate uptake rate by soybean and wheat plants determined by external nitrate concentration and shoot mediated demand. *Int. J. Plant Sci.* 158:305-312.
- Saxena, A.K.; Rathi, S.K.; Tilak, K.V.B.R., 1996. Selection and evaluation of nitrate-tolerant strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae specific to the lentil. *Biol. Fert. Soil.* 22:126-130.
- Schubert, K.R., 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:539-574.
- Seiffert, N.F.; Zimmer, A.H.; Schunke, R.M.; Behling-Miranda, C.H., 1985. Nitrogen recycling in mixed pastures of *Calopogonium mucunoides* and *Brachiaria decumbens*. *Pesq. Agrop. Bras.* 20:529-544.
- Serraj, R.; Drevon, J.J., 1998. Effects of salinity and nitrogen source on growth and nitrogen fixation in alfalfa. *J. Plant Nutr.* 21:1805-1818.
- Serraj, R.; Drevon, J.J.; Obaton, M.; Vidal, A., 1992. Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) – *Bradyrhizobium symbiosis*. *J. Plant Physiol.* 140:366-371.

- Sherwood, J.E.; Truchet, G.L.; Dazzo, F.B., 1984. Effect of nitrate supply on the in vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a *Rhizobium* trifoliin-binding lectin, in *Trifolium repens* seedlings. *Planta*. 162:540-547.
- Silveira, J.A.G.; Costa, R.C.L.; Oliveira, J.T.A., 2001. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. *Braz. J. Microbiol.* 32:187-194.
- Sinclair, T.R.; Vadez, V.; Chenu, K., 2003. Ureide accumulation in response to Mn nutrition by eight soybean genotypes with N₂ fixation tolerance to soil drying. *Crop Sci.* 43:592-597.
- Singh, B.; Usha, K., 2002. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation by genotypes of blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] as affected by fertilizer nitrogen. *Aust. Journal Agri. Res.* 53:453-457.
- Singh, B.; Usha, K., 2003. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation of cowpea genotypes as affected by fertilizer nitrogen. *J. Plant Nutr.* 26:463-473.
- Sivasankar, S.; Oaks, A., 1995. Regulation of nitrate reductase during early seedling growth. *Plant Physiol.* 107:1225-1231.
- Sivasankar, S.; Rothstein, S.; Oaks, A., 1997. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiol.* 114:583-589.
- Smith, P.M.C.; Winter, H.; Storer, P.J.; Bussel, J.D.; Schuller, K.A.; Atkins, C.A., 2002. Effect of short-term N₂ deficiency on expression of the ureide pathway in cowpea root nodules. *Plant Physiol.* 129:1216-1221.
- Sodek, L., 2004. Metabolismo do Nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. (Ed) *Fisiologia Vegetal*, Guanabara Koogan, p. 94-113.
- Sodek, L.; Silva, D.M., 1996. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8:187-191.

- Souza, E.S.; Burity, H.A.; Oliveira, J.P.; Figueiredo, M.D.B.; Delyra, M.D.C.P., 1996. N₂-fixation and growth of the *Calopogonium* (*Calopogonium mucunoides* Desv.) and of the *Clitoria* (*Clitoria ternatea* L.) after successive cuts. Rev. Soc. Bras. Zootec. 25:1036-1048.
- Stitt, M.; Muller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Morcuende, R.; Scheible, W.R.; Krapp, A., 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. J. Exp. Bot. 53:959-970.
- Streeter, J., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. Crit. Rev. Plant Sci. 7:1-23.
- Streeter, J.G., 1981. Effect of nitrate in the rooting medium on carbohydrate composition of soybean nodules. Plant Physiol. 68:840-844.
- Takahashi, M.; Shimada, S.; Nakayama, N.; Arihara, J., 2005. Characteristics of nodulation and nitrogen fixation in the improved supernodulation soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivar 'Sakukei 4'. Plant Produc. Sci. 8:405-411.
- Tan, X.W.; Ikeda, H.; Oda, M., 2000. The absorption, translocation, and assimilation of urea, nitrate or ammonium in tomato plants at different plant growth stages in hydroponic culture. Scient. Hort. 84:275-283.
- Thavarajah, D.; Ball, R.A.; Schoenau, J.J., 2005. Nitrogen fixation, amino acid, and ureide associations in chickpea. Crop Sci. 45:2497-2502.
- Tischner, R., 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. Plant Cell Environ. 23:1005-1024.
- Tischner, R.; Peuke, A.; Godbold, D.L.; Feig, R.; Merg, G.; Huttermann, A., 1988. The effect of NO₂⁻ fumigation on aseptically grown spruce seedlings. J. Plant Physiol. 133:243-246.
- Todd, C.D.; Polacco, J.C., 2004. Soybean cultivars 'Williams 82' and 'Maple Arrow' produce both urea and ammonia during ureide degradation. J. Exp. Bot. 55:867-877.
- Todd, C.D.; Tipton, P.A.; Blevins, D.G.; Piedras, P.; Pineda, M.; Polacco, J.C., 2006. Update on ureide degradation in legumes. J. Exp. Bot. 57:5-12.

