

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**ANDRÉA DIAS BRANDÃO**

**PAPEL DA REDUTASE DO NITRATO EM SOJA**  
**[*Glycine max* (L.) Merr. Cv IAC-17] SOB CONDIÇÕES**  
**DE HIPÓXIA DO SISTEMA RADICULAR**

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

**Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B733p Brandão, Andréa Dias  
Papel da redutase do nitrato de soja [*Glycine max* (L.)  
Merr. Cv IAC-17] sob condições de hipóxia do sistema  
radicular / Andréa Dias Brandão. -- Campinas, SP: [s.n.],  
2005.

Orientador: Ladaslav Sodek.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Soja. 2. Nitrato redutases. 3. Anaerobiose. 4.  
Raízes. 5. Nitrogênio. I. Sodek, Ladaslav. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

**Título em inglês:** The nitrate role of the reductase in soybean [*Glycine max* (L.) Merr. Cv IAC-17] under hipoxic conditions of the root system.

**Palavras-chave em inglês:** Soybean, Nitrate reductases, Anaerobiosis, Roots, Nitrogen.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Ladaslav Sodek, Marlene Aparecida Schiavinato, José Ronaldo Magalhães.

**Data da defesa:** 28/07/2005.

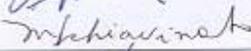
Data da defesa: 28/07/2005

BANCA EXAMINADORA

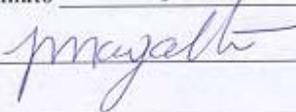
Prof. Dr. Ladaslav Sodek (Orientador)



Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato



Prof. Dr. José Ronaldo Magalhães



Prof. Dr. Jorge Vega

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realização do curso;

Ao Professor Dr. Ladaslav Sodek pela serena e dedicada orientação;

Aos Laboratórios do Departamento de Fisiologia Vegetal pela realização dos experimentos;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao Projeto de Pesquisa;

Ao Dr. José Ronaldo Magalhães pela colaboração;

À minha família, em especial a minha irmã Aline Dias Brandão; aos meus amigos, em especial: Clara Geromel, Diego S. T. Martinez, Flávia Antunes, Laura Becker, Leandra Scarpari, Luzia Modolo, Rúbia Purcino; colegas de trabalho Geraldo Melo, Javier P. Torres, Jorge Gouvêa e todos os profissionais do departamento de Fisiologia Vegetal, em especial ao técnico Neurival Luis Paiola e aos professores Cláudia Haddad, Marlene Schiavinato, Paulo Mazzafera, Jorge Vega, por toda ajuda e incentivo durante o período do curso.

## ÍNDICE

ANDRÉA DIAS BRANDÃO.....	i
Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.....	i
Orientador: Prof. Dr. Ladaslav Sodek.....	i
ÍNDICE.....	v
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cultivo de soja no Brasil.....	1
1.2 Deficiência de O <sub>2</sub> no solo e sua disponibilidade nas raízes de plantas.....	2
1.3 Influência da assimilação do nitrato sobre o desenvolvimento de plantas com sistemas radiculares sob deficiência de O <sub>2</sub> .....	4
1.4 Alterações metabólicas em plantas com sistema radicular sob deficiência de O <sub>2</sub> .....	6
1.5 Deficiência de O <sub>2</sub> na atividade enzimática: RN e RNi.....	10
1.6 Função e síntese de NO x RN.....	14
1.7 Justificativa do trabalho.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	18
3.2 Soluções nutritivas.....	19
3.3 Tratamentos realizados.....	19
3.4 Parâmetros avaliados.....	20
3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	20
3.6 Métodos analíticos.....	21
3.6.1 Extração de metabólitos das raízes.....	21
3.6.1.1 Extração de aminoácidos totais, nitrato, nitrito e amônia.....	21
3.6.1.2 Extração de proteínas.....	21
3.6.2 Extração e dosagem da enzima RN de raízes.....	22
3.6.3 Dosagem da enzima RN <i>in vivo</i> em raízes.....	23
3.6.3 Coleta de exsudato do xilema.....	24
3.7 Análises bioquímicas.....	24
3.7.1 Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).....	24

3.7.2 Dosagem de aminoácidos solúveis totais (AA) .....	26
3.7.3 Dosagem de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).....	28
3.7.4 Dosagem de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) .....	28
3.7.5 Dosagem de Amônia.....	28
3.7.6 Dosagem de proteínas .....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 ESTUDOS COM OS COMPOSTOS NITROGENADOS .....	30
4.1.1 Experimento I – Utilização do nitrato pelo sistema radicular de soja durante a hipóxia em diferentes concentrações de nitrato e pH da solução nutritiva .....	30
4.1.2 Experimento II – Variação do pH da solução nutritiva sob condições.....	41
de normóxia e hipóxia em diferentes pHs iniciais .....	41
4.1.3 Experimento III – Utilização do nitrato pelo sistema radicular da soja durante a hipóxia e o retorno à normóxia. ....	42
4.1.4 Experimento IV - Estudo dos compostos nitrogenados e da utilização do nitrato na presença de cloranfenicol.....	55
4.2 ESTUDOS COM A ENZIMA REDUTASE DO NITRATO .....	63
4.2.1 Otimização do método para extração da enzima RN .....	63
Composição do tampão de extração.....	63
4.2.2 Respostas da enzima RN do sistema radicular em condições de hipóxia e retorno à normóxia .....	70
4.2.3 Efeito do pH externo na atividade da RN .....	72
4.2.4 Efeito de NO exógeno (SNP) sobre a atividade da RN .....	75
7. LITERATURA CITADA .....	86

## ABREVIATURAS

ADH – álcool desidrogenase

AlaAT – alanina aminotransferase

AspAT – aspartato aminotransferase

ATP – adenosina trifosfato

CAP - cloranfenicol

Ciclo de TCA – ciclo dos ácidos tricarboxílicos

DTT – Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamina treta acético

FAD – flavina adenosina dinucleotídeo

GS-GOGAT - glutamina sintase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase

Hepes - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

LDH – lactato desidrogenase

MCW – metanol, clorofórmio, água

MF – massa fresca

NAD<sup>+</sup> – β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH – β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

OPA – o-ftaldialdeído

PDC – piruvato descarboxilase

PMS – fenazina metil sulfato

PMSF – fenil metil sulfonil fluoreto

PVP – polivil pirrolidona

RN – redutase do nitrato

RNi- redutase do nitrito

SNAP – penicilamina-N-acetil-S-nitroso

SNP – Nitroprussiato de sódio

## RESUMO

A soja [*Glycine Max* (L.) Merr.] tem sido um dos modelos mais usados entre as plantas cultivadas para estudar os efeitos de tolerância à hipóxia, já que é tida como uma planta com certo grau de tolerância ao estresse de oxigênio e sua importância também tem um caráter econômico bastante relevante. Condições de hipóxia são comuns na natureza, por exemplo em campos alagados onde a difusão de oxigênio para o sistema radicular fica bastante prejudicada. Quando o estresse ocorre em tempo prolongado as conseqüências se tornam irreversíveis, levando as plantas à morte, uma vez que são tantos os prejuízos em função da injúria por carência de O<sub>2</sub> que acarretam mudanças estruturais em organelas, por exemplo. Nesses casos, mesmo que a disponibilidade de O<sub>2</sub> seja restabelecida, a planta não consegue se recuperar. Sabe-se, no entanto, que a presença do nitrato no meio contribui de forma a diminuir e/ou retardar as conseqüências desse processo, aumentando assim a tolerância das plantas a esta condição. Não é conhecido, entretanto, como o nitrato exerce seu efeito benéfico na tolerância à hipóxia. Alguns trabalhos vêm mostrando a ativação da enzima RN (redutase do nitrato) sob este tipo de estresse, um fenômeno que torna interessante a sua participação na tolerância induzida pelo nitrato.

Por essa razão esse estudo teve os objetivos de: 1) otimizar método para extração da enzima RN em plantas de soja; 2) avaliar o papel da enzima RN em condições de hipóxia do sistema radicular e 3) Avaliar a utilização e metabolismo do nitrato em condições de hipóxia do sistema radicular.

As plantas [*Glycine max* (L.) Merr. cv IAC-17] foram cultivadas em sistema hidropônico e após atingirem o estágio de desenvolvimento adequado (V4) foram submetidas à hipóxia (pela interrupção do fornecimento de ar comprimido e adição de uma camada de óleo mineral na solução nutritiva do vaso). O período de acompanhamento dos experimentos foi de 4 dias,

tempo necessário para que o sistema radicular atingisse a hipóxia. Após esse período também foi estudada a recuperação das plantas do estresse, após a remoção da camada de óleo e restabelecimento da aeração.

Foi observado que, independente do pH inicial, o pH da solução nutritiva das plantas em normóxia ficou estável em torno de 7,7 e o das plantas hipóxicas próximos a 6,6. O consumo de nitrato na solução nutritiva das plantas normóxicas e das hipóxicas foi praticamente o mesmo, também foi detectada a presença de nitrito na solução nutritiva dos tratamentos sob hipóxia. Durante o período de recuperação à normóxia, o nitrito acumulado na solução foi gradativamente utilizado. Quanto às raízes, observou-se que em normóxia ocorreu acúmulo de nitrato, enquanto que em hipóxia ocorreu a utilização do nitrato endógeno. Também foi observado nessas condições (hipóxia) o aumento na concentração de aminoácidos livres totais e proteínas em relação às plantas em normóxia. Na seiva do xilema de plantas sob hipóxia foi observada diminuição no teor de nitrato transportado, variação na composição dos aminoácidos livres presentes (aumentando significativamente a proporção de Ala e Gaba e diminuindo principalmente Asn) e aumento do teor de aminoácidos livres totais, em relação às plantas em normóxia. Nas plantas recuperadas, apenas o teor de proteínas da raiz e a composição de aminoácidos livres da seiva do xilema retornaram aos valores encontrados nas plantas normóxicas. Não foi detectada a presença de nitrito no sistema radicular e/ou seiva do xilema das plantas.

A atividade da enzima RN foi bastante modificada durante o período de hipóxia diminuindo a valores bem baixos, assim como não houve sua ativação durante o estresse. Em apenas 1 dia de recuperação (retorno à normóxia), sua atividade atingiu os valores das plantas normóxicas.

Chegou-se à conclusão de que embora o grau de utilização do nitrato pela planta seja semelhante em normóxia e hipóxia, o seu metabolismo é bastante alterado na hipóxia. Ao

contrário do que foi relatado na literatura, a atividade da RN caiu bruscamente durante a hipóxia sem que houvesse evidência de ativação. No entanto, esta alteração na atividade da enzima pode explicar as diferenças no metabolismo do nitrato entre normóxia e hipóxia.

## SUMMARY

Soybean [*Glycine Max* (L.) Merr.] has been frequently used as a model system among cultivated plants in order to study the effects of tolerance to hypoxia, in view of its certain tolerance to oxygen deficiency and its relevant economic importance. Hypoxic conditions are common in nature, for example in flooded fields where the diffusion of oxygen to the root system suffers serious restrictions. When the stress occurs over a long period the consequences can become irreversible leading to the death of the plant in view of the many prejudicial factors arising from oxygen deficiency. These can result in structural changes in organelles, for example, from which the plant is unable to recover on return to normal oxygen availability. It is known, however, that the presence of nitrate in the surrounding medium can diminish or retard the consequences of oxygen deficiency, thereby increasing the tolerance of plants this stress. It is not known, however, what underlies the beneficial effect of nitrate in plant tolerance of hypoxia. Some investigations have shown that nitrate reductase is activated under oxygen stress, a phenomenon that might be related to the tolerance effect of nitrate.

Therefore, this study had the objective of: 1) to optimize method for extraction of the RN enzyme in soybean plants; 2) evaluating the role of nitrate reductase during hypoxic stress of the root system and 3) evaluating the utilization and metabolism of nitrate under these stress conditions.

Soybean plants [*Glycine max* (L.) Merr. cv IAC-17] were cultivated in a hydroponic system and after reaching the V4 stage of development were subjected to hypoxia by suspending aeration and applying a layer of mineral oil to the surface of the nutrient solution. The treatment was carried out for 4 days, time enough for the system to undergo hypoxia. Recovery from stress was also studied following hypoxia where the layer of mineral oil was removed from the surface and aeration of the solution restarted.

The results showed that independent of the initial pH, the pH of the nutrient solution of normoxic plants stabilized at around 7.7 while that of the plants under hypoxia stabilized at 6.6. The consumption of nitrate in the nutrient solution of the normoxic and hypoxic treatments was practically the same, and nitrite was also detected in the nutrient solution of the plants under hypoxia. During recovery to normoxia, the accumulated nitrite was gradually used. As for the roots, it was observed that under normoxia, nitrate accumulated, while under hypoxia endogenous nitrate was consumed. Besides, under hypoxia, there was an increase in total free amino acids and proteins compared to the controls. In the xylem sap a decline in nitrate was found under hypoxia together with changes in the amino acid composition (where alanine and Gaba increased markedly while Asn diminished) and increases in the total amino acid levels. On return to normoxia only the levels of protein in the root and amino acid composition of the xylem sap returned to values found in the normoxic plants. No nitrite could be detected in the root tissue or xylem sap.

Large changes in nitrate reductase activity were found during hypoxia, being reduced to low values. Nor was there any evidence for the activation of the enzyme during the stress. In less than one day on returning to normoxia activity returned to normoxic plants levels.

It was concluded that despite the similarity in the amounts of nitrate utilized comparing plants under normoxia and hypoxia, it was evident that its metabolism was quite different under these two conditions. Contrary to that reported in the literature, nitrate reductase activity falls drastically during hypoxia without any evidence for activation of the enzyme. Nevertheless, the alteration in activity could explain the differences in nitrate metabolism observed between for normoxia and hypoxia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Variação ocorrida no metabolismo em plantas submetidas a baixa concentração de O <sub>2</sub> .....	8
<b>Figura 2.</b> Modelo proposto para regulação da atividade da RN através da desforilação/desfosforilação.....	12
<b>Figura 3.</b> Duas vias para produção de NO em plantas.....	15
<b>Figura 4.</b> Esquema das principais etapas da extração de metabólitos nitrogenados das raízes	22
<b>Figura 5.</b> Perfis de eluição de derivados OPA-aminoácidos do padrão Sigma por HPLC.....	27
<b>Figura 6.</b> Concentração de nitrato do vaso após 4 dias de normóxia e hipóxia com concentração inicial de 15 mM (força total) em três pHs iniciais diferentes .....	31
<b>Figura 7.</b> Concentração de nitrato do vaso após 4 dias de normóxia e hipóxia com concentração inicial de 7,5 mM (½ força) em três pHs iniciais diferentes .....	32
<b>Figura 8.</b> Concentração de nitrato do vaso após 4 dias de normóxia e hipóxia com concentração inicial de 5 mM (⅓ de força) em três pHs iniciais diferentes .....	33
<b>Figura 9.</b> Variação no consumo de nitrato do vaso em plantas normóxicas e hipóxicas, em diferentes concentrações de nitrato e diferentes pHs após 4 dias de tratamento .....	34
<b>Figura 10.</b> Concentração de nitrato no sistema radicular de plantas cultivadas em sistema hidropônico em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) em 4 dias de tratamento em diferentes pH iniciais e concentrações de nitrato da solução nutritiva.....	36
<b>Figura 11.</b> Concentração de nitrato na seiva do xilema de plantas cultivadas em sistema hidropônico em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) em 4 dias de tratamento em diferentes pH iniciais e concentrações de nitrato da solução nutritiva.....	38
<b>Figura 12.</b> Variação do pH na solução nutritiva durante 4 dias de normóxia e hipóxia em sistema de cultivo de plantas cultivadas em hidroponia com diferentes pHs iniciais. ....	42
<b>Figura 13.</b> Variação do pH no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de hipóxia (4 dias), normóxia (8 dias) e recuperação da hipóxia (4 dias). ....	43
<b>Figura 14 A.</b> Consumo de nitrato no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia e hipóxia ao longo de 4 dias. ....	45
<b>Figura 14 B.</b> Consumo de nitrato no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia e hipóxia e recuperação da hipóxia.. ....	45
<b>Figura 15 A.</b> Concentração de nitrito no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia e hipóxia ao longo de 4 dias. ....	47

<b>Figura 15 B.</b> Concentração de nitrito no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. ....	47
<b>Figura 16.</b> Teores de nitrato no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento. ....	48
<b>Figura 17.</b> Teores de aminoácidos livres totais no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento .....	49
<b>Figura 18.</b> Teores de proteína no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento.....	50
<b>Figura 19.</b> Teores de amônia no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento.....	51
<b>Figura 20.</b> Teores de nitrato na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento.....	52
<b>Figura 21.</b> Teores de aminoácidos livres totais na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento. ....	53
<b>Figura 22.</b> Variação do pH do meio com solução nutritiva ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento. ....	56
<b>Figura 23.</b> Consumo de nitrato da solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento . ....	57
<b>Figura 24.</b> Concentração de nitrito na solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento .....	58
<b>Figura 25.</b> Teor de nitrato no sistema radicular de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento.....	59
<b>Figura 26.</b> Teor de aminoácidos livres totais no sistema radicular de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento .....	59
<b>Figura 27.</b> Teor de proteínas no sistema radicular de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento.....	60

<b>Figura 28.</b> Teor de nitrato na seiva do xilema de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento .....	61
<b>Figura 29.</b> Teor de aminoácidos livres totais na seiva do xilema de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ao longo de 4 dias de tratamento.....	62
<b>Figura 30.</b> Influência da caseína durante a extração sobre a atividade da RN. ....	64
<b>Figura 31.</b> Influência do PVP durante a extração sobre a atividade da RN.....	65
<b>Figura 32.</b> Influência da Leupeptina (10µM) na presença de duas concentrações de caseína durante a extração sobre a atividade da RN.....	66
<b>Figura 33.</b> Influência do PMSF durante a extração sobre a atividade da RN.....	67
<b>Figura 34.</b> Influência do pH em diferentes concentrações de caseína durante a extração sobre a atividade da RN. ....	67
<b>Figura 35.</b> Atividade da RN em função do tempo de incubação.....	68
<b>Figura 36.</b> Interferência do PMS na leitura do nitrito no ensaio da RN. ....	69
<b>Figura 37.</b> Atividade de RN in vitro (RN total + RN ativa ) e RN in vivo em raízes após 4 dias em normóxia com diferentes pHs iniciais .....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição (mol%) de aminoácidos livres (AA) na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) em diferentes pH e concentração de nitrato da solução nutritiva do vaso.....	40
<b>Tabela 2.</b> Composição (mol%) entre aminoácidos livres (AA) na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação .....	54
<b>Tabela 3.</b> Atividade de RN in vitro (RN total + RN ativa ) e RN in vivo em raízes de plantas em hipóxia e recuperação da hipóxia.....	71
<b>Tabela 4.</b> Atividade de RN in vitro (RN total + RN ativa ) e RN in vivo em raízes de plantas em normóxia e hipóxia com diferentes pHs iniciais. ....	73
<b>Tabela 5.</b> Atividade de RN in vitro (RN total + RN ativa ) e RN in vivo em raízes de plantas em normóxia e hipóxia submetidas à presença de SNP/NO .....	76

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Cultivo de soja no Brasil

A importância econômica da soja [*Glycine Max* (L) Merrill] é bem conhecida, já que o país está entre os maiores produtores mundiais. No Brasil é uma das culturas com maior área cultivada, aproximadamente 16,3 milhões de hectares na safra 2001/2002, com produção de cerca de 41,9 milhões de toneladas e produtividade média de 2.567 kg/ha (Empresa de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 2002). As leguminosas, como a soja, geram bastante interesse econômico pelo fato de poderem ser cultivadas na ausência de adubos nitrogenados, visto que como toda leguminosa, tem o poder de formar associações simbióticas com bactérias específicas do solo e, nesse caso, ao invés de utilizarem N mineral, utilizam N do ar. Atualmente, o processo de fixação de N permite que o cultivo da soja no país atinja alta produtividade sem aplicação de adubos nitrogenados no solo, resultando na economia de bilhões de dólares por safra em fertilizantes (Dobereiner, 1997).

A rotação de culturas em solos de várzea, que são aqueles que formam condições de hidromorfismo, ou seja, apresentam uma deficiente drenagem natural (Pauletto *et al*, 1998), é uma prática recomendada para aumentar o rendimento de grãos de arroz, quer pelo efeito de quebrar o ciclo de insetos pragas, moléstias e de plantas daninhas que prejudicam o desenvolvimento de arroz, ou pelo efeito indireto na melhoria das condições químicas, físicas (IRGA, 2001) e biológicas do solo (Embrapa, 2003). Entretanto, nesse caso, para que a rotação de culturas seja vantajosa, é necessário estudar espécies e/ou cultivares que se adaptem às condições de excesso de água no solo e que proporcionem retorno econômico ao produtor. Nesse caso, enquadra-se o cultivo de soja, que embora introduzida e melhorada para áreas bem drenadas no Brasil, é uma espécie originária de áreas alagadiças do norte da China (Evans,

1996) e apresenta variabilidade genética para tolerar o excesso de umidade no solo (VanToai *et al*, 1994; Thomas *et al*, 2000; Pires *et al*, 2002).

## **1.2 Deficiência de O<sub>2</sub> no solo e sua disponibilidade nas raízes de plantas**

Em contraste com os animais, as plantas não apresentam um sistema especializado para distribuição de oxigênio. O oxigênio se move por difusão, em função de sua disponibilidade no ar (21% do total de gases), através de aberturas na epiderme e espaços intercelulares do tecido (Drew, 1997). A ausência de sistemas especializados para mobilização do oxigênio não é considerada um problema para o crescimento e metabolismo das plantas, em geral, porque a grande superfície-volume da maioria dos órgãos das plantas e sua taxa de respiração por unidade de volume do tecido são frequentemente mais baixas que em animais devido a essas células terem grandes vacúolos.

Em alguns tipos de solo as plantas ficam sujeitas ao baixo teor de oxigênio (Hook & Crawford, 1978) e durante alagamento, a partir de uma chuva forte, por exemplo, ou irrigação (Opik, 1980). O alagamento reduz a troca de gás entre o tecido da planta e a atmosfera, porque os gases (oxigênio, em particular) se difundem 10.000 vezes mais devagar na água que no ar (Armstrong *et al*, 1991c). Em condições experimentais (hidroponia), a deficiência de O<sub>2</sub> pode ser induzida em plantas pelo borbulhamento de N<sub>2</sub> na solução nutritiva (Good & Muench, 1992; Huang & Johnson, 1995) ou através da suspensão da aeração e impedimento da difusão do O<sub>2</sub>, pela aplicação de uma camada de óleo mineral sobre a solução. Assim, o O<sub>2</sub> dissolvido na água é exaurido gradativamente, sendo a duração dependente da temperatura e da taxa de respiração das raízes (Drew, 1990; Morard & Silvestre, 1996).

A concentração de O<sub>2</sub> sob condições naturais em solução pode ser de 5 a 10% (v/v em equilíbrio com a fase gasosa) (Erdmann *et al*, 1988). Isso implica em um sistema radicular

extremamente heterogêneo, podendo haver células sob normóxia, hipóxia e as zonas apicais onde o consumo de O<sub>2</sub> é alto, possivelmente células em condição de anóxia. As zonas apicais das raízes, com rápidas taxas de consumo de O<sub>2</sub> e poucos espaços intercelulares para conduzir a difusão gasosa, são susceptíveis a hipóxia mesmo no ar, quando as temperaturas (e então as taxas respiratórias) são altas (Armstrong & Beckett, 1985).

Após 24 h de inundação, com temperaturas ambiente superiores a 20 °C, pode haver esgotamento total do O<sub>2</sub> do solo devido ao consumo por microorganismos, fauna e raízes (Armstrong *et al*, 1994; Drew *et al*, 2000; Liesack *et al*, 2000), ocasionando o acúmulo de gás carbônico, metano e gás sulfídrico (Costa, 1996; Liesack *et al*, 2000).

A pressão crítica de O<sub>2</sub> ocorre quando a concentração de O<sub>2</sub> está baixa e as taxas de ATP/ADP começaram a declinar (Waters *et al*, 1991), que indica a restrição da fosforilação oxidativa. Isso caracteriza condições de hipóxia ou anóxia em torno das raízes, que é o principal determinante dos efeitos adversos do alagamento (Dennis *et al*, 2000).

A 25 °C a pressão crítica de O<sub>2</sub> aumenta com a taxa de consumo começando a ser inibida pela restrição do suprimento de O<sub>2</sub>, isso em torno de 30% numa solução bem movimentada e em torno de 10% em vapor de água com gases saturados do meio (Saglio *et al*, 1984; Thomson & Greenway, 1991). A concentração de O<sub>2</sub> dissolvida na água, a 20 °C, em equilíbrio com o ar é de 277 µM. Estima-se (Millar & Bergersen, 1994) que o Km para as enzimas oxidase alternativa e citocromo oxidase presentes na mitocôndria isolada de raízes de soja, é de 1,7 e 0,14 µM, respectivamente, enfatizando que na mitocôndria as exigências de O<sub>2</sub> são muito baixas. Como ocorre uma alta resistência à difusão radial do O<sub>2</sub> nas células das raízes (Drew, 1997), se justifica a diferença entre os baixos Kms dessas enzimas mitocondriais e disponibilidade de O<sub>2</sub>.

Entende-se por normóxia quando o suprimento de O<sub>2</sub> não limita a fosforilação oxidativa. Na hipóxia, a pressão parcial de O<sub>2</sub> limita a produção de ATP pela mitocôndria e a

anóxia acontece quando a produção de ATP pela fosforilação oxidativa é desprezível, em relação ao ATP gerado pela glicólise e fermentação (Drew, 1997).

O oxigênio é vital no fornecimento de energia para as vias celulares, e sua presença ou ausência determina a atividade metabólica e produção de energia. Ele serve como um aceptor de elétrons na fosforilação oxidativa que regenera o ATP, principal fonte de energia para o metabolismo celular, através da regeneração do  $\text{NAD}^+$  reduzindo o NADH, viabilizando o poder de sustentação das vias bioquímicas (p. ex. glicólise) (Dennis *et al*, 2000). Sem  $\text{O}_2$  a respiração mitocondrial cessa por falta de um aceptor de elétron. Isso resulta na queda de 36 para 2 moles de ATP por mole de glicose metabolizada. A diminuição na produção de ATP sob anóxia é refletida na falência da germinação ou crescimento, e um declínio na integridade do tecido em direção à morte (Fox *et al*, 1994). Já, a hipóxia acarreta uma série de modificações morfológicas [p.ex. formação de aerênquima (Thomas, 2004)] e adaptações metabólicas nas plantas (Sousa, 2001; Sousa & Sodek, 2002; Sousa & Sodek, 2003).

### **1.3 Influência da assimilação do nitrato sobre o desenvolvimento de plantas com sistemas radiculares sob deficiência de $\text{O}_2$**

A assimilação do nitrato é um dos principais processos que ocorrem nas raízes durante o metabolismo aeróbico (Reggiani *et al*, 1985a,b), que acontece de forma ativa, independentemente da concentração externa (Williams & Miller, 2001). Na assimilação do nitrato, o nitrogênio é reduzido a nitrito para posterior redução em amônio, e finalmente ele é transformado em nitrogênio-amida da glutamina. Este processo consome o equivalente a 12 ATPs para cada nitrogênio. O nitrato absorvido pode ser assimilado e/ou acumulado no vacúolo das células da raiz, ou ainda transportado para as folhas para posterior assimilação na parte aérea (Bloom *et al*, 1992).

Havendo redução do nitrato no interior das raízes, ele também pode ser um acceptor alternativo de elétrons para o NADH. Sendo assim, a proteção do nitrato contra o dano da anóxia levanta a hipótese da “respiração de nitrato”, que é bem conhecida em microorganismos anaeróbicos facultativos (Morard *et al*, 2004c).

Esse fenômeno tem sido observado na atividade respiratória de raízes na presença de nitrato. Adicionando esse íon no meio, houve aumento no quociente respiratório (Ruhland & Ulrich, 1929; Burstrom, 1945). Arnon (1937) e Malavolta (1954) mostraram a importância desse acceptor alternativo como dreno de elétrons quando o suprimento de oxigênio é diminuído em cevada e arroz, respectivamente. Essas plantas, ao contrário do esperado, se desenvolveram melhor na presença de nitrato que na de amônia, quanto ao suprimento de nitrogênio (Reggiani *et al*, 1985). Isso também foi observado por Thomas (2004) em soja.

Generalizando, na base bioquímica da tolerância à anóxia estão envolvidos: a regulação do pH citosólico que evita a acidificação, a manutenção da glicólise para geração de ATP, regenerando  $\text{NAD}^+$  a partir do NADH, e a formação de metabólitos e produtos finais que sejam inócuos ou facilmente transportados para a solução externa (Ricard *et al*, 1994. Drew, 1997; Summers, 2000). Sabe-se que a adição de nitrato sob condições de hipóxia, torna o pH do citoplasma menos ácido (Roberts *et al*, 1985; Reggiani *et al*, 1985a,b; Fan *et al*, 1988; Allégre *et al*, 2004). Uma das hipóteses de que a redução do nitrato pode prevenir a diminuição do pH, ocorre através da expulsão de  $\text{H}^+$  do citoplasma com o transporte de nitrito para fora da célula (Shingles *et al*, 1996).

Geigenberger *et al* (2000) demonstraram que o pirofosfato (PPi) pode ser utilizado como um doador de energia alternativo, já que é mantido em altas concentrações em condições de hipóxia, contrastando com a diminuição do ATP, UTP e GTP. Por isso tem sido sugerido que estas adaptações metabólicas permitem o consumo de ATP para prevenir o

tecido contra anóxia. O nitrato em altas concentrações também poderia desempenhar papel análogo ao PPI (Morard *et al*, 2004c).

Em anaerobiose a quantidade de nitrato endógeno diminui, tanto na presença quanto na ausência do mesmo (Reggiani *et al*, 1985; Sousa & Sodek, 2002), mostrando dessa forma que as plantas possuem um mecanismo de utilização do nitrato durante a hipóxia.

No entanto, importância da função da utilização do nitrato durante a anaerobiose ainda é polêmica e controversa (Reggiani *et al*, 1985). Em vários casos, a taxa de redução do nitrato é considerada desprezível quando relacionada ao “turnover” do NADH associado com produção de etanol (Lee, 1978; Regginai *et al*, 1985b; Saglio *et al*, 1988). Em alguns testes a adição de nitrato não teve efeito direto na redução da síntese de etanol (Lee, 1978; Saglio *et al*, 1988) e, em outro caso, foi registrado aumento na fermentação alcoólica após adição de nitrato (Reggiani *et al*, 1985b). Saglio *et al* (1988) não encontraram uma evidência positiva do efeito do nitrato sobre o metabolismo energético. Por essa razão, para a maioria dos autores o nitrato aparece apenas com a função de fonte de nitrogênio inorgânico para o metabolismo e crescimento (Morard *et al*, 2004c), mas sabe-se, no entanto, que as facetas do metabolismo do nitrato facilitam a sobrevivência de espécies tolerantes durante o período parcial de anóxia, começando como uma alternativa de aceptor de elétrons do NADH, subsequente aminação do piruvato e aumento no “turnover” de aminoácidos. Os vários produtos da glicólise, incluindo os aminoácidos, podem ser translocados para a parte aérea (Garcia-Novo, 1973).

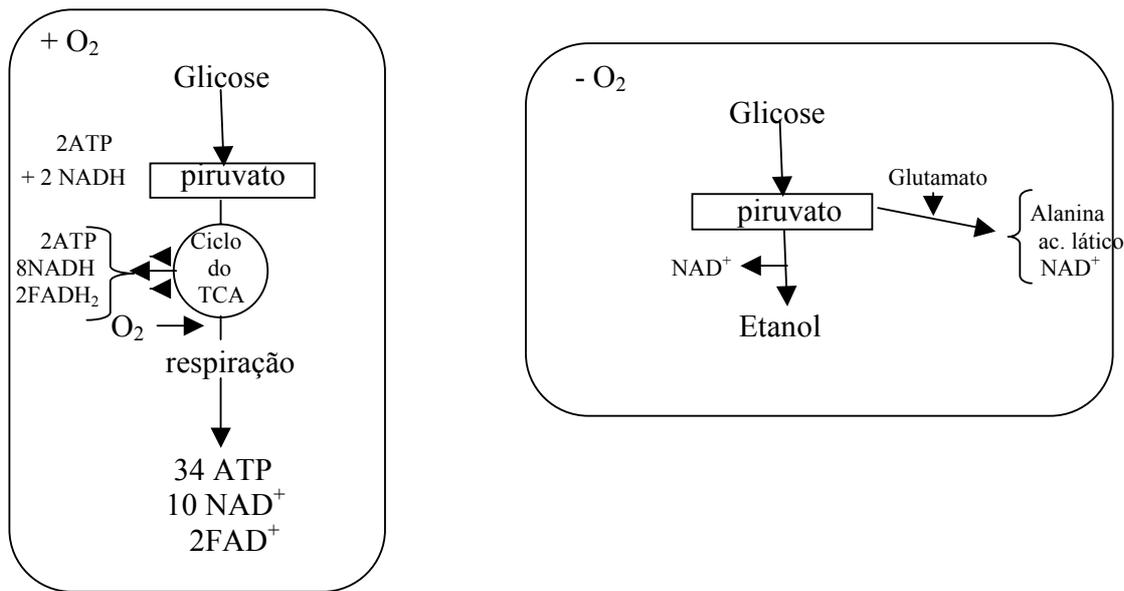
#### **1.4 Alterações metabólicas em plantas com sistema radicular sob deficiência de O<sub>2</sub>**

Os tecidos com altas atividades metabólicas estão mais sujeitos a se tornarem hipóxicos, especialmente quando eles têm carência de espaços intercelulares, contém células

com poucos vacúolos ou estão localizadas no centro de órgãos distantes de onde o oxigênio penetra na planta (Dongen, 2003). A primeira consequência desse processo é a diminuição ou consequente parada (anóxia) da respiração aeróbica. A cadeia transportadora de elétrons, situada na mitocôndria, pára e a síntese de ATP é inibida (Blokhina, 2000). Nessas condições, as vias fermentativas como as fermentações láctica e alcoólica são promovidas e afetam a carga de energia da célula e a taxa de NADH/NAD<sup>+</sup> (Chrikova & Belonogova, 1991).

As plantas possuem essas vias de fermentação, e as pesquisas têm se preocupado com a presença e importância delas, como um mecanismo de recuperação quando a respiração é interrompida. Três principais vias são ativadas (Ricard *et al*, 1994) quando isso acontece: a do etanol, a do ácido láctico e uma que é específica de plantas, que produz alanina a partir do glutamato e piruvato, envolvendo a AlaAT (alanina aminotransferase)(Dennis *et al*, 2000; Sousa & Sodek, 2002) (fig. 1). Em plantas sob condições normais de oxigenação, essas vias estão ausentes ou com atividade bastante reduzida, mas são rapidamente induzidas em baixa concentração de O<sub>2</sub>, o que sugere um papel no mecanismo de sobrevivência das plantas, embora não se conheça qual a extensão da contribuição e como elas se relacionam em baixo teor de O<sub>2</sub> (Dennis *et al*, 2000).

A injúria e morte das raízes têm sido atribuídas ao acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos durante a fermentação (principalmente o etanol), a falta de substratos para a respiração e a diminuição no metabolismo energético (Drew, 1997). Observou-se em abóbora após 10-15 h de anóxia que a baixa carga de energia, levou as células à morte porque ocorreu degradação da ultraestrutura da mitocôndria (Vartapetian *et al*, 2003). Esse fenômeno não pode ser revertido mesmo sendo restabelecida a aeração. A ultraestrutura mitocondrial pode ser preservada através de hidrólise do amido de reserva e ativação de enzimas da fermentação que limitam esses efeitos (Baxter-Burrell *et al*, 2002).



**Figura 1. Variação ocorrida no metabolismo em plantas submetidas a baixa concentração de  $O_2$  (Dennis *et al*, 2000).**

O modelo estático de pH sugere que a escolha entre a fermentação alcoólica e a do ácido láctico seja conduzida pelo pH citosólico. A fermentação láctica produz ácido láctico, desse modo diminuindo o pH e inibindo a LDH (lactato desidrogenase), mas ativando a PDC (piruvato descarboxilase) e a ADH (álcool desidrogenase) (Davis, 1980; Baxter-Burrell *et al*, 2002). Estudos com ressonância magnética têm mostrado que o pH citosólico acidifica-se durante o alagamento em raízes de milho, e que após um prolongado tratamento, o álcool é o principal produto da fermentação (Fox *et al*, 1995). Plantas que são mais tolerantes ao alagamento têm a via de fermentação alcoólica mais ativa, e mutantes que tem ADH “desativada” são mais sensíveis ao alagamento (Roberts *et al*, 1984b). No entanto, evidências recentes, sugerem que esse papel da fermentação do ácido láctico causando acidez do citosol é simplista. Novas evidências sugerem que a queda do pH não é unicamente causada pela atividade metabólica (fermentação do ácido láctico), e sim, principalmente pela falta de ATP para as bombas de próton ATPases das membranas, resultando na despolarização das membranas das células das raízes (Buwalda *et al*, 1988; Ricard *et al*, 1994; Ratcliffe, 1997).

Esse fenômeno induziu um rápido efluxo de  $K^+$  em células de plantas de pepino (Bertoni *et al*, 1993) e tomate (Morard *et al*, 2000) nas mesmas condições experimentais. Da mesma forma, a via fermentativa e perda passiva de íons de  $H^+$  do vacúolo para o citoplasma levam a uma acidificação do citoplasma da célula (Botrel & Kaiser, 1997; Allègre, 2003), reduzindo a tolerância à anóxia (Roberts *et al*, 1984b; Kaiser & Huber, 2001; Drew & Armstrong, 2002). No entanto, em condições de anóxia, a expulsão de  $H^+$  pelas raízes de milho aumenta quando o pH citoplasmático diminui (Xia & Roberts, 1996), regulando o pH do mesmo, limitando a acidez celular, aumentando dessa forma a sobrevivência das células (Drew, 1997). Além disso, a acidificação do citosol promove a atividade da RN, resultando em liberação de nitrito para fora das células (Botrel *et al*, 1996; Allègre 2003; Stoimenova *et al*, 2003).

Em raízes de soja, cv. IAC-17, não noduladas, sob hipóxia, o destino principal do piruvato é a conversão a Ala, com baixa síntese de etanol e lactato (Sousa, 2001). Porém, não pode ser descartada a hipótese de que o etanol possa ser difundido ao meio externo, uma vez que não foi avaliado o teor de etanol na solução nutritiva. Por outro lado, essa pode ser uma característica da cultivar estudada, tendo em vista que certos cultivares de soja, sob hipóxia, não aumentam a atividade da enzima ADH, que converte acetaldeído em etanol (Kennedy *et al*, 1992).

Sob deficiência de oxigênio, ocorrem modificações na composição de aminoácidos na seiva do xilema e da raiz, diminuindo os níveis de Glu, Asp e suas amidas e acumulando Ala e Gaba, principalmente (Sousa, 2001). Ala e Gaba são sintetizados a partir de Glu que deve ser produzido constantemente em condições de hipóxia, já o Glu pode derivar de processos proteolíticos, transaminação de outros aminoácidos, reassimilação de  $NH_4^+$  através do ciclo da glutamina sintetase/glutamato sintase e redução de nitrato (Reggiani *et al*, 1988; Reggiani, 1999; Reggiani *et al*, 2000).

A síntese de ALA pode ter como fonte de N, a transaminação indireta com ASP, via AspAT e, diretamente com GLU, através da AlaAT (Sousa & Sodek, 2002), tendo em vista que a AlaAT não aceita ASP como doador do grupo amino (Sousa & Sodek, 2003). Porém, pouco se sabe sobre a importância da formação de Ala sob hipóxia, visto que sua síntese a partir do piruvato não regenera  $\text{NAD}^+$  (Sousa & Sodek, 2002), embora contribua para a regulação do pH celular (Reggiani *et al*, 1988).

A síntese do GABA ocorre pela  $\alpha$ -descarboxilação do Glu, reação catalisada pela glutamato descarboxilase. A função do Gaba, em condições de hipóxia, parece ser de regular o pH celular (Reggiani, 1999; Shelp *et al*, 1999; Sousa & Sodek, 2002).

O que poderia justificar o acúmulo desses dois aminoácidos principais em condições de hipóxia é que, no caso da Ala, a mesma não causa toxicidade na célula, diferentemente de outros produtos da fermentação (p.ex. etanol) (Drew, 1997), e o Gaba é acumulado porque é difícil de ser metabolizado, já que a transaminação na qual o Gaba participa para sob hipóxia, uma vez que o pH ótimo para atividade da enzima é 8,9 (Streeter & Thompson, 1972a), um valor difícil de ser alcançado nessas condições.

Se somente o etanol fosse o produto final da glicólise, quantidades tóxicas seriam produzidas, isso pode ser visto no número de plantas intolerantes à hipóxia. As plantas tolerantes têm outros produtos finais, como aminoácidos e ácidos orgânicos. Esse fenômeno juntamente com outros aspectos metabólicos ajuda na sobrevivência sobre anóxia parcial (Crawford, 1972; Drew, 1997).

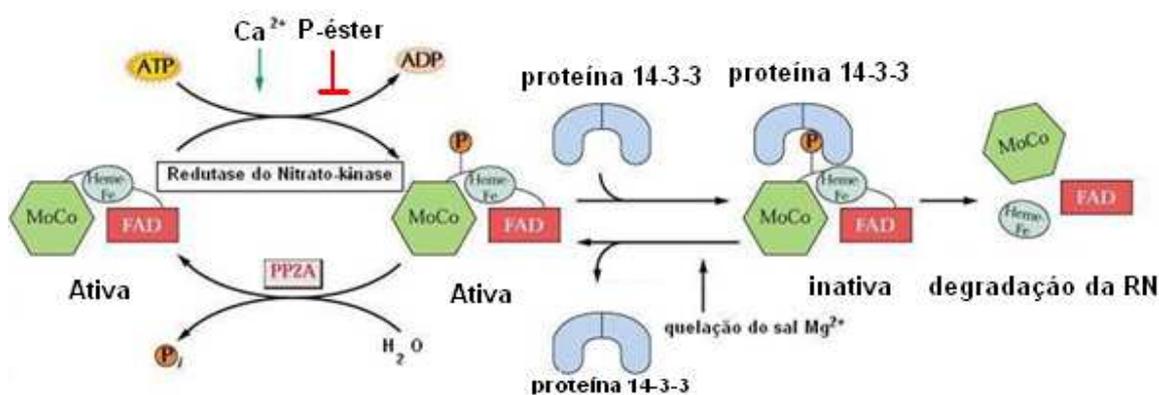
### **1.5 Deficiência de $\text{O}_2$ na atividade enzimática: RN e RNi**

A RN é uma enzima chave no processo de assimilação de nitrato pelas plantas (Botrel *et al*, 1996; Datta & Sharma, 1999; Campbell, 2001; de la Haba *et al*, 2001), que cataliza a

seguinte reação:  $\text{NADH} + \text{NO}_3^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$ . O nitrato absorvido pelas raízes é reduzido a nitrito pela RN e então o nitrito é reduzido pela RNi (redutase do nitrito) à amônia. A amônia é incorporada à estrutura dos aminoácidos através do sistema enzimático (Aslam *et al*, 2001) glutamina sintase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase (GS-GOGAT), fornecendo nitrogênio para as plantas (Heller *et al*, 1998).

Para indução da RN é necessária a presença de nitrato, ou seja, a atividade da RN é regulada pelo “pool” metabólico de nitrato localizado no citoplasma sob condições de normóxia (Ferrari *et al*, 1973; Aslam *et al*, 1976; Allègre *et al*, 2004; Lea *et al*, 2004). A concentração de nitrato no “pool” citoplasmático é menor e mais constante que o “pool” vacuolar (Ferrari *et al*, 1973; Martinoia *et al*, 1981; Zhen *et al*, 1991). Em raiz de cevada sob normóxia, a concentração exógena de nitrato determina a quantidade de íons de nitrato nos “pools” metabólicos e não-metabólicos (vacuolar) (Aslam *et al*, 2001).