- Truchet, G.L.; Dazzo, F.B., 1982. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in presence of combined nitrogen. *Planta*. 154:132-138.
- Udvard, M.K.; Day, D.A., 1989. Eletrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. *Plant Physiol*. 90:982-987.
- 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.
- Ullrich, W. R., 1987. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. In: Ullrich, W. R.; Aparício, P.J.; Syrett, P.J. et al. (Ed). *Inorganic nitrogen metabolism*. New York: Springer, p. 32-38.
- Vadez, V.; Sinclair, T.R., 2001. Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean. *J. Exp. Bot*. 52:153-159.
- Vadez, V.; Sinclair, T.R.; Serraj, R., 2000. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. *Physiol. Plant*. 110:215-223.
- Vassileva, V.; Ignatov, G., 1996. Effect of high nitrate concentrations on dicarboxylate transport across the peribacteroid membrane of soybean root nodules. *J. Plant Physiol*. 149:222-224.
- Vazquez, M.M.; Barea, J.M.; Azcon, R., 2001. Impact of soil nitrogen concentration on *Glomus* spp.-*Sinorhizobium* interactions as affecting growth, nitrate reductase activity and protein content of *Medicago sativa*. *Biol. Fert. Soil*. 34:57-63.
- Vessey, J.K.; Waterer, J., 1992. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant*. 84:171-176.
- Vogels, G.D.; Van Der Drift, C., 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem*. 33:143-157.

- Voisin, A.S.; Salon, C.; Munier-Jolain, N.G.; Ney, B., 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Soil. 243:31-42.
- Ward, M.R.; Grimes, H.D.; Huffaker, R.C., 1989. Latent nitrate reductase activity is associated with plasma membrane in corn roots. Planta. 177:470-475.
- Wery, J.; Turc, O.; Salsac, L., 1986. Relationship between growth, nitrogen fixation and assimilation in a legume (*Medicago sativa* L.) Plant Soil. 96:17-29.
- Willians, L.E.; Miller, A.J., 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 52:659-688.
- Wu, S.; Harper, J.E., 1991. Dinitrogen fixation potencial and yield of hypernodulation soybean mutants: a field evaluation. Crop Sci 31:1233-1240.
- Yashima, H.; Fujikake, H.; Yamazaki, A.; Ito, S.; Sato, T.; Tewari, K.; Ohtake, N.; Sueyoshi, K.; Takahashi, Y.; Ohyama, T., 2005. Long-term effect of nitrate application from lower part of roots on nodulation and N₂- fixation in upper part of roots of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in two-layered pot experiment. Soil Sci. Plant Nutr. 51:981-990.
- Yemm, E.W.; Cocking, E.C., 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst. 80:209-213.
- Zdunek-Zastocka, E.; Lips, H.S., 2003. Is xanthine dehydrogenase involved in response of pea plants (*Pisum sativum* L.) to salinity or ammonium treatment? Acta Physiol. Plant. 25:395-401.
- Zhang, F.; Dijak, M.; Smith, D.L.; Lin, J.; Walsh, K.; Voldeng, H.; Macdowell, F.; Layzell, D.B., 1997. Nitrogen fixation and nitrate metabolism for growth of six diverse soybean [*Glycine max*. (L.) Merr.] genotypes under low temperature stress. Environ. Exp. Bot. 38:49-60.