Vários estudos indicam que a síntese da nitrato redutase é promovida além do nitrato, pela luz, fitocromo e fotossíntese (Appenroth *et al*, 2000; de la Haba *et al*, 2001). A atividade da mesma é modulada tanto pela fosforilação como por uma proteína específica conhecida como 14-3-3 (Weiner & Kaiser, 1999, 2000). Em espinafre, a fosforilação da redutase envolve a serina-543 e é o primeiro passo para sua inativação (Kanamaru *et al*, 1999). A completa inativação ocorre quando a forma fosforilada é associada à proteína 14-3-3. Essa ligação é iniciada por cátions divalentes como o  $\text{Mg}^{+2}$  e o  $\text{Ca}^{+2}$  (Weiner & Kaiser, 2001). A ativação da RN ocorre na dissociação dessa proteína (14-3-3) assim como sua desfosforilação (Huber *et al*, 1996; Chung *et al*, 1999) (figura 2).



**Figura 2. Modelo proposto para regulação da atividade da RN através da fosforilação/desfosforilação e a reversível ligação da proteína 14-3-3. A RN é fosforilada por proteínas kinases em um resíduo de serina. RN fosforilada está ativa e quando ligada ao dímero 14-3-3 se torna inativa (Buchanan *et al*, 2001).**

No entanto, existem poucas informações sobre a regulação da mesma em raízes. No caso de cevada, a enzima é ativada pela desfosforilação, provocada pelo fornecimento de manose ou em condições de anóxia (Botrel *et al*, 1996; de la Haba *et al*, 2001). Tecidos de raízes anóxicas têm uma maior quantidade de RN ativa que os controles aerados (normóxicas) (Glaab & Kaiser, 1993), mas os mecanismos que regulam RN em anóxia não são bem definidos.

Nas células das folhas das plantas, todo nitrito, nitrato, RN e NADH estão presentes no mesmo compartimento, isto é no citosol. Sob condições ótimas, o nitrito é translocado para dentro do cloroplasto e reduzido a amônia pela atividade da RN<sub>i</sub>, na presença de ferredoxina reduzida (Yamasaki & Sakihama, 2000), que pode ser fornecida pela atividade do transporte de elétrons provenientes da fotossíntese, na membrana dos tilacóides. No entanto, nitrito pode estar presente no citosol em uma quantidade significativa quando o transporte de elétrons fotossintéticos não esta operando (Rinaldi & Comandini, 1999), ou no caso da raiz, quando o

oxigênio estiver ausente. Isso porque, quando um tecido está sob condições de anóxia, a via de utilização do nitrato é parcialmente ou completamente “parada” no passo da nitrito redutase (Lee, 1978, 1979; Botrel *et al*, 1996), pois por algum motivo desconhecido a redução de nitrito necessita de oxigênio (Aslam *et al*, 1979). Isso resulta no aumento da concentração do nitrito intracelular associado também a uma liberação do mesmo no meio (Ferrari & Varmer, 1971; Lee, 1979; Glaab & Kaiser, 1993).

A produção de nitrito tem uma origem biótica, pois quando a solução nutritiva tem borbulhamento de N<sub>2</sub> sem a presença de planta, não há ocorrência de nitrito (Caumes, 2002). Portanto, a redução do nitrito é um processo bioquímico ligado ao metabolismo das células das raízes (Morard *et al*, 2000, 2004c) na presença de nitrato (Lea *et al*, 2004). Após o alagamento, a quantidade de nitrito aumenta em raízes e folhas e isso não é visto em condições de normóxia, sendo assim, ele é um sinal distinto e particular das condições de alagamento, já que não é detectado em condições de normóxia, sendo esse fato não restrito a plantas não tolerantes (Garcia-Novo, 1973).

Nitrito foi detectado na seiva do xilema de plantas de tomate sob condição de anóxia (Morard *et al*, 2004c). O fato de haver pouca quantidade de nitrito nos tecidos e a solução apresentar uma alta concentração indica que este pode estar sendo produzido durante a hipóxia e eliminado para fora do tecido (Lee, 1978; Reggini *et al*, 1985a; Botrel *et al*, 1996).

Em alagamento, há aumento da atividade da RN nas raízes e folhas de plantas tolerantes (*Rumex acetosa*, *Mentha aquática*, *Senecio aquaticus*, *Dactylis glomerata*, *Senecio vulgaris*) e tendência inversa ocorre nas folhas de plantas não tolerantes, que tiveram suas raízes inundadas, com exceção do *Arum italicum* (Garcia-Novo, 1973). As plantas não tolerantes *Geranium molle*, *Verabscum sinuatum* e *Dactylis hispânica*, não se desenvolveram bem em alagamento e tiveram extensivas áreas cloróticas em suas folhas. As raízes não sobreviveram após os dois meses e por essa razão não tiveram suas atividades enzimáticas

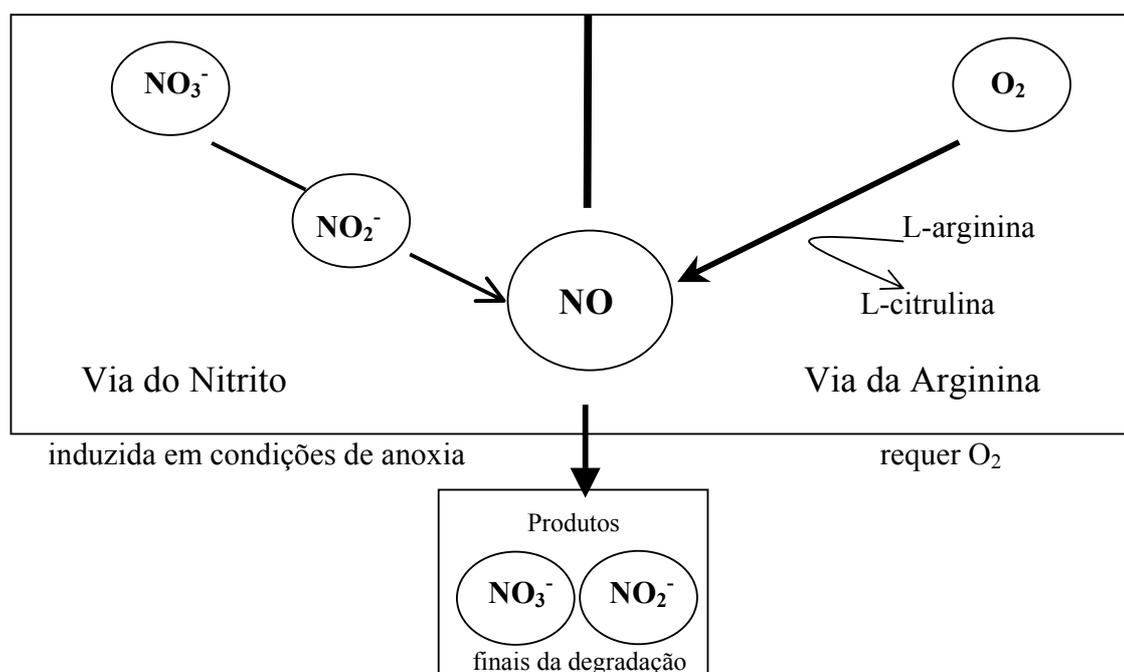
verificadas. Não ficou claro, se o aumento na atividade enzimática ocorreu de fato pelo alagamento ou devido ao suprimento de nitrogênio fornecido pela solução de Hoagland (15 mM) (Garcia-Novo,1973). Estimativas mostram que a quantidade de nitrato para induzir a atividade máxima da enzima é menos que 0,5 mM (Afridi & Hewitt, 1965; Stewart, 1972), o que sugere que o aumento na atividade se dê devido à condição de alagamento e não de nitrato extra (Garcia-Novo,1973).

### **1.6 Função e síntese de NO x RN**

Nos últimos anos, o NO tem sido alvo de um crescente estudo em plantas. Ele é um radical livre gasoso e um versátil sinalizador celular (Magalhães *et al*, 2002; Lea *et al*, 2004) e tem sido relacionado com resistência a patógenos, fechamento estomático, respostas a estresses abióticos, homeostase do ferro e a vários processos do desenvolvimento, como síntese de lignina e floração (Neill *et al*, 2002a, b; Polverari *et al*, 2003; He *et al*, 2004; Parani *et al*, 2004; Wendehenne *et al*, 2004). Isso foi mostrado a partir de técnicas de “microarrays”, “northern blots”, assim como análises de longos fragmentos de cDNA amplificados, em *A. thaliana*, já que ele governa a regulação de expressão de vários genes envolvidos nesses processos. NO também influencia na síntese dos ácidos salicílico e jasmônico e também do etileno (Huang *et al*, 2004; Parani *et al*, 2004). A compreensão de como ocorre essa regulação ainda é pouco conhecida (Lamotte *et al*, 2005).

O maior avanço no entendimento da função do NO em plantas, tem sido identificar enzimas que catalisam síntese de NO (figura 3). A RN foi a primeira fonte enzimática de NO a ser identificada (Yamasaki & Sakihama, 2000). Em adição à função da redução do nitrato, a RN catalisa a redução do nitrito em NO usando NADP(H) como cofator (Yamasaki & Sakihama, 2000; Rockell *et al*, 2002) sob condições de estresse de hipóxia (Allègre *et al*, 2004).

Recentemente foi discutido por Meyer *et al* (2004) que o NO pode funcionar como um sinalizador (Desikan *et al*, 2002) ou como um simples produto secundário da atividade da RN. No entanto, existem outras fontes enzimáticas de NO em plantas (Stöhr *et al*, 2001), e este, também pode ser gerado não enzimaticamente por doares de moléculas, como o nitroprussiato de sódio (SNP), penicilamina- *N*-acetil-*S*-nitroso (SNAP), sidnomina-3-morfolino e pfenilnitrona- *N*-*tert*-buti (Leshem, 1996; Rucki, 1997) para fins experimentais, em condições apropriadas (Magalhães *et al*, 2002).



**Figura 3. Duas vias para produção de NO em plantas. Existem dois principais mecanismos para produção de NO em plantas: a via do nitrito e da arginina. A via do nitrito é um simples caminho para produzir NO através da redução de 1 elétron de nitrito. Essa reação pode ocorrer com algumas enzimas que incluem um domínio redox (p.ex. RN). A outra via, arginina, pode ser catalisada pela NOS com L-arginina, NADPH e  $\text{O}_2$ . A diferença fundamental entre elas, é que no segundo caso, há necessidade da presença de  $\text{O}_2$ , diferentemente da primeira via (Yamasaki, 2005).**

Relativamente, poucos componentes da transdução em cascata que media o NO foram identificados em plantas, mas existe uma boa evidencia de que o  $\text{Ca}^{2+}$  esteja envolvido como mensageiro secundário (Lamotte *et al*, 2005).

O NO também pode causar efeitos citotóxicos (Leshem *et al*, 1997, 1998), que podem ser atribuídos ao peroxinitrito ( $\text{ONO O}_2$ ), que é produzido na reação de fusão do NO e superóxido ( $\text{O}_2$ ) (Yamasaki & Sakihama, 2000; Radi *et al*, 2001). O peroxinitrito é um potente oxidante que reage com diversas moléculas biológicas (Pryor & Squadrito, 1995; Beckman & Koppenol, 1996). Grandes concentrações desse composto causa efeitos deletérios em lipídios, proteínas (Rinaldi & Comandini, 1999) e DNA (Rinaldi & Comandini, 1999; Cadenas & Davies, 2000)

### **1.7 Justificativa do trabalho**

Na revisão da literatura, não há dúvida sobre a importância da presença do nitrato como fonte de nitrogênio na tolerância a condições de hipóxia, entretanto os mecanismos de atuação do mesmo, não foram ainda elucidados. Vários trabalhos fazem referência à ativação da enzima RN (que reduz o nitrato a nitrito) sob essa condição, o que indica um papel relevante na regulação dessa tolerância. Por esse motivo, procurou-se neste estudo entender melhor o papel do nitrato e da RN no processo de tolerância à condição de hipóxia.

## **2. OBJETIVOS**

- Otimizar método para extração da enzima RN em plantas de soja.
- Avaliar o papel da enzima RN em condições de hipóxia do sistema radicular.
- Avaliar a utilização e metabolismo do nitrato em condições de hipóxia do sistema radicular.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal e Condições de Cultivo

Foram utilizadas sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill cv IAC-17], desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). A cultivar possui um ciclo precoce de 110-120 dias, com hábito de crescimento determinado, flores roxas, vagens de coloração marron-claro, pubescência marron e sementes amareladas, com hilo preto.

As sementes foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação em condições naturais de luz e temperatura (temp. média mínima de 19 °C e máxima de 38 °C). Quando atingiam o estágio de desenvolvimento V0 (plântulas com cotilédones abertos) – definido por Fehr *et al* (1971) – as plântulas foram selecionadas e transplantadas para sistema hidropônico. Cada vaso continha 3 plantas e um volume total de 2,5 L. Estas foram, então, cultivadas em solução nutritiva (+ N, N=NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) de Hoagland & Arnon (1938) + Fe-EDTA, sob borbulhamento constante de ar comprimido (normóxia). A solução era renovada semanalmente.

A partir do estágio V2, as plantas precisaram ser tutoradas para não tombarem.

Os experimentos foram realizados no decorrer das estações da primavera e verão, ocasionalmente no outono / inverno, mas nesse caso foi necessário o uso de aquecedores elétricos, principalmente durante a noite para que a temperatura mínima fosse mantida em 20 °C.

### 3.2 Soluções nutritivas

Foram preparadas duas soluções nutritivas, baseadas em Hoagland & Arnon (1938).

Uma com  $\text{NO}_3^-$  (+N), 10 vezes concentrada, e outra sem  $\text{NO}_3^-$  (-N), conforme abaixo:

**Solução +N (10x conc.):**  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50 mM);  $\text{KNO}_3$  (50 mM);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (20 mM);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,46 mM);  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,09 mM);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (7,65  $\mu\text{M}$ );  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3,20  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,56  $\mu\text{M}$ ).

**Solução -N:**  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 mM);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 mM);  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2 mM),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (2 mM);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,046 mM);  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (9,1  $\mu\text{M}$ );  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,765  $\mu\text{M}$ );  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,32  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,56  $\mu\text{M}$ ).

As duas soluções foram preparadas com macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro. O íon foi adicionado apenas no momento de se colocar as soluções nas plantas. Para isso, acrescentou-se à solução +N (devidamente diluída: força total, 1 L de solução para 10 L de água; 1/2 força, 1 L de solução para 20 L de água e 1/3 de força, 1 L de solução para 30 L de água) ou -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  $\text{NaOH}$  (3,65 g/L).

### 3.3 Tratamentos realizados

Até o estágio de desenvolvimento V4 (Fehr *et al*, 1971), as plantas eram cultivadas com solução nutritiva a uma concentração de 1/3 de força e pH inicial 6,5. No estágio V4 (3º par de folhas trifolioladas expandidas) eram iniciados os tratamentos onde eram substituídas as respectivas soluções nutritivas para concentrações de nitrato e pH específicos e em seguida submetidas à deficiência de oxigênio (hipóxia) no sistema radicular através da suspensão do borbulhamento de ar comprimido, somado a aplicação de uma camada de 70 mL de óleo mineral sobre a solução. Este tratamento foi realizado durante 1, 2, 3 e 4 dias

(especificamente 24, 48, 72 e 96 h). Em alguns experimentos, ao final desse período, as plantas eram sujeitas ao retorno à condição de normóxia, com duração de 1 até 4 dias, após retirado o óleo da superfície com auxílio de uma esponja e restaurado o borbulhamento de ar comprimido na solução.

Quando necessária a utilização de SNP (nitroprussiato de sódio), o mesmo foi aplicado de duas formas, na primeira as raízes foram suspensas e pulverizadas com uma solução de SNP 0,1 mM e após 5 minutos foram novamente submersas nos vasos contendo solução nutritiva; e na segunda o SNP foi colocado diretamente na solução do vaso, na concentração de 0,01 mM.

No experimento em que foi usado o antibiótico cloranfenicol (CAP), o mesmo foi utilizado a uma concentração de 50  $\mu$ M, aplicado diretamente na solução nutritiva dos vasos das plantas.

### **3.4 Parâmetros avaliados**

Foram avaliados os seguintes parâmetros: a atividade da enzima RN no sistema radicular pelos métodos *in vivo* e *in vitro*; a concentração de proteína e amônia da raiz; a concentração de aminoácidos livres totais, nitrato e nitrito da raiz e da seiva do xilema; a concentração de nitrato e nitrito da solução nutritiva do vaso. Todos esses procedimentos foram realizados tanto nas plantas controle (permanentemente aeradas), quanto nas plantas sujeitas aos tratamentos (hipóxia) e recuperadas da hipóxia (normóxia) diariamente até completarem 4 dias.

### **3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas**

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizados com 3 vasos, cada qual representando uma repetição contendo 3 plantas. Aos

dados quantitativos obtidos, aplicou-se análise de variância e, nos casos significativos, comparou-se as médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Gomes, 1990).

### **3.6 Métodos analíticos**

#### **3.6.1 Extração de metabólitos das raízes**

##### **3.6.1.1 Extração de aminoácidos totais, nitrato, nitrito e amônia**

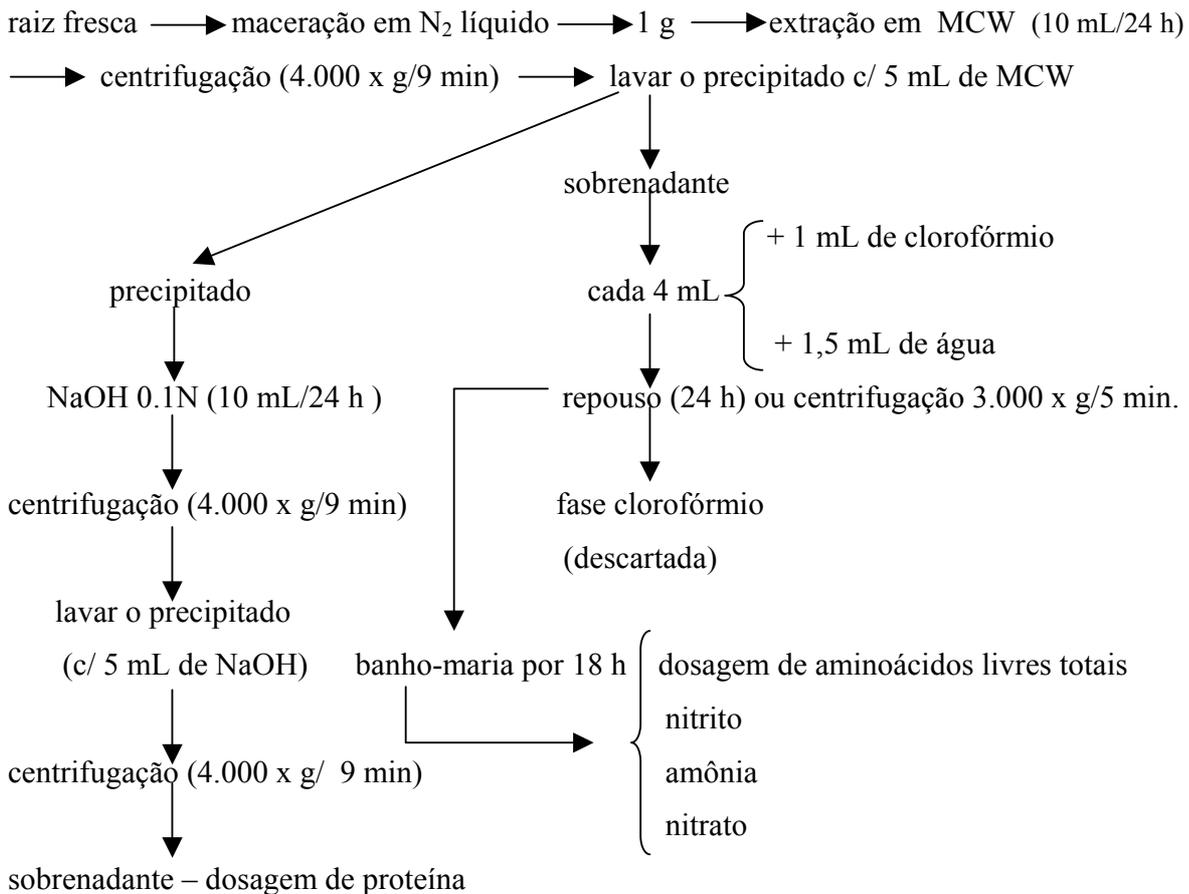
As raízes foram coletadas, lavadas com água de torneira e destilada, e, posteriormente enxugadas em papel absorvente. Toda raiz foi macerada com nitrogênio líquido com auxílio de um cadinho e pistilo e separou-se 1 g desse material em tubo de ensaio, que em seguida foi submetido à extração adicionando-se 10 mL de MCW (metanol: clorofórmio: água) na proporção 12:5:3, de acordo com Bielecki & Turner (1966). Após 24 h, o extrato foi centrifugado a 4.000 x g por 9 minutos. Recuperou-se a fração sobrenadante em proveta e adicionou-se mais 5 mL de MCW para lavar as raízes, mexendo com um bastão de vidro por aproximadamente 10 minutos. Após esse tempo, centrifugou-se novamente e juntou-se a fração sobrenadante inicial. Para cada 4 mL dessa fração, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Agitou-se, deixando-se, em seguida, em repouso por 24 h. No decorrer deste período ocorreu a separação das fases, sendo retirada a fase aquosa superior, com auxílio de pipeta de Pasteur, descartando-se a fase clorofórmio inferior. O precipitado foi mantido no tubo para extração de proteínas, conforme figura 4.

A fase aquosa foi, submetida ao banho-maria a 38 °C por cerca de 18 h, para eliminação do resíduo de clorofórmio e conseqüentemente concentração das amostras. Ao final, mediu-se o volume e conservou-se em freezer.

##### **3.6.1.2 Extração de proteínas**

O resíduo obtido em 3.6.1.1 foi ressuspensão em 10 mL de NaOH 0,1 N, homogeneizado com auxílio de bastão de vidro. Após 24 h, centrifugou-se o extrato a

4.000 x g /9 min, coletando-se o sobrenadante, adicionou-se mais 5 mL de NaOH para lavar as raízes, mexendo com um bastão de vidro por aproximadamente 10 minutos. Após esse tempo, centrifugou-se novamente e juntou-se a fração sobrenadante inicial (vide figura 4).



**Figura 4. Esquema das principais etapas da extração de metabólitos nitrogenados das raízes**

### 3.6.2 Extração e dosagem da enzima RN de raízes

A extração e dosagem da RN (E.C.1.6.6.1) foi realizada de acordo com o método de Botrel & Kaiser (1997) com pequenas modificações, onde as raízes frescas foram maceradas

em nitrogênio líquido, com auxílio de um cadinho e pistilo. Para cada 1g de raízes adicionou-se 3 mL de tampão de extração Hepes-KOH, pH 7,6 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM (determina a forma ativa da enzima, RN ativa) ou EDTA 5 mM (determina a forma total da enzima, RN total); FAD 10 μM; Caseína 3%; DTT 1 mM. Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas (16.000 x g; 10 min; 4 °C). O sobrenadante foi conservado em gelo e posteriormente dessalinizado em colunas de PD 10 (Sephadex G-25) equilibradas com tampão de reação Hepes-KOH (50 mM), pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ou EDTA 5 mM; FAD 10 μM; DTT 1 mM. Após a dessalinização, as amostras foram conservadas em gelo e montou-se os ensaios em tubos tipos eppendorf a uma temperatura de 30 °C, com volume total de 1 mL, sendo: 300 μl de extrato + 300 μl de tampão de reação + 200 μl de NADH (0,5 mM) + 200 μl de KNO<sub>3</sub> (1 mM). A incubação foi de 0, 15 e 30 minutos e após esse tempo, a reação foi paralisada com 125 μl de acetato de zinco (0,5 M). O material foi então centrifugado (16.000 x g/ 4 min. centrífuga eppendorf) e usado para dosagem de nitrito, conforme descrito no item 3.7.4.

### **3.6.3 Dosagem da enzima RN *in vivo* em raízes**

A dosagem *in vivo* da RN foi realizada de acordo com o método descrito por Majerowicz *et al* (2003), onde raízes frescas foram cortadas em partes menores com o auxílio de uma tesoura e colocadas em seringas de volume de 10 mL. Para cada 0,5 g de raízes adicionou-se 4 mL de meio de reação (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 7,5, KNO<sub>3</sub> 0,05 M + propanol 1%). Após colocar o êmbolo da seringa, fez-se a inversão da mesma para expelir o ar e puxar o meio de reação. Fechou-se a saída da seringa com o dedo e puxou-se o êmbolo 3 vezes para fazer vácuo com o material vegetal totalmente submerso no meio. As seringas foram conservadas no escuro, cobertas com papel alumínio e incubadas por 30 minutos em

temperatura ambiente. Após esse tempo, a reação foi paralisada retirando-se o meio de reação passando por um filtro de microfibras de vidro (GF/C 24 mm) acoplado à saída da seringa. O líquido obtido foi utilizado para dosagem de nitrito, conforme descrito no item 3.7.4. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### **3.6.3 Coleta de exsudato do xilema**

A coleta de exsudato ou seiva do xilema foi realizada entre 11 h e 12:30 h conforme McClure & Israel (1979). Com auxílio de lâmina de barbear foi feito um corte em bisel, logo abaixo do nó cotiledonar das plantas, separando-se a parte aérea das raízes. Em seguida, a região do corte foi lavada com água destilada e enxugada com papel absorvente, iniciando-se então, a coleta de exsudatos com auxílio de microcapilares de vidro. Os exsudatos foram coletados durante 40 minutos em tubos do tipo eppendorf, os quais permaneceram em banho de gelo. Após a coleta o material foi conservado em freezer.

## **3.7 Análises bioquímicas**

### **3.7.1 Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)**

A separação e análise de aminoácidos livres foram efetuadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivação com *o*-ftaldialdeído (OPA) (Benson & Hare, 1975; Jarret *et al*, 1986) com modificações (Marur *et al*, 1994).

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

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes tampão fosfato para a bomba A [="A": Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50 mM, CH<sub>3</sub>COONa 50 mM, 1,5 mL de

CH<sub>3</sub>COOH (pH 7,25), 20 mL de tetrahidrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol 65 % (=”B”) para a bomba B. Ambas as soluções foram deaeradas, sendo o tampão A filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana PVDF, com 0,45 µm de diâmetro.

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

As amostras de seiva do xilema foram centrifugadas (eppendorf) a 14.000 x g por 2 minutos para posterior derivação com a mistura OPA + mercaptoetanol.

Uma alíquota de 20 µL de amostra ou padrão foi misturada com 60 µL do reagente OPA + mercaptoetanol em microtubos do tipo eppendorf, agitando-se. Após 2 minutos de reação, tempo suficiente para se formar os derivados aminoácidos-OPA, uma alíquota de 10 µL de padrão/seiva, foi injetada na câmara de injeção de amostra do HPLC. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em gradiente dos dois tampões, A e B através da coluna cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2, 5 µm, 250 x 4,6 mm, da SUPELCO INC.) com fluxo de 0,8 mL/min, em um gradiente formado por quantidades crescentes de ”B” em relação à ”A”. O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de ”B” em relação a ”A” da seguinte forma: 20 % aos 0 min, 28 % aos 5 min, 58 % aos 35 min, 75 % aos 40 min, 95 % aos 56 min, 96 % aos 60 min e 100% aos 61 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica os derivados aminoácidos-OPA foram detectados por um monitor de fluorescência Shimadzu mod. RF-530, ajustado com λ de

excitação de 265 nm e  $\lambda$  de emissão de 480 nm. O sinal do monitor foi processado por um integrador LKB mod. 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS-18, com 15 aminoácidos protéicos (Asp, Glu, Ser, His, Gly, Thr, Arg, Ala, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu e Lys), ao qual foram adicionados os aminoácidos Asn, Gln e Gaba, todos à concentração de 250 nmol/mL (Figura 5).

### **3.7.2 Dosagem de aminoácidos solúveis totais (AA)**

Os AA foram determinados conforme método de Moore & Stein (1948). Extratos de raiz ou seiva do xilema devidamente diluídos em água, padrão de leucina (30-150 nmol) e água (branco) em volume de 750  $\mu$ l, em tubo de ensaio, foram acrescidos de 375  $\mu$ l de tampão citrato 0,2 M pH 5,0; 150  $\mu$ l do reativo de ninhidrina 5% em metil-celulose (éter monometílico de etilenoglicol) e 750  $\mu$ l de KCN 0,01 M a 2% (v/v) também em metil-celulose.

Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para banho-maria a 100 °C por 20 minutos. Em seguida, foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente foi acrescentado 1 mL de etanol 60 % (v/v) e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco, foi medida a 570 nm.

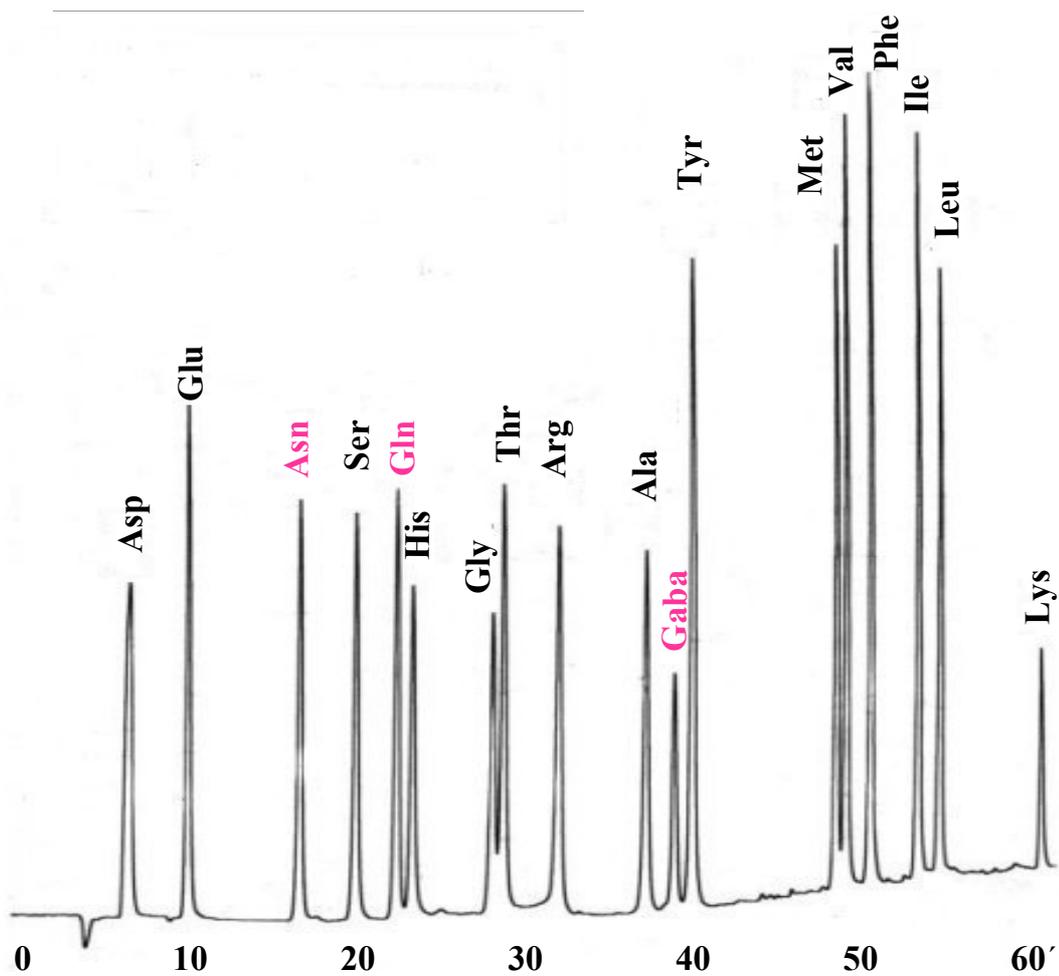


Figura 5. Perfis de eluição de derivados OPA-aminoácidos do padrão Sigma AAS-18, enriquecido com Asn, Gln e Gaba, em coluna cromatográfica Spherisorb ODS-2 (5 $\mu$ m, 4,6 mm x 250 mm) por HPLC.

### 3.7.3 Dosagem de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

A determinação de nitrato foi executada conforme método de Cataldo *et al* (1975). Em tubo de ensaio, foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de água (branco), amostras e padrões (0,2 a 1,0  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_3^-$ ) e 400  $\mu\text{L}$  do reagente salicílico (ácido salicílico 5 % p/v em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) agitando-se cada tubo. Decorridos 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 9,5 mL de NaOH 2 N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e medidas as densidades óticas, a 410 nm, dos padrões e amostras contra o branco.

### 3.7.4 Dosagem de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

A determinação de nitrito seguiu o método de Hageman & Reed (1980), onde foram utilizados 2mL de água (branco), amostras e padrões (0,01 a 0,1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$ ), 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 1 mL de N-(naftil)-etilenodiamina.2HCl, após agitação, os tubos repousaram por 30 minutos. As medidas das densidades óticas dos padrões e amostras foram lidas a 540 nm contra o branco.

### 3.7.5 Dosagem de Amônia

A determinação de amônia seguiu a metodologia estabelecida por McCullough (1967), utilizando-se 500  $\mu\text{l}$  de água, amostra ou padrão (20-200 mmol) e 2,5 mL dos reagentes I e II.

Reagente I: Fenol 0,1 M + SNP 170  $\mu\text{M}$

Reagente II: NaOH 0,125 M +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,15 M + NaOCl (3%  $\text{Cl}_2$ ). Após a adição do reagente I, agitou-se para depois acrescentar o II. Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para banho-maria a 37 °C, por 35 minutos. Em

seguida, esperou-se até os mesmos atingirem a temperatura ambiente. A densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco, foi medida a 625 nm.

### **3.7.6 Dosagem de proteínas**

A determinação de proteínas seguiu a metodologia estabelecida por Bradford (1976), utilizando-se os seguintes reagentes: 100 mg de coomassie brilliant G dissolvido em 50 mL de etanol 95%, ao qual se acrescentou 100 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% p/v, completando-se o volume com água para 1 L, filtrando-se em seguida em papel de filtro. Pipetou-se 100 µl do branco (água), amostras e padrões (10-100 µg de BSA) em tubos de ensaio e adicionou-se 5,0 mL do reagente de Bradford. Agitaram-se os tubos e determinou-se a D.O. das amostras e padrões a 595 nm, contra o branco.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ESTUDOS COM OS COMPOSTOS NITROGENADOS

#### 4.1.1 Experimento I – Utilização do nitrato pelo sistema radicular de soja durante a hipóxia em diferentes concentrações de nitrato e pH da solução nutritiva

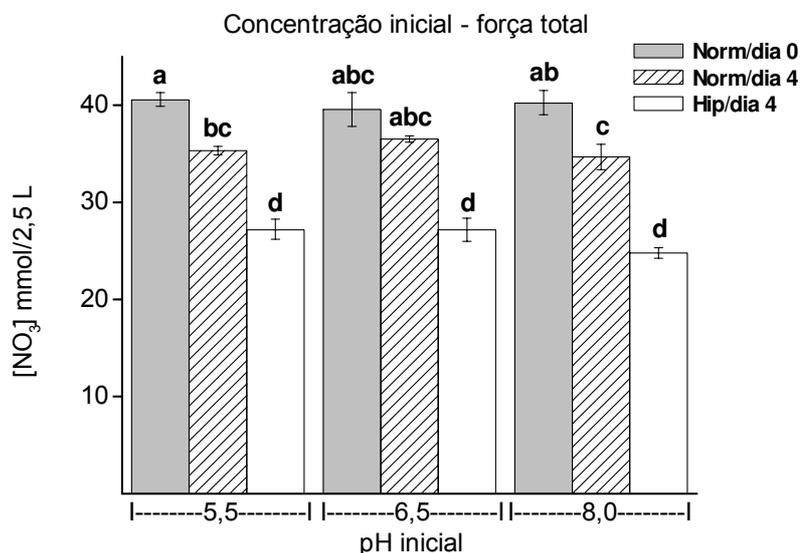
Esse experimento teve o objetivo de determinar quais as condições mais adequadas para cultivos das plantas, avaliando a importância de fatores externos como pH e concentração de nitrato da solução nutritiva do vaso.

As plantas foram cultivadas em hidroponia e o tratamento de hipóxia realizado usando uma combinação de soluções nutritivas com concentrações de nitrato de  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$  e força total e pH inicial de 5,5; 6,5 e 8,0. Após atingirem o estágio de desenvolvimento adequado (V4), as plantas foram separadas em dois grupos: normóxicas (controles) e hipóxicas, conforme o tratamento (concentração de nitrato e pH, por exemplo). As últimas foram submetidas ao estresse conforme já descrito no item 3.3 e as normóxicas tiveram sua aeração mantida regularmente. Em intervalos de 1 dia, desde o dia inicial (0) até 4 dias, foram coletadas amostras das soluções dos vasos para análise e acompanhamento diário do pH do meio.

#### Consumo do $\text{NO}_3^-$ do vaso

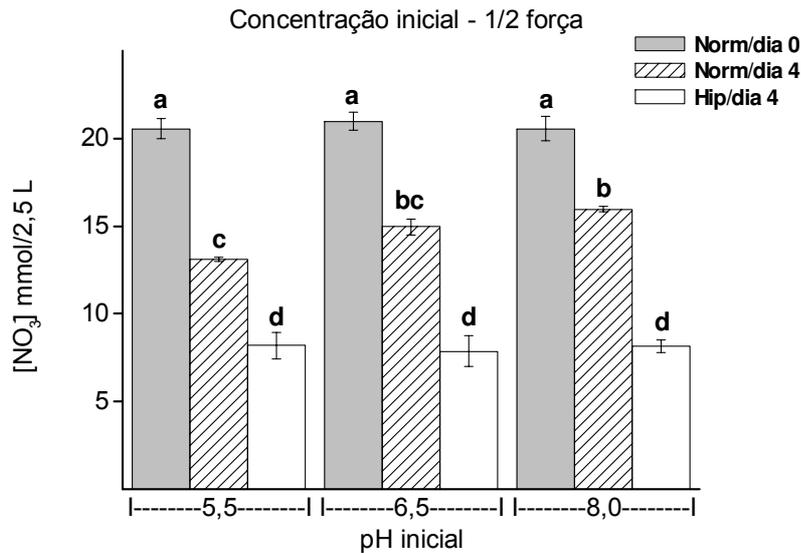
Na concentração inicial com força total ( $\text{NO}_3^- = 15 \text{ mM}$ ), conforme figura 6, verificou-se uma queda maior do nitrato nos vasos dos tratamentos sob hipóxia do que nas normóxicas, o que sugere uma maior absorção do nitrato pelas plantas nessa condição. A utilização do nitrato pelas plantas hipóxicas foi semelhante entre os diferentes pHs. O consumo de nitrato na normóxia foi pequeno (comparando o dia 0 com o dia 4) nos três pHs, no entanto a diferença entre o dia 0 e o dia 4 só não foi significativa no pH 6,5. Quando se compara as

plantas hipóxicas com as normóxicas, houve diferença significativa na absorção no nitrato para os três pHs.



**Figura 6.** Concentração de nitrato do vaso (2,5 L) no dia 0 e após 4 dias de normóxia e hipóxia com concentração inicial de 15 mM (força total) em três pHs iniciais diferentes (5,5, 6,5 e 8,0). Os valores representam a quantidade total de nitrato em 2,5 L de solução no vaso. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

Na figura 7, concentração inicial com  $\frac{1}{2}$ força ( $\text{NO}_3^- = 7,5 \text{ mM}$ ), também foi observado, que a queda na concentração de nitrato no vaso das plantas hipóxicas foi maior do que a das plantas normóxicas. Quando comparado à concentração inicial de 15 mM, (figura 6), esta queda ou utilização do nitrato pela planta, foi semelhante em valor absoluto, tanto nas plantas normóxicas quanto nas hipóxicas. Assim como já observado para a concentração de nitrato com força total, entre os diferentes pHs a utilização do nitrato pelas plantas (tanto nas normóxicas como nas hipóxicas) foi semelhante.

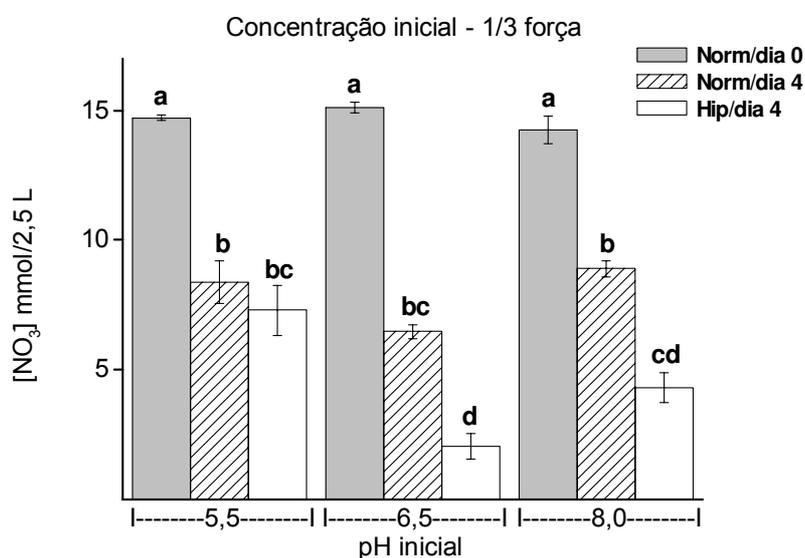


**Figura 7.** Concentração de nitrato do vaso (2,5 L) no dia 0 e após 4 dias de normóxia e hipóxia com concentração inicial de 7,5 mM (1/2 força) em três pHs iniciais diferentes (5,5, 6,5 e 8,0). Os valores representam a quantidade total de nitrato em 2,5 L de solução no vaso. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

Já na concentração inicial com 1/3 de força ( $\text{NO}_3^- = 5 \text{ mM}$ ), foi verificado, conforme figura 8, que a absorção do nitrato pelas plantas normóxicas e hipóxicas aconteceu como nos casos anteriores, exceto no pH 5,5, onde as plantas hipóxicas consumiram uma quantidade de nitrato semelhante as plantas normóxicas do dia 4.

A partir dos dados das figuras 6, 7 e 8 procurou-se estabelecer qual a melhor concentração de nitrato e qual o melhor pH para conduzir os experimentos subsequentes com este sistema experimental. Não foi interessante estabelecer a concentração 1/3 de força para conduzir os futuros experimentos porque sob condição de hipóxia a concentração de nitrato na solução nutritiva atingiu valores bem baixos (2,05 mmol), e caso esse íon se esgotasse, certamente afetaria a resposta das plantas, sem contar que no pH 5,5 dessa mesma concentração, as plantas hipóxicas tiveram consumo semelhante ao das plantas em normóxia.

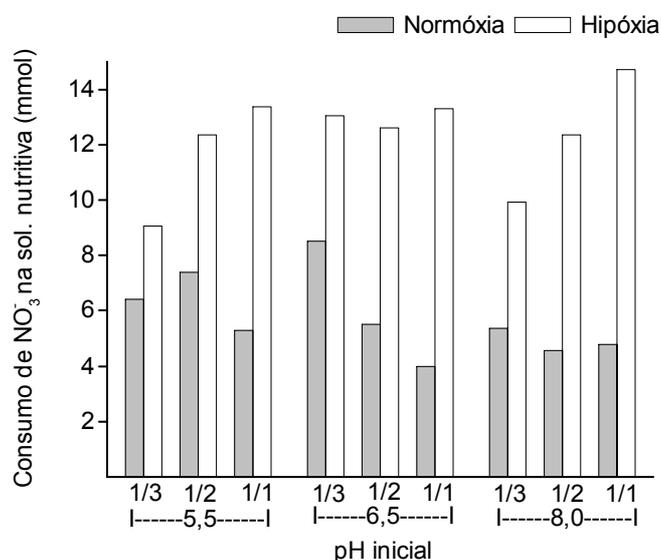
Já, a concentração de força total não apresentou regularidade nas plantas normóxicas quando se comparou os dias 0 e 4, provavelmente em função da utilização do nitrato ter sido pequena em relação à alta concentração inicial de nitrato fornecida, não sendo assim interessante utilizá-la. A concentração de ½ força se apresentou a mais satisfatória, uma vez que não houve risco de esgotamento da fonte de nitrogênio ( $\text{NO}_3^-$ ), e a concentração do nitrato foi suficientemente baixa para permitir a sensibilidade necessária para medir o consumo de nitrato durante o período do experimento.



**Figura 8.** Concentração de nitrato do vaso (2,5 L) no dia 0 e após 4 dias de normóxia e hipóxia com concentração inicial de 5 mM (1/3 de força) em três pHs iniciais diferentes (5,5, 6,5 e 8,0). Os valores representam a quantidade total de nitrato em 2,5 L de solução no vaso. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

A partir dos dados desse experimento percebeu-se que as plantas em normóxia consomem nas condições do experimento, uma quantidade pouco variável de nitrato para realizar suas funções metabólicas, assim como as hipóxicas, embora o consumo nesse estresse

aumente. Constatou-se no entanto, que independentemente da concentração inicial de nitrato (força total, 1/2 ou 1/3 força) da solução nutritiva ou mesmo do pH, a absorção do nitrato pelas plantas foi bem próximo em valores absolutos, conforme figura 9, mostrando assim que esses fatores (concentração e pH da solução) não exerceram grande influência sobre a absorção pelo sistema radicular das plantas (tanto normóxicas quanto hipóxicas).



**Figura 9. Variação no consumo de nitrato do vaso (2,5 L) em plantas normóxicas e hipóxicas, em diferentes concentrações de nitrato (força total, 1/2 força e 1/3 de força) e diferentes pHs (5,5, 6,5 e 8,0) após 4 dias de tratamento. Dados recalculados das figuras 6, 7 e 8.**

### Acúmulo do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pelo sistema radicular

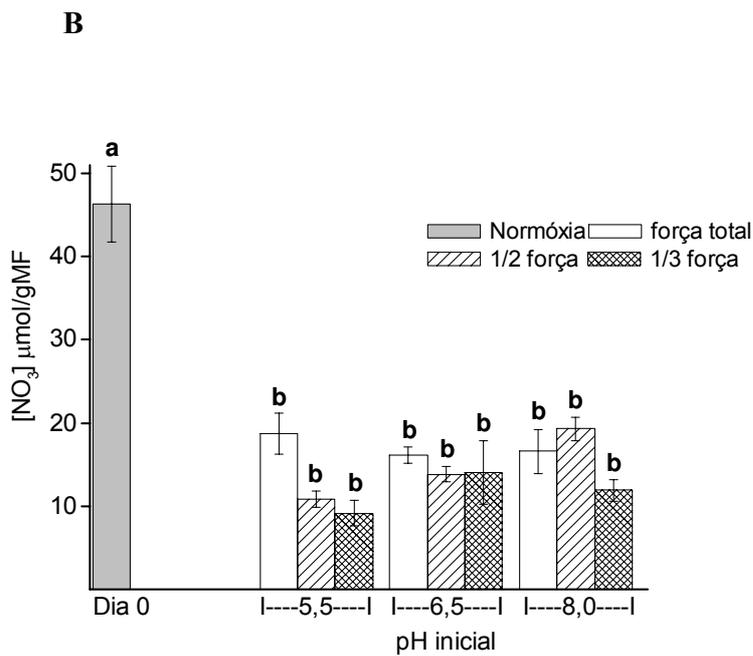
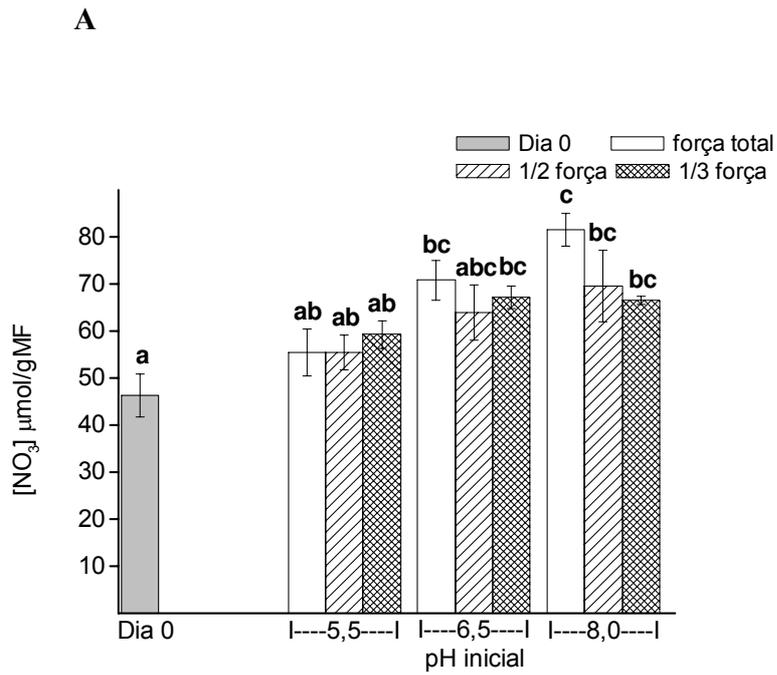
De acordo com a figura 10, observou-se que entre os dias 0 (início do tratamento) e 4 as plantas normóxicas (A) acumularam, aparentemente, um pouco mais de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> do vaso, reservando-o em seu sistema radicular. Em valores absolutos, constatou-se que quanto maior foi o pH da solução maior a concentração do nitrato acumulada na raiz. Tanto as diferentes

concentrações externas (força total,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{3}$ ) quanto os diferentes pHs (5,5, 6,5 e 8,0) do meio não influenciaram significativamente nos teores de nitrato, exceto no tratamento força total pH 8,0 em relação a todas as amostras do pH 5,5. Apesar de não significativo, parece haver uma tendência geral para um maior acúmulo com a elevação do pH.

Quanto às plantas hipóxicas (B), observou-se que não houve acúmulo do nitrato (figura 10). Pelo contrário, do nitrato encontrado nas raízes no início do tratamento foi consumido quase 70% ao longo dos 4 dias de tratamento. Independente das diferentes concentrações de nitrato combinadas com diferentes pHs, o consumo do nitrato armazenado na raiz durante os 4 dias de hipóxia foi o mesmo para todos os tratamentos.

#### **Acúmulo de $\text{NO}_2^-$ pelo sistema radicular**

Os valores de nitrito encontrados no sistema radicular variaram entre 0,001 e 0,010  $\mu\text{mol/mL}$ . Por serem valores pouco expressivos e no limite de detecção, foram desconsiderados. Esse resultado se repetiu em todos os experimentos, comprovando assim que nitrito não é acumulado nos tecidos da raiz.



**Figura 10. Concentração de nitrato no sistema radicular de plantas cultivadas em sistema hidropônico em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) no dia 0 e após 4 dias de tratamento em diferentes pH iniciais (5,5, 6,5 e 8,0) e concentrações de nitrato da solução nutritiva (força total, 1/2 força e 1/3 força). A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).**

### **Transporte de nitrato pela seiva do xilema**

De acordo com a figura 11, observa-se que entre o dia 0 (início do tratamento) e o dia 4, as plantas em normóxia (A) na concentração força total, apresentaram um aumento significativo na concentração de nitrato da seiva do xilema no pH 8,0. Exceto na concentração  $\frac{1}{3}$  de força, pH 5,5, viu-se que em valores absolutos, quanto maior o pH e a concentração de nitrato maior o teor de nitrato presente na seiva do xilema.

Quanto às plantas hipóxicas (B), observou-se que o nitrato presente na seiva do xilema diminuiu em relação às plantas normóxicas do dia 0 de forma significativa em todos os tratamentos. Também pôde ser visto que, ocorreu uma forte tendência para uma maior concentração de nitrato na seiva do xilema quanto maior foi a concentração de nitrato disponível na solução nutritiva, essa tendência se repetiu nos diferentes pHs. Quando comparamos os diferentes pHs (5,5, 6,5 e 8,0), vimos que, em geral, em valores absolutos, quanto maior o pH, menor foi o teor de nitrato encontrado na seiva do xilema (embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas).

### **Transporte de $\text{NO}_2^-$ pela seiva do xilema**

Não foi encontrado nitrito na seiva do xilema, um fato que se repetiu em todos os experimentos.

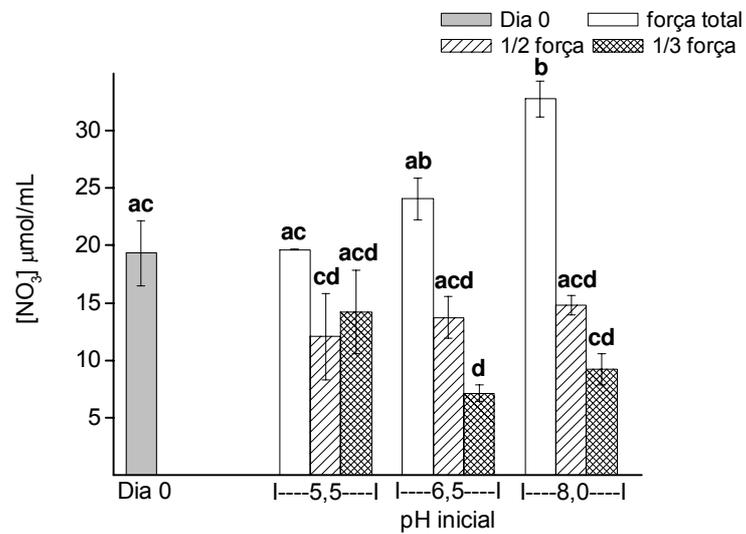
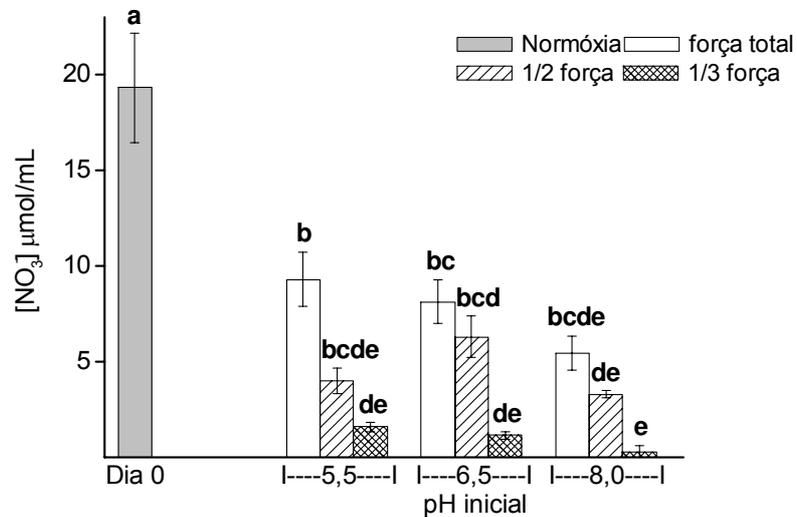
**A****B**

Figura 11. Concentração de nitrato na seiva do xilema de plantas cultivadas em sistema hidropônico em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) no dia 0 e após 4 dias de tratamento em diferentes pH iniciais (5,5, 6,5 e 8,0) e concentrações de nitrato da solução nutritiva (força total, 1/2 força e 1/3 força). A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

### **Aminoácidos livres na seiva do xilema**

Pela tabela 1, podemos observar a composição de aminoácidos livres na seiva do xilema das plantas de soja submetidas a diferentes concentrações de nitrato e pHs da solução nutritiva, em condições de normóxia e hipóxia. De forma geral, foi possível observar que Asn é o principal aminoácido presente na seiva do xilema em condições de normóxia (> 60%), enquanto que a composição de Ala fica em média menor que 2%. Quando comparamos as plantas normóxicas com as plantas estressadas, observamos que Asp diminui na maioria dos tratamentos enquanto Asn tem uma acentuada redução em sua proporção em todos os tratamentos. Glut (Glu) tem um discreto aumento, enquanto Ser, Gln, Ala e Gaba aumentam de forma expressiva em hipóxia. A Ala foi o aminoácido que mais se destacou em relação as plantas normóxicas sob essa condição (hipóxia), de valores menores que 2% ultrapassou os 30%.

Nas plantas normóxicas (mesmo quando comparadas os dias 0 e 4 de tratamento) e plantas hipóxicas observou-se que nos diferentes pHs e concentrações de nitrato, a composição dos aminoácidos varia pouco. No caso das plantas em normóxia, pôde-se ver no entanto, que nas três concentrações ( $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$  e força total) o pH 5,5 apresentou ligeira variação em sua composição em relação aos demais pHs, quando analisamos a concentração de nitrato da solução, observamos que em  $\frac{1}{2}$  força houve uma tendência de variação nessa composição, no entanto não é possível afirmar que o pH e/ou concentração de nitrato influenciam nessa composição. Já, em condições de hipóxia, não foi percebida tendência na variação da composição dos aminoácidos em relação aos diferentes pHs iniciais e concentrações de nitrato, as oscilações observadas, parecem ocorrer em função das próprias plantas.

**Tabela 1. Composição (mol%) de aminoácidos livres (AA) na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia (A) (dias 0 e 4) e hipóxia (B) após 4 dias em diferentes pH e concentração de nitrato da solução nutritiva do vaso.**

A	NORMÓXIA (%) de aminoácidos									
	Dia 0	1/3 força (dia 4)			1/2 força (dia 4)			força total (dia 4)		
		pH			pH			pH		
Aminoácido		5,5	6,5	8,0	5,5	6,5	8,0	5,5	6,5	8,0
<b>Asp</b>	1,54	1,26	1,61	1,77	1,82	0,96	2,96	1,87	1,84	2,13
<b>Glu</b>	0,38	0,61	0,63	0,42	0,94	0,39	0,84	1,26	0,66	0,64
<b>Asn</b>	69,28	67,39	64,69	66,98	45,43	70,07	61,13	61,32	66,37	70,42
<b>Ser</b>	0,63	0,53	0,44	0,43	3,5	0,40	2,22	1,04	0,45	0,56
<b>Gln</b>	6,99	4,22	2,76	2,68	2,88	3,31	2,68	3,80	2,31	3,46
<b>Ala</b>	0,29	0,43	0,35	0,27	8,30	0,39	2,85	0,92	0,50	0,48
<b>Gaba</b>	1,62	1,92	1,78	1,86	5,35	1,21	1,97	4,21	2,24	2,11
Outros*	19,27	23,64	27,74	25,59	31,78	23,27	25,35	25,58	25,63	20,20

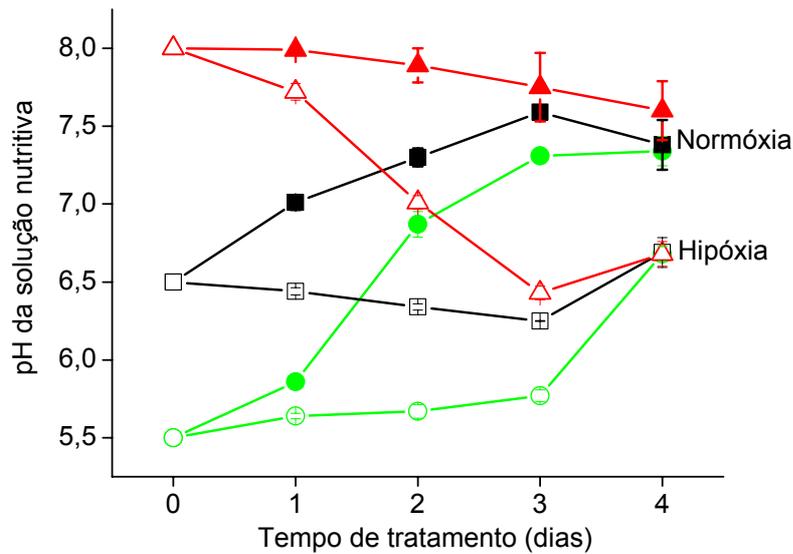
  

B	HIPÓXIA (%) de aminoácidos									
	Aminoácido	1/3 força			1/2 força			força total		
		pH			pH			pH		
	5,5	6,5	8,0	5,5	6,5	8,0	5,5	6,5	8,0	
<b>Asp</b>	0,47	0,50	0,67	0,21	0,82	1,76	2,27	2,53	0,42	
<b>Glu</b>	2,30	1,27	0,70	0,66	1,21	1,39	1,31	1,99	0,76	
<b>Asn</b>	10,69	20,22	28,10	23,03	28,28	26,40	26,20	32,84	21,25	
<b>Ser</b>	10,03	5,85	9,02	7,48	7,90	9,61	11,20	8,11	8,38	
<b>Gln</b>	9,72	14,95	7,60	12,73	8,72	2,12	3,67	10,47	10,27	
<b>Ala</b>	38,59	31,81	41,28	40,05	38,55	47,06	35,34	23,31	44,55	
<b>Gaba</b>	10,65	5,32	3,74	4,56	5,11	1,96	4,37	5,00	4,77	
Outros*	17,55	13,58	8,89	11,28	9,41	9,7	15,94	15,75	9,6	

\*soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu

#### **4.1.2 Experimento II – Variação do pH da solução nutritiva sob condições de normóxia e hipóxia em diferentes pHs iniciais**

No experimento anterior foi verificado o pH da solução nutritiva no fim do período de 4 dias e observou-se que ocorreu variação ao longo desse período tanto nas plantas normóxicas quanto nas hipóxicas. Por este motivo o presente experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar a influência do pH na utilização do nitrato da solução pelas plantas e assim definir qual pH (5,5, 6,5 ou 8,0) seria mais adequado para condução dos experimentos posteriores. Na figura 12, observa-se que nas plantas normóxicas, o pH tendeu a estabilizar ao final dos 4 dias entre 7,2 e 7,6 independentemente do pH inicial, enquanto que nas plantas hipóxicas, ele estabilizou em torno de 6,6. Os dados apresentados se referem apenas a concentração de  $\frac{1}{2}$  de força, por que esta foi estabelecida como padrão para todos os experimentos de acordo com os dados anteriormente mencionados. De qualquer forma, testes preliminares permitiram a constatação de que a concentração de nitrato da solução nutritiva não interferiu na estabilidade do pH, uma vez que essa tendência se repetiu nas três concentrações (dados não apresentados). A partir desses dados, foi determinado o pH 6,5 para condução dos experimentos posteriores, por dois motivos; primeiro: em condições de hipóxia, o pH 6,5 permanece inalterado e portanto dispensa de um ajuste diário, um procedimento tecnicamente muito difícil em função da superfície coberta com óleo mineral; segundo: elimina-se a possibilidade de que a resposta fisiológica esteja sendo influenciado por qualquer variação nesse pH.



**Figura 12.** Variação do pH na solução nutritiva durante 4 dias de normóxia e hipóxia em sistema de cultivo de plantas cultivadas em hidroponia com diferentes pHs iniciais. Ensaio realizado com solução nutritiva de ½ força ( $\text{NO}_3^- = 7,5 \text{ mM}$ ) com pHs iniciais de 5,5, 6,5 e 8,0. A hipóxia foi induzida pela suspensão da aeração da solução e a cobertura da superfície com nujol.

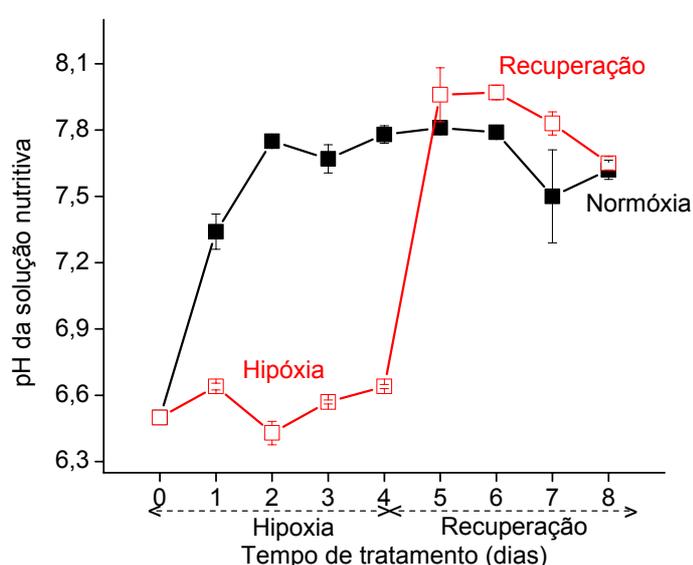
#### 4.1.3 Experimento III – Utilização do nitrato pelo sistema radicular da soja durante a hipóxia e o retorno à normóxia.

Neste experimento foi idealizado um estudo mais detalhado, incluindo a recuperação da hipóxia. Para este experimento foi utilizada uma única concentração de nitrato estabelecida em ½ força, assim como um único pH de 6,5 conforme estabelecido nos experimentos anteriores.

#### Acompanhamento do pH

Já conhecida a variação do pH até 4 dias de tratamento em concentração de nitrato de ½ de força (dados já citados), neste estudo foram acompanhados suas variações ao longo da recuperação da hipóxia por mais 4 dias. Observou-se conforme figura 13, que a partir do

momento em que as plantas foram sujeitas à condição normal (foi retirada a camada de óleo mineral e restabelecida aeração ou borbulhamento com ar), o pH teve um aumento brusco de 6,6 para 8,0, no 5º dia (ou seja, no 1º dia do retorno à normóxia), e depois se manteve estável, atingindo valores próximos aos das plantas normóxicas. Estatisticamente, não houve diferença entre o pH do meio para as plantas que foram recuperadas e as que foram mantidas sob aeração constante (normóxicas) até o final do tratamento.



**Figura 13. Variação do pH no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de hipóxia (4 dias), normóxia (8 dias) e recuperação da hipóxia (4 dias). Solução nutritiva usada com ½ força e pH inicial 6,5.**

### **Consumo de $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva**

Além do pH, foi também acompanhada a absorção do nitrato da solução nutritiva do vaso por 4 dias (período do experimento), coletando-se diariamente durante esse tempo alíquotas da solução para as dosagens. Conforme já constatado anteriormente, o consumo do nitrato pelas plantas hipóxicas foi maior que nas normóxicas após 4 dias do tratamento. Aqui,

os dados permitiram uma avaliação diária do consumo do nitrato e revelaram um consumo mais acentuado entre os dias 3 e 4 após iniciada a hipóxia, uma diferença significativa (figura 14 A).

O experimento realizado envolvendo a recuperação das plantas hipóxicas foi feito em período diferente em relação ao que acompanhou a hipóxia e as plantas normóxicas por 4 dias. Isto explica diferenças em alguns valores absolutos. Em função de já existirem os dados de consumo de nitrato até o 4º dia de tratamento (figura 14 A), não foi necessário acompanhar o consumo diário nesse período. Constatando-se apenas as concentrações nos dias 0 e 4 e a partir daí (período de recuperação), as análises foram feitas diariamente até o 8º dia. Também foi observado o consumo em plantas normóxicas com pH mantido em 6,5 com ajustes diários de pH, ou seja, mantendo-se o mesmo pH (6,5) ao qual as plantas hipóxicas foram submetidas. Para fins de comparação, outro controle foi realizado, porém este não teve seu pH ajustado durante o período do experimento, como nos experimentos anteriores. Desta forma, foi possível verificar ao final dos 4 dias que não houve diferença na utilização do nitrato com a variação do pH (figura 14 B). No final dos 8 dias, observou-se que o consumo nessas plantas em normóxia mantidas com pH 6,5 constante, foi até menor em relação às que obtiveram sua variação normal (onde, ocorre um aumento no pH, atingindo valores ao redor de 7,6 – fig. 13). Também pode ser observado na figura 14 B, que no período de hipóxia, conforme já constatado anteriormente, o consumo de nitrato foi maior que nas plantas normóxicas, e que durante a recuperação o consumo desse composto ocorreu de forma menos acentuada, sendo numa taxa semelhante às plantas normóxicas que não tiveram seus pHs controlados.

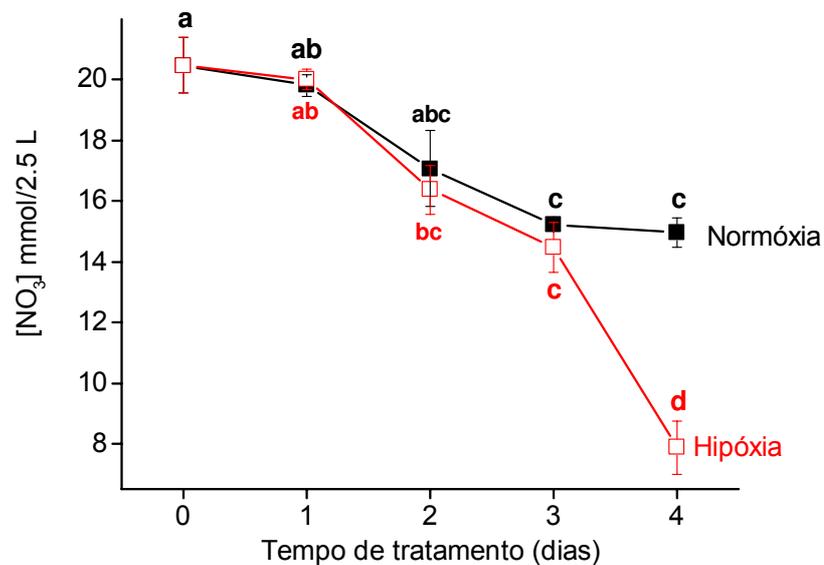


Figura 14 A. Consumo de nitrato no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia e hipóxia ao longo de 4 dias de tratamento.

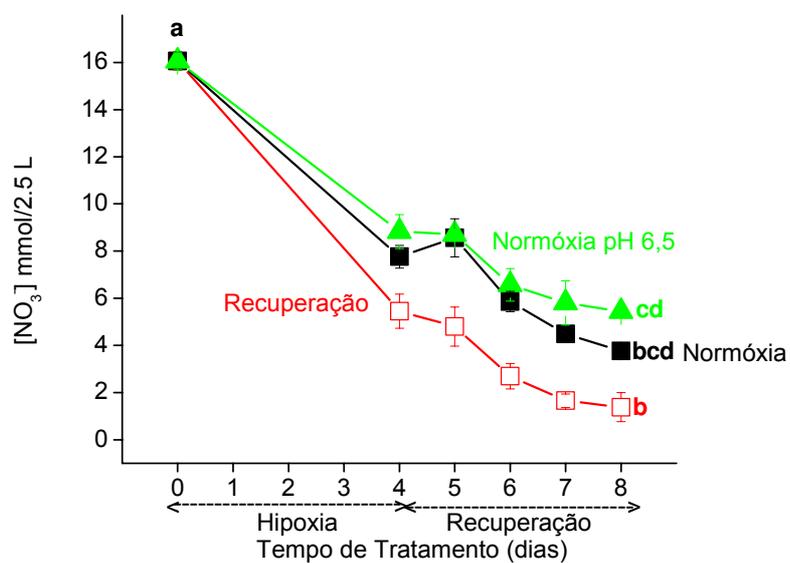


Figura 14 B. Consumo de nitrato no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia e hipóxia e recuperação da hipóxia. Solução nutritiva usada com ½ força e pH inicial 6,5. Na normóxia “pH 6,5” o pH foi ajustado diariamente. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

### **Concentração de $\text{NO}_2^-$ na solução nutritiva**

Ao mesmo tempo em que foi acompanhado o consumo de nitrato (dados da figura 14 A, B) avaliou-se o acúmulo de nitrito na solução nutritiva do vaso e, como explicado anteriormente, os experimentos que acompanharam hipóxia e normóxia por 4 dias e o de recuperação foram feitos em períodos diferentes. Percebe-se na figura 15 A que só houve produção de nitrito em plantas sujeitas a hipóxia e que isso somente ocorre de forma significativa a partir do 3<sup>o</sup> dia de tratamento. Observou-se no entanto, que após o retorno à normóxia (figura 15 B) esse nitrito é utilizado gradativamente de forma que ao longo dos 4 dias após o retorno à normóxia essa concentração chega a menos que  $\frac{1}{3}$  da concentração inicial, mostrando assim que o acúmulo de nitrito é sem dúvida associado às condições de hipóxia nessas plantas.

### **Teores do $\text{NO}_3^-$ no sistema radicular**

Os dados da variação dos teores de nitrato nas raízes de soja durante os tratamentos de normóxia, hipóxia, e recuperação da hipóxia, estão apresentados na figura 16. Nas plantas normóxicas não houve variação significativa no teor de nitrato entre os dias 0 e 8, independente do ajuste diário do pH da solução ao longo dos 8 dias tratamento, quando o mesmo ocorreu. O que mostra, nesse caso, que o pH externo (solução nutritiva), não afetou a concentração do nitrato presente no sistema radicular dessas plantas. No caso das plantas submetidas a hipóxia e das que retornaram a normóxia, observou-se que ocorre utilização do nitrato endógeno inicialmente acumulado no sistema (sendo consumido quase 65%). Durante a recuperação (retorno à normóxia) o teor de nitrato endógeno permaneceu baixo e não recuperou o teor das condições das plantas normóxicas.

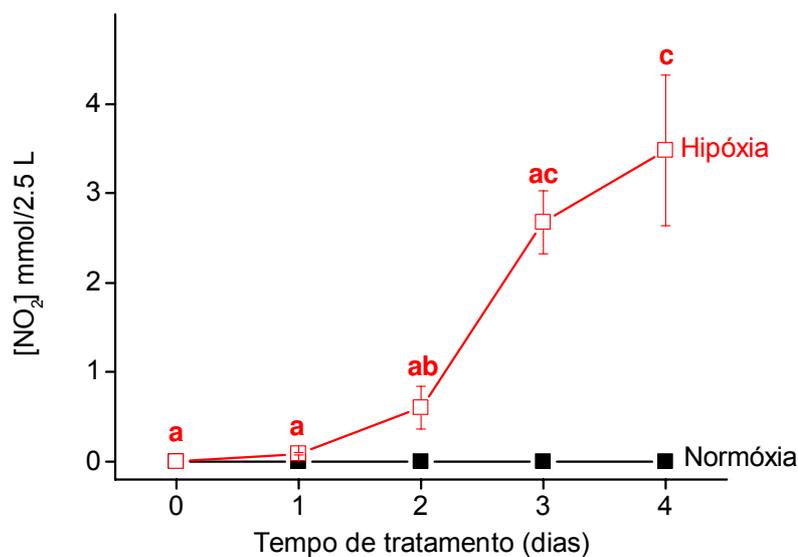


Figura 15 A. Concentração de nitrito no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia e hipóxia ao longo de 4 dias de tratamento.

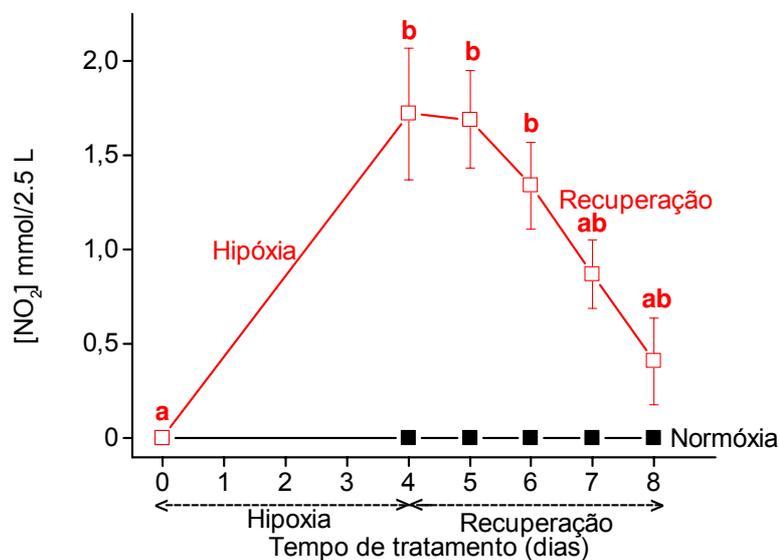
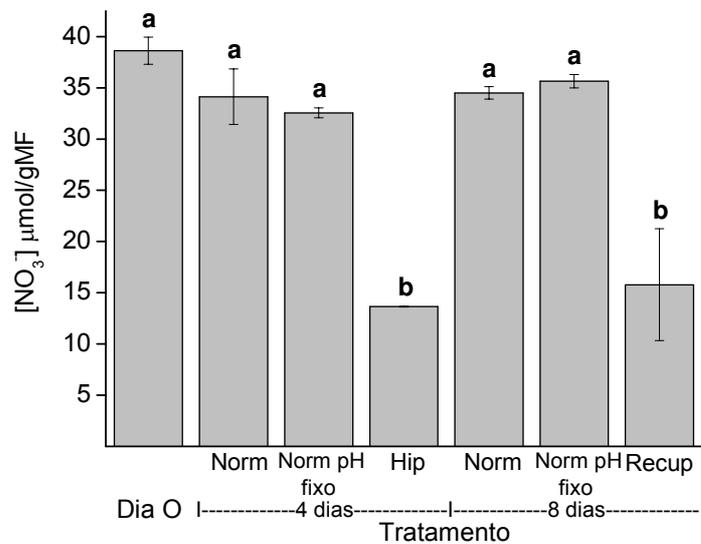


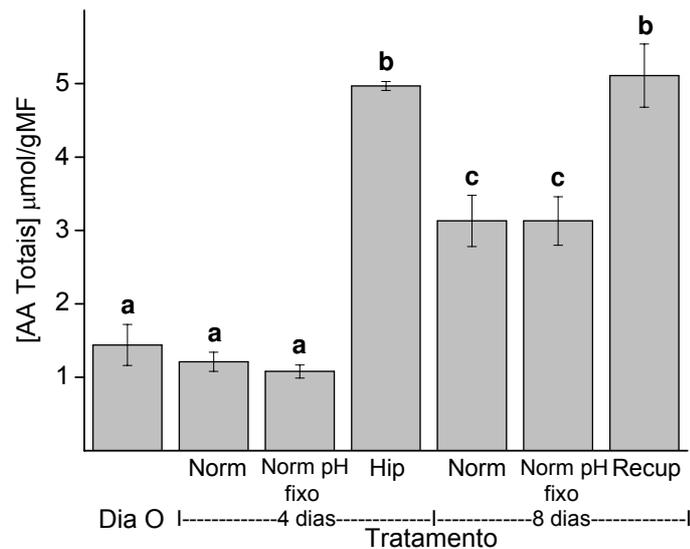
Figura 15 B. Concentração de nitrito no meio durante o cultivo de plantas em sistema hidropônico em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Solução nutritiva usada com  $\frac{1}{2}$  força e pH inicial 6,5. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).



**Figura 16.** Teores de nitrato no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento. Solução nutritiva usada com ½ força e pH inicial 6,5. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Norm = normóxia, Norm pH fixo = normóxia pH constante em 6,5; Hip = hipóxia; Recup = recuperação.

### Teores de aminoácidos livres totais no sistema radicular

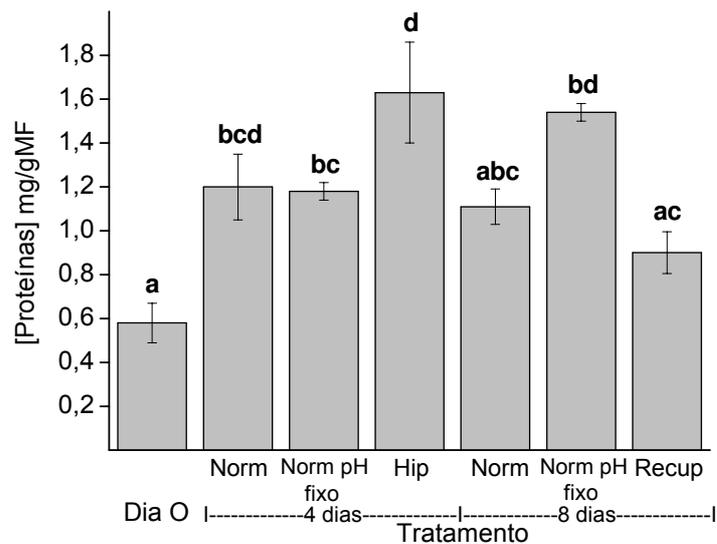
De acordo com a figura 17, nota-se que ao longo dos 8 dias de tratamento, houve aumento significativo na concentração de aminoácidos livres totais nas plantas controle. No entanto, o fator pH não interferiu nesse teor, já que a manutenção diária ou não do pH em 6,5 não resultou em diferença significativa. Nas plantas submetidas à hipóxia ocorreu um aumento na concentração dos aminoácidos ainda mais expressivo, fato significativo. Não houve, entretanto, recuperação do teor de aminoácidos para valores próximos ao das plantas normóxicas após retorno à normóxia.



**Figura 17. Teores de aminoácidos livres totais no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento em pH inicial 6,5 e concentração de nitrato da solução nutritiva ½ força. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Norm = normóxia, Norm pH fixo = normóxia pH constante em 6,5; Hip = hipóxia; Recup = recuperação.**

### **Teores de proteína no sistema radicular**

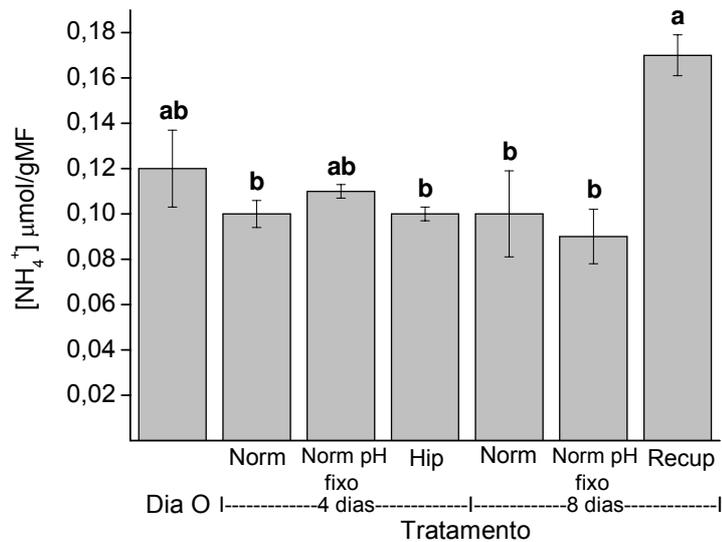
De acordo com a figura 18 nota-se que o teor de proteínas no sistema radicular aumenta significativamente após os 4 primeiros dias de tratamento, tanto em normóxia como durante a hipóxia. Sob condições de hipóxia, o aumento foi ainda mais expressivo. Não ficou claro uma interferência direta do pH nesses teores, já que as plantas normóxicas no 4º dia de tratamento, que tiveram seus pHs mantidos constantes em 6,5 (mesmo das hipóxicas), mostram teores significativamente diferentes das plantas hipóxicas. Já na recuperação, a concentração de proteínas caiu para valor próximo aos das plantas normóxicas (exceto normóxia do dia 8 com pH constante).



**Figura 18.** Teores de proteínas no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento em pH inicial 6,5 e concentração de nitrato da solução nutritiva ½ força. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Norm = normóxia, Norm pH fixo = normóxia pH constante em 6,5; Hip = hipóxia; Recup = recuperação.

### Teores de amônia no sistema radicular

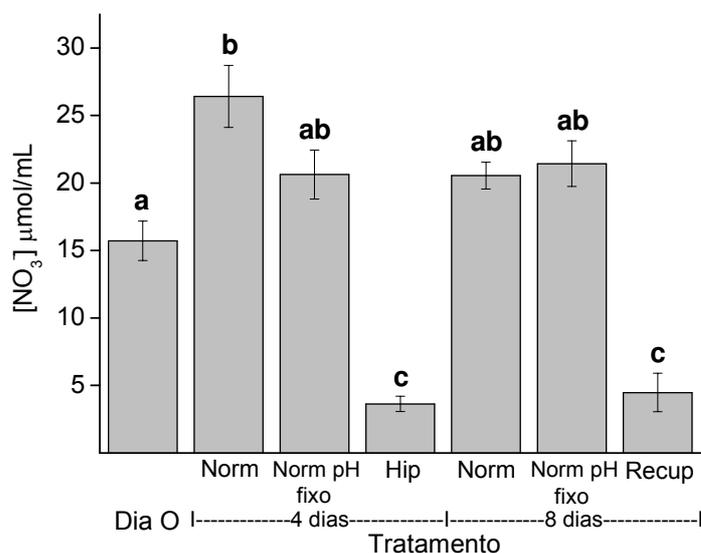
De acordo com a figura 19, os teores de amônia, produto da redução completa do nitrato, presente no sistema radicular da soja não variaram significativamente entre os diferentes tratamentos.



**Figura 19. Teores de amônia no sistema radicular de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento em pH inicial 6,5 e concentração de nitrato da solução nutritiva ½ força. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Norm = normóxia, Norm pH fixo = normóxia pH constante em 6,5; Hip = hipóxia; Recup = recuperação.**

#### **Teores de nitrato na seiva do xilema.**

De acordo com a figura 20, observou-se que o transporte de nitrato pela seiva do xilema é relativamente alto no início do experimento. Após o tratamento com hipóxia diminui drasticamente o teor de nitrato encontrado na seiva do xilema enquanto que no mesmo período sob normóxia o teor permanece alto, tanto para as plantas normóxicas cujo pH foi mantido em 6,5 como nas normóxicas sem manutenção do pH inicial de 6,5. Não houve sinal de recuperação no transporte do nitrato após o sistema radicular retornar à normóxia, talvez em função da baixa concentração de nitrato existente no meio após a hipóxia e recuperação (fig 14B).

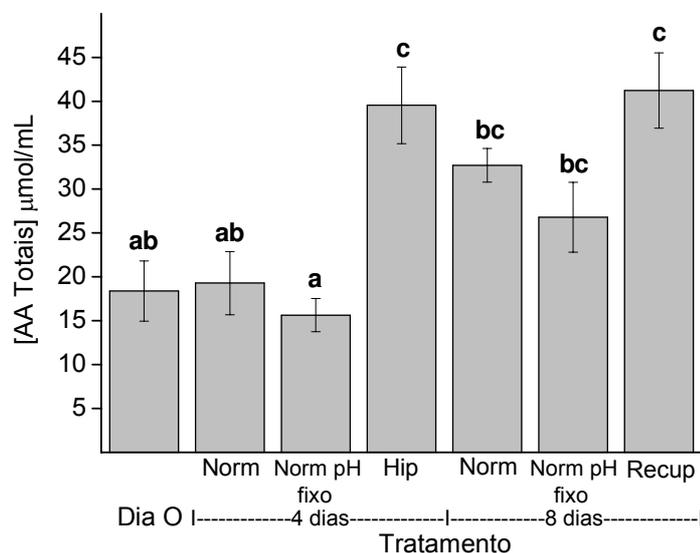


**Figura 20.** Teores de nitrato na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento em pH inicial 6,5 e concentração de nitrato da solução nutritiva ½ força. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Norm = normóxia, Norm pH fixo = normóxia pH constante em 6,5; Hip = hipóxia; Recup = recuperação.

### Teores de aminoácidos livres totais na seiva xilema

De acordo com a figura 21, o transporte de aminoácidos livres totais pela seiva do xilema aumentou nas plantas submetidas ao estresse de hipóxia, de forma significativa, quando comparados às plantas normóxicas no início de tratamento. Durante a recuperação os valores encontrados não mudaram em relação às plantas submetidas à hipóxia, porém é difícil concluir se houve ou não a recuperação dos valores encontrados em normóxia em função do aumento ocorrido nas plantas em normóxia entre os dias 4 e 8. Este aumento dos aminoácidos livres totais ao longo dos 8 dias de tratamento também foi visto nas raízes, mas de qualquer forma quando são comparados os valores das plantas hipóxicas (4 dias) com os das

normóxicas da mesma idade, as plantas hipóxicas, chegam a ter quase 3 vezes mais aminoácidos em sua seiva do que as plantas em normóxia.



**Figura 21.** Teores de aminoácidos livres totais na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia, hipóxia e recuperação em 4 e 8 dias de tratamento em pH inicial 6,5 e concentração de nitrato da solução nutritiva ½ força. A análise estatística foi feita de forma global. Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ). Norm = normóxia, Norm pH fixo = normóxia pH constante em 6,5; Hip = hipóxia; Recup = recuperação.

### Composição dos aminoácidos livres no xilema

De acordo com a tabela 2, pudemos ver que ocorreu a mesma tendência nas proporções dos aminoácidos, conforme visto na tabela 1, ou seja, em condições de normóxia, encontramos a Asn como principal aminoácido e o teor de Ala menor que 4 %. Já em hipóxia, esses valores são drasticamente alterados, para aproximadamente 25 e 45 %, respectivamente. É possível afirmar que no primeiro dia de recuperação da hipóxia, os aminoácidos voltaram às proporções das plantas normóxicas.

**Tabela 2. Composição (mol%) entre aminoácidos livres (AA) na seiva do xilema de plantas em condições de normóxia (dias 0, 4 e 8), hipóxia (após 4 dias) e recuperação (durante 4 dias) em pH inicial 6,5 e concentração de nitrato da solução nutritiva ½ força.**

(%) de aminoácidos										
Tempo de Tratamento (dias)	Normóxia					Hipóxia	Recuperação			
	0	4	4	8	8	4	1	2	3	4
	pH fixo			pH fixo						
Asp	0,93	1,05	0,84	1,65	1,11	1,31	1,35	1,11	1,85	3,29
Glu	0,48	0,58	0,66	0,29	0,25	1,06	0,39	0,44	1,23	4,02
Asn	62,53	69,64	66,25	74,74	74,22	24,59	72,77	71,28	66,05	62,94
Ser	5,64	0,85	1,61	2,98	1,26	10,35	3,26	3,70	2,90	5,27
Gln	2,69	5,81	5,42	2,71	3,22	1,77	3,50	4,37	5,43	4,07
Ala	3,43	0,42	0,93	1,20	0,41	44,57	3,46	4,46	5,19	6,75
Gaba	6,00	2,22	2,99	1,21	0,76	6,42	1,36	1,76	4,33	1,35
Outros*	18,3	19,43	21,30	15,22	18,77	9,93	13,91	12,88	13,02	12,31

\* soma dos aminoácidos: His, Gly, Thr, Arg, Tyr, Met, Val, Phe, Ile, Leu

#### **4.1.4 Experimento IV - Estudo dos compostos nitrogenados e da utilização do nitrato na presença de cloranfenicol**

Esse experimento teve o intuito de averiguar se a maior utilização de nitrato na solução nutritiva dentro do sistema hidropônico nos tratamentos de hipóxia (itens 4.1.1 e 4.1.3) foi devido a ação de bactérias. Para inibir o crescimento de bactérias no meio foi utilizado o CAP (cloranfenicol), antibiótico específico para os ribossomos 70S dos procaríotos. A concentração usada, de 50  $\mu\text{M}$ , foi alta o suficiente para agir sobre os microorganismos, mas está abaixo da concentração (ca. 300  $\mu\text{M}$ ) prejudicial à planta (Stoner *et al*, 1964; Ellis, 1969).

#### **Variação do pH**

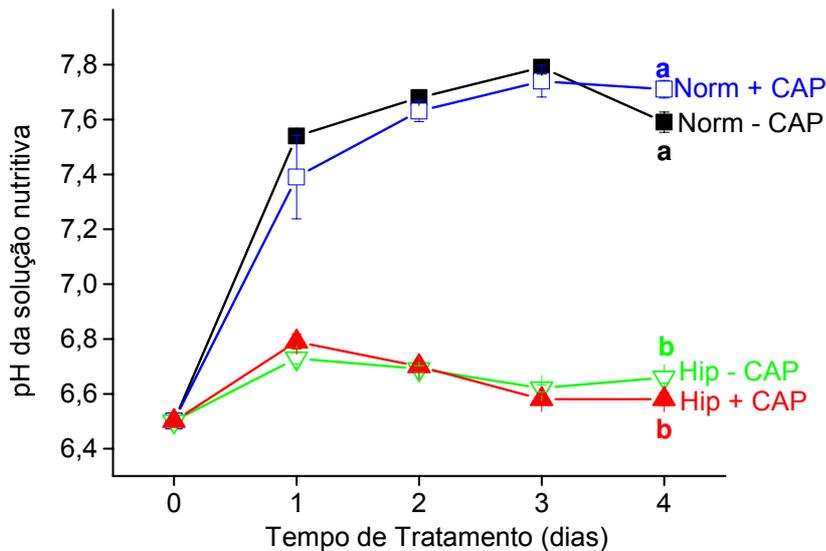
A presença de cloranfenicol não interferiu na variação do pH da solução nutritiva. O pH aumentou nas plantas em normóxia (quando o mesmo é iniciado em 6,5) e se manteve estável nas hipóxicas tanto na presença como na ausência do antibiótico, figura 22.

#### **Consumo de $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva**

De acordo com os itens 4.1.1 e 4.1.3, o consumo de nitrato na solução nutritiva foi sempre maior em plantas submetidas a hipóxia em relação a queda observada em normóxia. Quando foi acrescentado CAP na solução nutritiva, após 4 dias de tratamento constatou-se que o consumo de nitrato nas plantas hipóxicas foi reduzido para valor semelhante ao das plantas normóxicas com e sem adição de CAP à sua solução (figura 23).

Comparando as plantas normóxicas (com e sem adição de cloranfenicol) durante o período do experimento, elas apresentaram um consumo semelhante. Nesse caso, podemos então afirmar que a atividade bacteriana não foi responsável pelo consumo de nitrato da solução nutritiva do vaso em condições de normóxia. Já, em hipóxia, o efeito do antibiótico é

uma forte evidência de que bactérias foram responsáveis pelo consumo adicional de nitrato. Descontado o consumo de nitrato sensível ao antibiótico, aparentemente a utilização do nitrato pela planta foi semelhante entre normóxia e hipóxia.

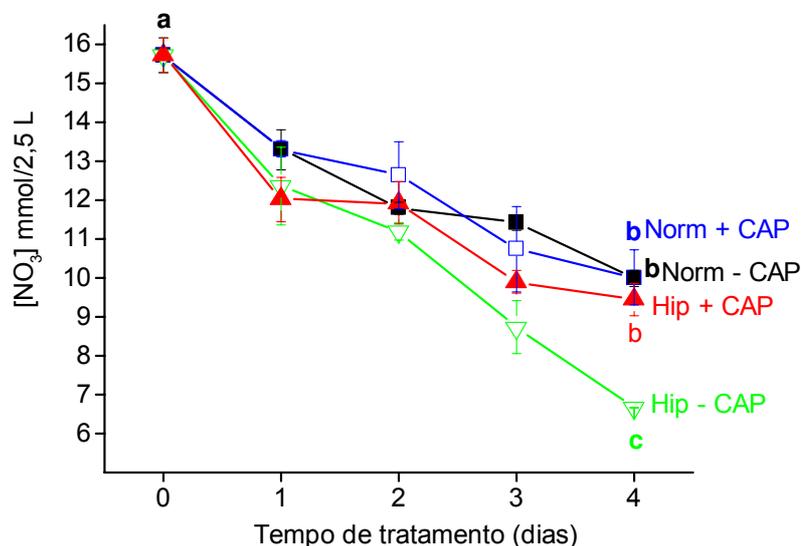


**Figura 22.** Variação do pH do meio com solução nutritiva ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50 µM) ao longo de 4 dias de tratamento. A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P ≤ 5%).

### Concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> na solução nutritiva

De acordo com a figura 24 podemos ver que na presença de antibiótico, o acúmulo de nitrito na solução nutritiva durante a hipóxia foi bastante reduzida, embora não eliminado. Como visto anteriormente (figura 15), em condições de normóxia não há acúmulo ou produção de nitrito na solução. A quantidade de nitrito acumulada sensível ao antibiótico (em torno de 3 mmol) é compatível com o consumo de nitrato atribuído às bactérias (figura 23).

Podemos concluir nesse caso, que pelo menos parte do nitrito acumulado na solução foi produzida por bactérias.

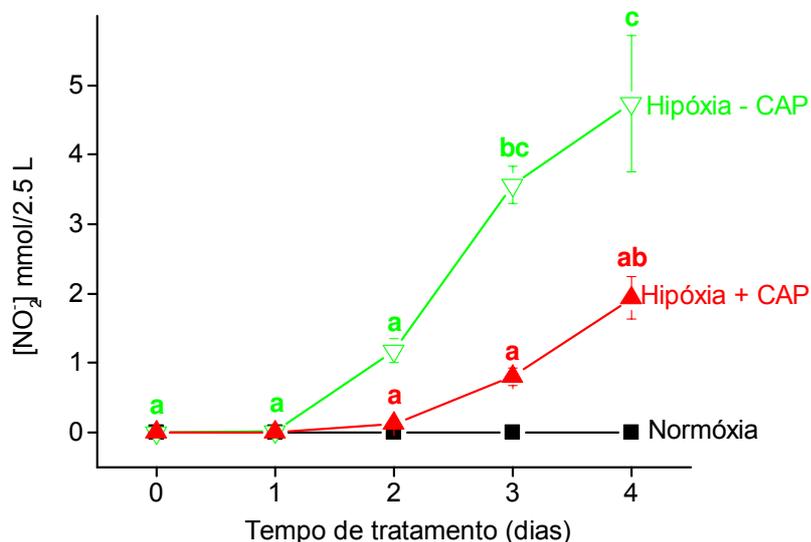


**Figura 23. Consumo de nitrato da solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50 µM) ao longo de 4 dias de tratamento. A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).**

#### Teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no sistema radicular

De acordo com a figura 25, os teores de nitrato nas raízes aumentaram significativamente nas plantas normóxicas após os 4 dias do experimento, tanto na presença quanto na ausência de CAP, o que demonstra um acúmulo de nitrato nesse sistema, provavelmente decorrente da absorção do nitrato do meio. Na presença do antibiótico (CAP) o aumento foi ainda maior. Por outro lado, nas plantas submetidas a hipóxia, o nitrato inicialmente acumulado (endógeno) foi utilizado independentemente do tratamento (com ou sem antibiótico) em mais de 30%, o que mostra nesse caso que, sob essa condição, o antibiótico não influenciou a queda no teor endógeno de nitrato, o que sugere que o consumo

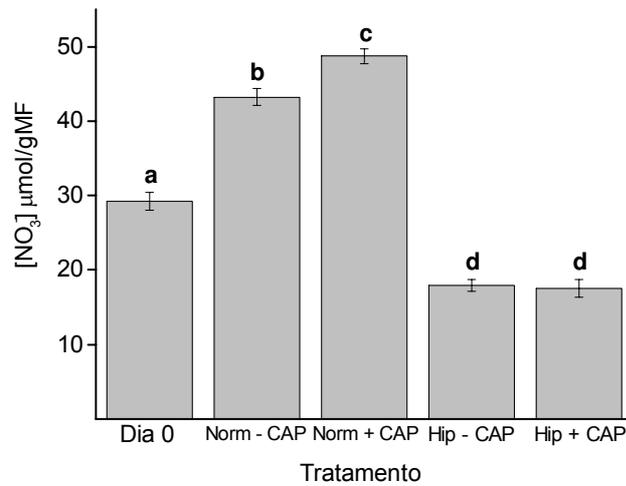
adicional de nitrato da solução (sensível ao antibiótico) não teve reflexos no metabolismo deste nutriente dentro da raiz.



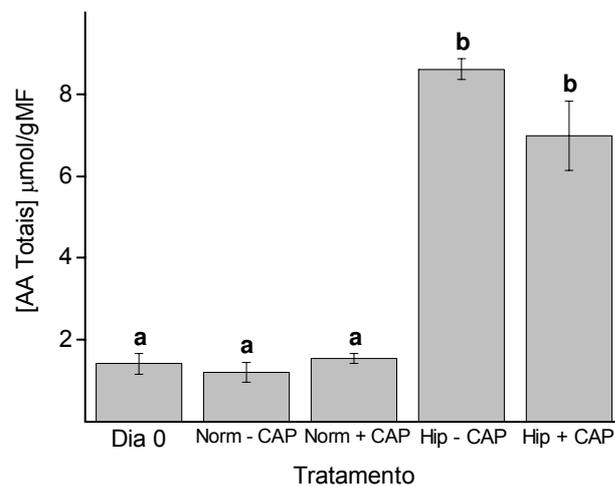
**Figura 24.** Concentração de nitrito na solução nutritiva com  $\frac{1}{2}$  de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol ( $50 \mu\text{M}$ ) ao longo de 4 dias de tratamento. A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

### Teores de Aminoácidos livres totais no sistema radicular

O teor de aminoácidos livres totais nas raízes foi o mesmo quando se comparou as plantas normóxicas do dia 0 e 4 independentemente da presença ou não de CAP (figura 26). Sob hipóxia esse aumento foi bastante expressivo, assim como o que foi visto na figura 17. Não houve, no entanto influência de CAP nesses resultados.



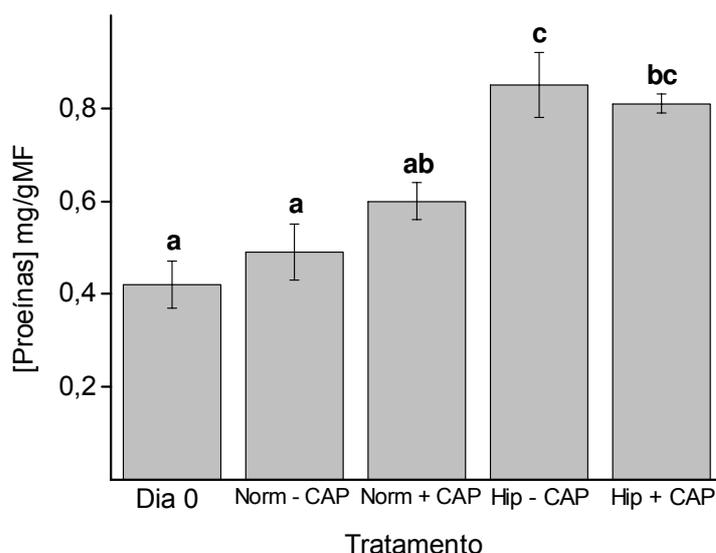
**Figura 25.** Teores de nitrato no sistema radicular de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50 μM) ao longo de 4 dias de tratamento . A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).



**Figura 26.** Teores de aminoácidos livres totais no sistema radicular de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50 μM) ao longo de 4 dias de tratamento . A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

### Teores de Proteínas no sistema radicular

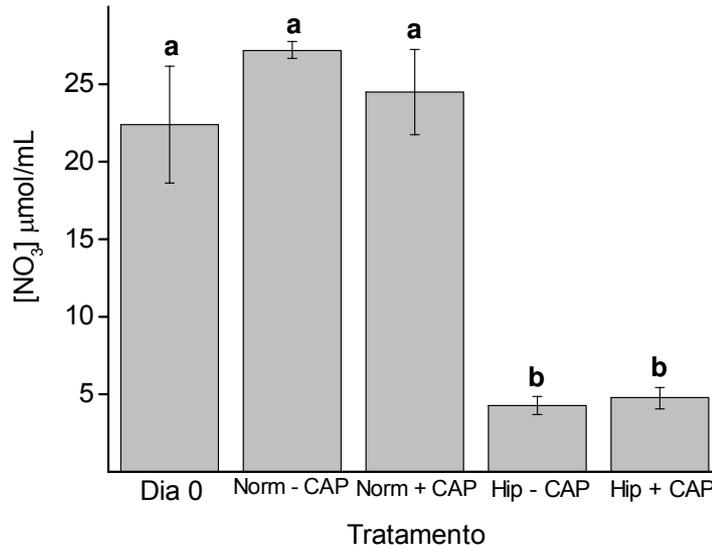
De acordo com a figura 27, observamos que, em condições de hipóxia, independentemente da presença ou não de CAP há aumento no teor de proteína no sistema radicular, assim como visto na figura 18, o que mostra a ausência de interferência do CAP no metabolismo de proteínas.



**Figura 27. Teores de proteínas no sistema radicular de plantas em solução nutritiva com  $\frac{1}{2}$  de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50  $\mu$ M) ao longo de 4 dias de tratamento . A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).**

### Teores de nitrato da seiva do xilema

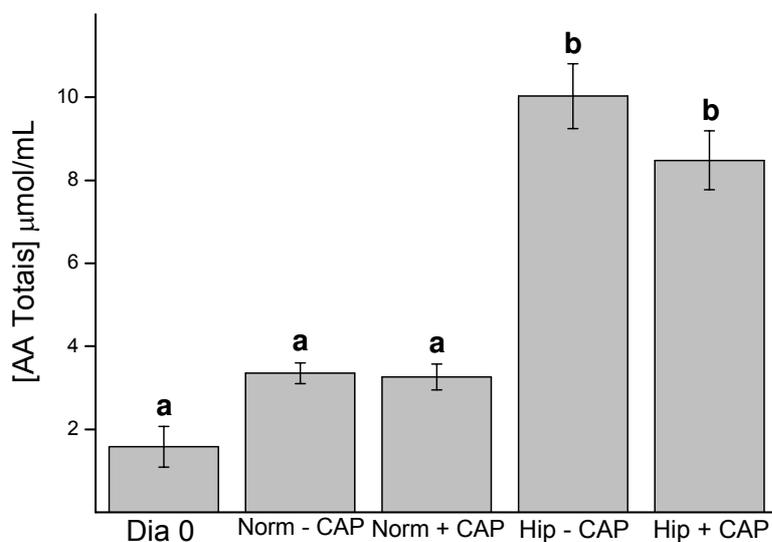
Houve uma queda bastante acentuada na concentração de nitrato transportado pela seiva do xilema das plantas submetidas à hipóxia, conforme já visto na figura 20. Verificou-se, de acordo com a figura 28, que a presença do CAP não teve influência nesta queda.



**Figura 28.** Teores de nitrato na seiva do xilema de plantas em solução nutritiva com ½ de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50 µM) ao longo de 4 dias de tratamento . A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

#### **Teores de Aminoácidos livres totais na seiva do xilema**

O transporte de aminoácidos livres totais pela seiva do xilema aumenta nas plantas submetidas ao estresse de hipóxia, quando estas são comparadas às plantas normóxicas, sendo esta a mesma tendência observada na figura 21. Entretanto, foi constatado, de acordo com a figura 29, que a presença do antibiótico não teve influência sobre o transporte de aminoácidos na seiva do xilema.



**Figura 29.** Teores de aminoácidos livres totais na seiva do xilema de plantas em solução nutritiva com  $\frac{1}{2}$  de força e pH inicial 6,5, em plantas normóxicas e hipóxicas na presença ou não de cloranfenicol (50  $\mu\text{M}$ ) ao longo de 4 dias de tratamento . A análise estatística foi feita de forma global entre os diferentes tratamentos (normóxia e hipóxia). Médias assinaladas com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 5\%$ ).

## **4.2 ESTUDOS COM A ENZIMA REDUTASE DO NITRATO**

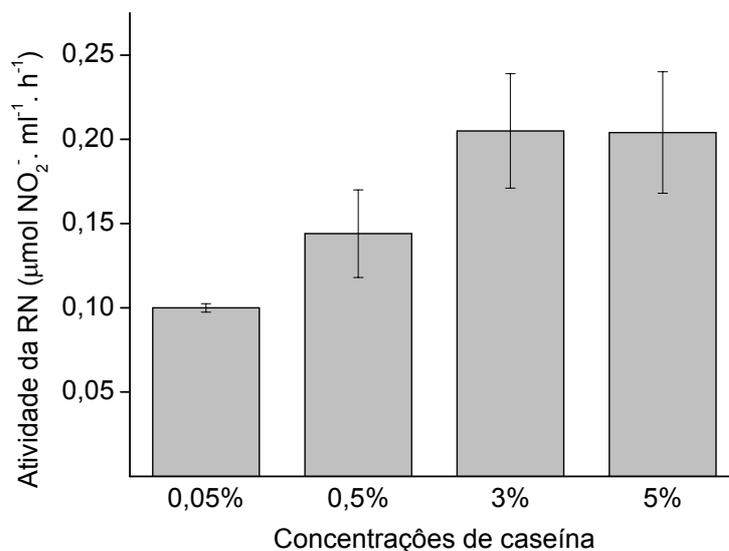
### **4.2.1 Otimização do método para extração da enzima RN**

#### **Composição do tampão de extração**

O método para extração e dosagem da enzima RN, neste estudo, seguiu os procedimentos de Botrel & Kaiser (1997), que buscaram ao final do processo conservar ao máximo a enzima para obter a maior atividade possível. Por essa razão, no tampão de extração foram utilizados reagentes com diversas funções relacionadas à conservação da atividade enzimática.

Em virtude do tipo de material vegetal utilizado ter sido diferente, no caso de Botrel & Kaiser (1997), cevada, foi necessário investigar e avaliar a importância desses reagentes, isolados ou combinados entre si, suas concentrações, assim como a possibilidade de substituição por outros, quando conveniente, ou até a exclusão dos mesmos, no processo de extração da enzima em raízes de soja.

O tampão de extração usado por Botrel & Kaiser (1997) contém a proteína caseína na concentração de 0,05%. O principal motivo da inclusão de caseína no tampão de extração é proteger as enzimas no extrato da ação das enzimas proteolíticas, pois a caseína serve como substrato alternativo para a proteólise. Por essa razão foi feito um estudo detalhado para estabelecer a concentração mais adequada na composição do tampão de extração. Foram realizados testes aumentando-se a concentração da caseína de 0,05% para 0,5%, 3% e 5% (ver figura 30). Verificou-se que a mesma tem efeito benéfico na manutenção da RN, já que houve um aumento expressivo na atividade da enzima, entre as três primeiras concentrações. O mesmo não ocorreu entre 3 e 5%, por essa razão, foi estabelecida a concentração de 3% para preparo do tampão. Também foi observado que existe dificuldade na diluição da caseína quando esta é usada em grandes quantidades, o que tornou desinteressante o uso da concentração de 5%.

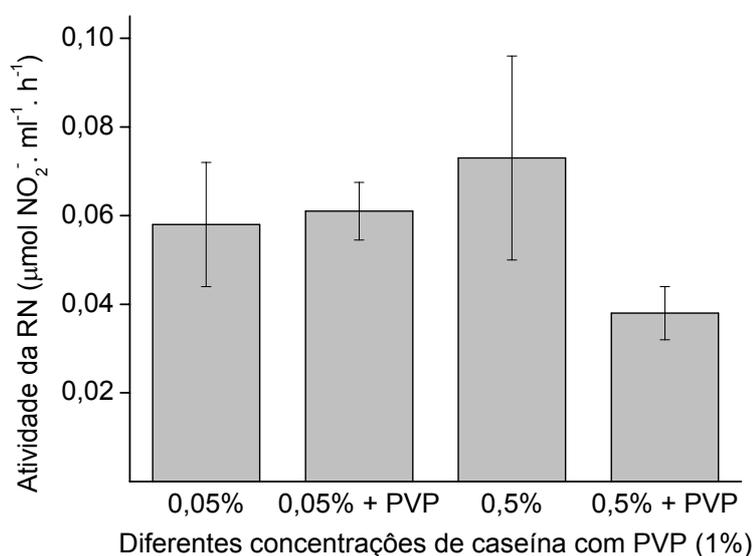


**Figura 30. Influência da caseína durante a extração sobre a atividade da RN.**

De acordo com o método original, o PVP foi utilizado em uma concentração de 1%. Como a função dele é agregar fenóis, e a quantidade desses compostos é bastante variada nos vegetais, a sua utilização pode ter maior ou menor importância de acordo com a planta estudada. Nesse caso, fizemos testes utilizando o PVP a 1%, combinado com apenas duas concentrações de caseína (0,05% conforme usada no método original e 0,5%) . Pelos dados apresentados na figura 31 verificamos que, em plantas de soja, ele não mostrou importância na composição do tampão, independentemente da concentração de caseína utilizada, uma vez que não houve melhora da atividade da RN. Por essa razão o PVP não foi utilizado.

A leupeptina tem função anti-proteolítica, assim, quando ela está presente no tampão, as proteases são inibidas preservando dessa forma, a enzima de interesse, RN. Foram testadas duas concentrações de caseína (0,05 e 3%), na presença e ausência de leupeptina, tendo em vista que na concentração mais alta de caseína (conforme estabelecido aqui) a leupeptina pode não ser necessária em função do maior efeito protetor da caseína, enquanto que na

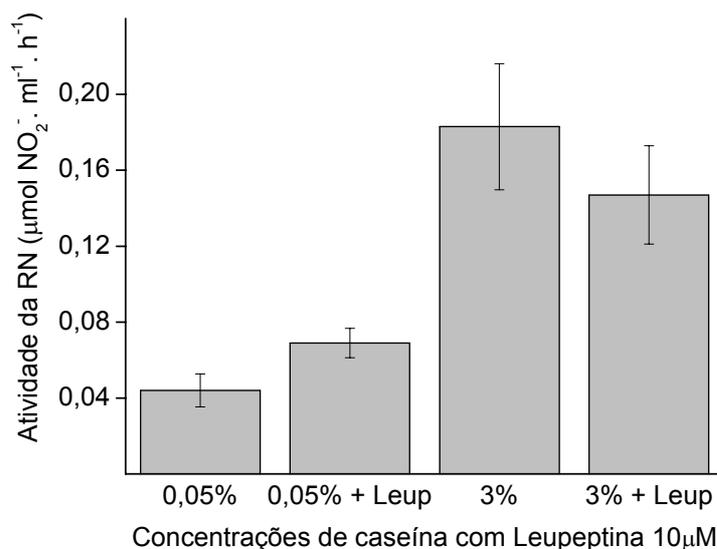
concentração mais baixa de caseína usada no método original a leupeptina pode ser benéfica. A concentração de leupeptina utilizada (10  $\mu\text{M}$ ) seguiu o método de Botrel & Kaiser (1997). De acordo com a figura 32, observamos que na concentração 0,05% de caseína, a leupeptina contribuiu para conservação da enzima, embora não de forma expressiva, mas isso não se repetiu quando ela está associada à concentração de 3%. Desta forma, avaliamos desnecessária sua presença na composição do tampão embora seu uso fosse justificado no protocolo de Botrel & Kaiser (1997).



**Figura 31. Influência do PVP durante a extração sobre a atividade da RN.**

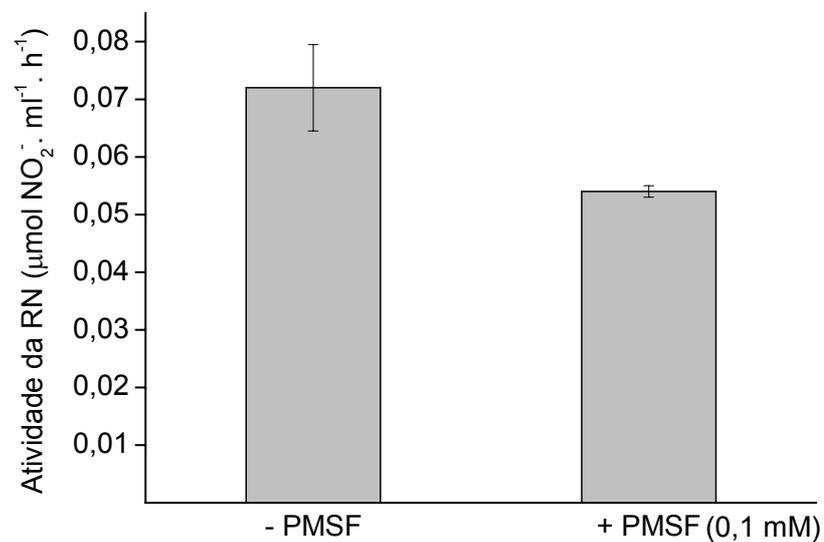
Tendo em vista a pouca eficácia da leupeptina (pelo menos em combinação com a concentração mais alta de caseína), foi utilizado PMSF (0,1 mM), que também é um inibidor de proteases, para verificar a possibilidade de substituir a leupeptina e/ou o uso da concentração mais elevada de caseína (3%) na constituição do tampão. Esse reagente não foi utilizado no procedimento de extração feito por Botrel & Kaiser (1997), e sua presença no tampão, ao contrário do esperado, não trouxe nenhum benefício para a atividade da RN (figura

33) e por essa razão seu uso na constituição do tampão foi descartado. Portanto dos testes realizados até aqui, o benefício maior foi obtido com o aumento na concentração de caseína, sem a presença de inibidores de proteases.

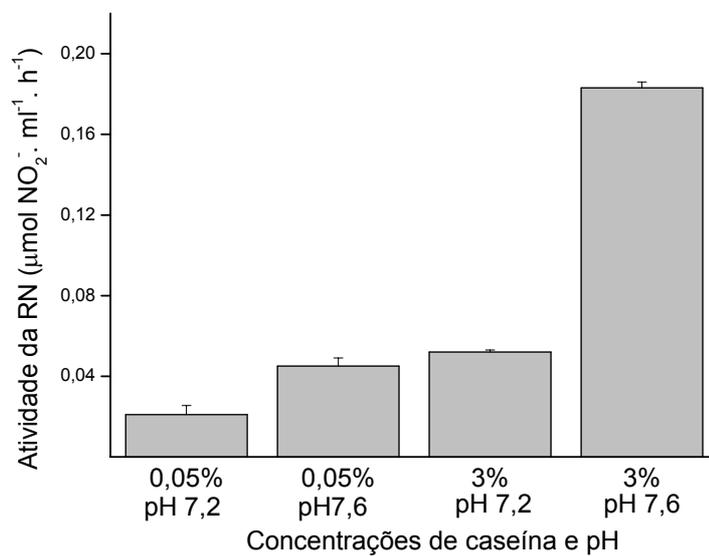


**Figura 32. Influência da Leupeptina (10 $\mu\text{M}$ ) na presença de duas concentrações de caseína durante a extração sobre a atividade da RN.**

Entretanto, foi observado que o aumento da quantidade de caseína no tampão de extração alterava o pH do mesmo, ou seja, provocava uma diminuição de 7,6 para 7,2. Por essa razão foram feitos testes para avaliar se o aumento da atividade da RN estava sendo ocasionado pela mudança no pH e não pelo aumento na concentração de caseína. De acordo com a figura 34, notou-se que o pH estabelecido por Botrel & Kaiser (7,6) é o mais apropriado para condução dos experimentos, já que a atividade da RN se manteve mais alta quando comparada ao pH 7,2, independentemente da concentração de caseína. Portanto, o efeito benéfico do aumento na concentração de caseína não foi devido a mudanças no pH, porém os dados mostram a importância de ajustar o pH após a adição de caseína ao tampão de extração.



**Figura 33. Influência do PMSF durante a extração sobre a atividade da RN.**



**Figura 34. Influência do pH em diferentes concentrações de caseína durante a extração sobre a atividade da RN.**

## Ensaio enzimático

A partir da otimização do método de extração, também foram verificados os procedimentos para condução dos ensaios enzimáticos. Nesse caso, foram necessários testes para padronização do tempo de incubação do ensaio e a importância da adição do PMS ao final da reação. Foi observado que o tempo utilizado por Botrel & Kaiser (1997) para incubação do ensaio (4 minutos), foi bastante curto, o que prejudica a sensibilidade do ensaio, já que a concentração do produto dosado (nitrito) poderia ser maior em espaços de tempo mais amplos. Outro fato observado foi que seria difícil conduzir os experimentos no tempo determinado por Botrel & Kaiser (1997), uma vez, que não seria viável paralisar um número grande de repetições num curto espaço de tempo. Por essa razão tornou-se necessário verificar a atividade da RN em função do tempo. Os testes realizados (figura 35) mostraram uma tendência linear da atividade enzimática entre 0 e pelo menos 30 minutos, sendo então esse intervalo determinado para incubação dos ensaios.

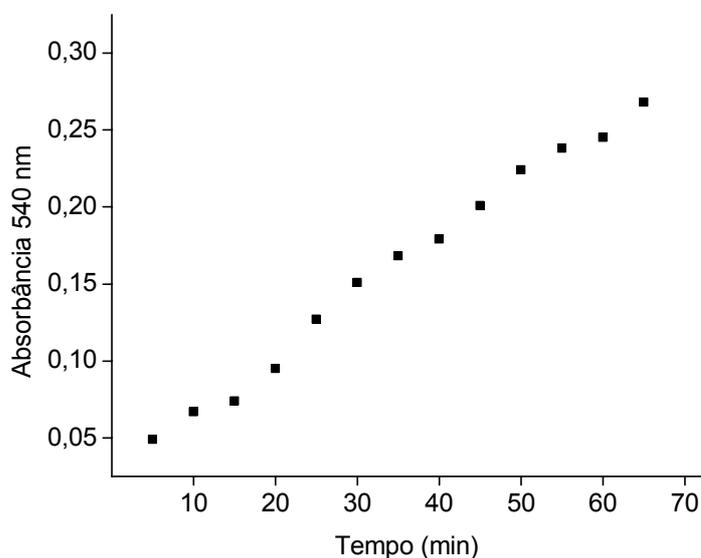
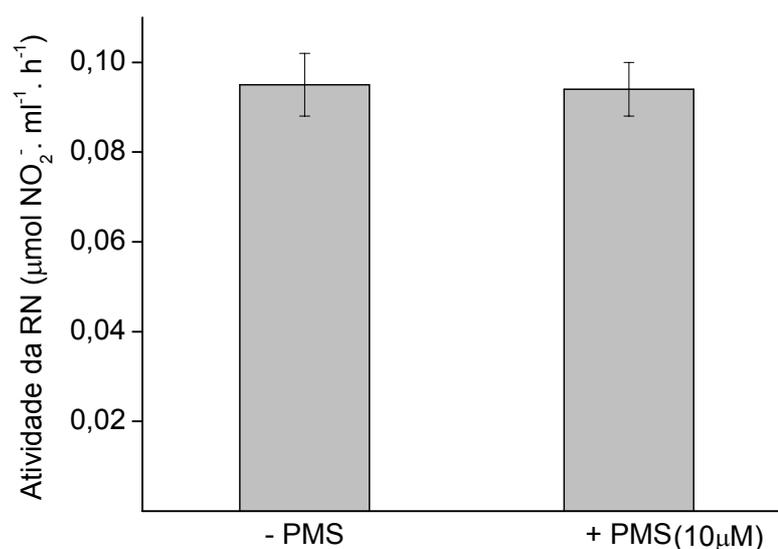


Figura 35. Atividade da RN em função do tempo de incubação.

De acordo com o método de Botrel & Kaiser (1997), ao final do ensaio enzimático usou-se PMS (10 $\mu$ M) para oxidar o NADH remanescente, uma vez que ele poderia interferir na leitura do nitrito. De acordo com a figura 36, essa interferência não foi observada nas condições de ensaio aqui utilizadas e, portanto seu uso foi descartado.



**Figura 36. Interferência do PMS na leitura do nitrito no ensaio da RN.**

A partir dos testes realizados, a método foi modificado, se tornando satisfatório para extração da enzima em raízes de soja sem o uso de PVP, leupeptina, PMSF, no tampão de extração e do PMS, ao final do ensaio enzimático. Contudo, houve necessidade de aumentar a concentração de caseína de 0,05 para 3%, e o tempo de incubação dos ensaios estabelecido foi de 0 a 30 minutos com a inclusão de um ponto aos 15 minutos, para poder certificar a linearidade da reação.

#### **4.2.2 Respostas da enzima RN do sistema radicular em condições de hipóxia e retorno à normóxia**

Após as plantas terem sido cultivadas em hidroponia (solução com ½ de força, pH inicial 6,5) e atingirem o estágio de desenvolvimento V4, conforme descrito no item 3.3, foi feita a dosagem da enzima RN total (forma ativa + inativa, usando tampão contendo EDTA) e apenas a forma ativa (utilizando tampão contendo MgCl<sub>2</sub>). Também foi avaliada a atividade da enzima *in vivo*, para fins de comparação. As dosagens foram feitas em intervalos de 1 dia nas plantas hipóxicas, por um período de 4 dias, e após esse tempo, outras plantas que estavam submetidas à hipóxia retornaram à normóxia, como descrito no item 3.3, também foram avaliadas. As plantas em normóxia foram avaliadas nos dias 0, 4 e 8. Concomitantemente foi acompanhada a concentração de nitrato (fig 23), nitrito (fig 24) e pH (fig 13) da solução nutritiva do vaso, dados esses apresentados no item 4.1.

Na tabela 3, observa-se que ocorreu uma queda acentuada na atividade da enzima ao longo dos dias de hipóxia, fato que não ocorreu em normóxia. A atividade da RN foi recuperada rapidamente (1 dia) após retornar à normóxia. A proporção da atividade total em forma ativa variou pouco ao longo do experimento. As atividades obtidas nos ensaios *in vivo*, são bastante diferentes dos valores obtidos pelo método *in vitro*, no segundo caso, em geral, bem superiores. Apesar das diferenças nos valores absolutos, na maioria dos casos, observa-se um perfil parecido com o encontrado da atividade *in vitro*.

**Tabela 3. Atividade de RN *in vitro* (RN total + RN ativa ) e RN *in vivo* em raízes de plantas sob hipóxia e durante a recuperação da hipóxia. A quantidade relativa de RN inativa é dada em percentual da RN total. A atividade da RN foi expressa em  $\mu\text{mol NO}^2 \cdot \text{g MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .**

Amostra	RN total	RNativa	RN-inativa (%)	<i>in vivo</i>
Dia 0	0,908 abc*	0,231 bc*	75	0,333 c*
	$\pm 0,262$	$\pm 0,059$		$\pm 0,039$
Dia 1	0,560 bc	0,146 bc	74	0,331 c
	$\pm 0,026$	$\pm 0,019$		$\pm 0,063$
Dia 2	0,349 bc	0,099 c	72	0,174 c
	$\pm 0,022$	$\pm 0,002$		$\pm 0,037$
Dia 3	0,279 c	0,099 c	65	0,441 c
	$\pm 0,039$	$\pm 0,041$		$\pm 0,114$
Dia 4	0,276 c	0,061 c	78	0,826 bc
	$\pm 0,017$	$\pm 0,002$		$\pm 0,088$
Dia 4 – Norm	1,558 a	0,504 a	68	1,43 bc
	$\pm 0,370$	$\pm 0,042$		$\pm 0,209$
Rec. dia 1	0,919 abc	0,341 ab	63	2,04 abc
	$\pm 0,220$	$\pm 0,094$		$\pm 0,166$
Rec. dia 2	0,983 abc	0,364 ab	63	2,44 abc
	$\pm 0,144$	$\pm 0,041$		$\pm 0,393$
Rec. dia 3	0,737 abc	0,178 bc	76	3,215 ab
	$\pm 0,284$	$\pm 0,030$		$\pm 0,478$
Rec. dia 4	0,582 bc	0,182 bc	69	4,51 a
	$\pm 0,108$	$\pm 0,046$		$\pm 1,54$
Dia 8 - Norm	1,235 ab	0,476 a	62	1,276 bc
	$\pm 0,128$	$\pm 0,042$		$\pm 0,35$

\* teste de Tukey feito em colunas

### 4.2.3 Efeito do pH externo na atividade da RN

Foi avaliada a atividade da RN total, ativa e *in vivo* em função do pH externo da solução nutritiva, ajustado no início do tratamento em 5,5, 6,5 e 8,0, sem ajustes diários. A atividade da enzima foi dosada apenas no dia 4, tanto nas plantas normóxicas quanto nas hipóxicas. Este experimento foi realizado em função dos dados que foram apresentados no item 4.1, onde se encontrou uma variação no consumo de nitrato em função do pH do meio. Verificou-se de acordo com a tabela 4, que o pH inicial da solução nutritiva, no caso das plantas submetidas à hipóxia, não teve influência na atividade da enzima, tanto na forma ativa, quanto na RN total. Quando comparamos a normóxia com a hipóxia, verificamos que a queda na atividade durante a hipóxia foi com a mesma intensidade para todos os tratamentos, tanto na forma ativa quanto na forma inativa. Já quando analisamos a resposta da atividade da RN nas plantas normóxicas, observamos que existem variações significativas nas atividades em função do pH do meio. Nas dosagens feitas *in vivo*, tanto nas plantas normóxicas quanto nas hipóxicas, as diferenças entre pHs, no geral, não foram significativas e a queda em hipóxia menos acentuada quando comparadas as atividades *in vitros*. Pode-se dizer que nas plantas hipóxicas, existiu pouca variação na atividade da enzima *in vivo* e *in vitro* nesses diferentes pHs. Ao contrário do experimento anterior (4.2.2) onde a hipóxia não mudou a proporção da forma ativa, aqui houve uma queda na proporção da forma ativa, inclusive em todos os pHs testados. É válido ressaltar que existe uma tendência de tamponamento da solução nutritiva, onde independentemente do pH inicial, as plantas normóxicas e hipóxicas estabilizam seus pHs em faixas específicas, dados esses que foram apresentados no item 4.1.

**Tabela 4. Atividade de RN *in vitro* (RN total + RN ativa ) e RN *in vivo* em raízes de plantas após 4 dias sob normóxia e hipóxia com diferentes pHs iniciais. A quantidade relativa de RN inativa é dada em percentual da RN total. A atividade da RN foi expressa em  $\mu\text{mol NO}^2 \cdot \text{g MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .**

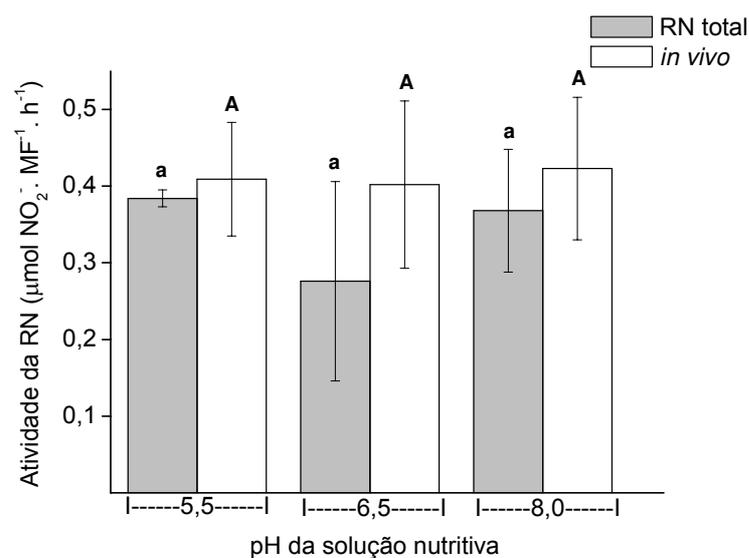
Amostra	RN total	RN ativa	RN inativa. (%)	<i>in vivo</i>
Normóxia pH 5,5	0,743 ab*	0,568 a*	24	0,461 ab*
	$\pm 0,041$	$\pm 0,114$		$\pm 0,00$
Normóxia pH 6,5	0,843 a	0,500 a	41	0,745 a
	$\pm 0,054$	$\pm 0,014$		$\pm 0,028$
Normóxia pH 8,0	0,573 b	0,322 ab	44	0,789 a
	$\pm 0,006$	$\pm 0,052$		$\pm 0,072$
Hipóxia pH 5,5	0,119 c	0,043 bc	64	0,372 b
	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$		$\pm 0,094$
Hipóxia pH 6,5	0,108 c	0,038 bc	71	0,329 b
	$\pm 0,032$	$\pm 0,006$		$\pm 0,036$
Hipóxia pH 8,0	0,100 c	0,027 c	92	0,470 ab
	$\pm 0,008$	$\pm 0,005$		$\pm 0,088$

\*teste de Tukey feito em colunas

Um problema na interpretação dos dados do experimento com pH foi o fato que o pH inicial do meio não se manteve constante ao longo dos 4 dias de tratamento (os dados da variação de pH foram apresentados no item 4.1.2). Desta forma, foi necessário verificar se tais mudanças no pH podem refletir na atividade enzimática e explicar as variações encontradas no experimento anterior. Tecnicamente, ajustar o pH durante o tratamento hipóxia é complicado, pois para manter as condições hipóxicas é necessário não perturbar o meio. No caso das plantas em normóxia não há problema realizar ajustes diários do pH. O presente experimento foi realizado, portanto apenas com plantas em normóxia para verificar o efeito de pH do meio na atividade da enzima. Para este fim, a atividade da RN *in vitro* (RN

total) e *in vivo* foi dosada em plantas cultivadas até atingirem o estágio V4, da mesma forma já descrita no experimento anterior, com pHs mantidos constantes durante 4 dias em 5,5, 6,5 8,0 através de ajustes diários.

Verificou-se, de acordo com a figura 37, que não foi significativa a diferença da atividade da RN total nesses pHs. Isso mostrou que o pH externo, no caso dos experimentos realizados, não contribuiu de forma efetiva na variação na atividade da enzima RN, ou seja, mesmo existindo mudança ao longo dos 4 dias, esta não iria influenciar na resposta da enzima estudada. Mas, é importante que em plantas controle, ele seja mantido constante durante todo o ensaio, assim, evitará as variações vistas anteriormente.



**Figura 37. Atividade de RN in vitro (RN total + RN ativa ) e RN in vivo em raízes após 4 dias sob normóxia com diferentes pHs iniciais (mantidos constantes).**

#### 4.2.4 Efeito de NO exógeno (SNP) sobre a atividade da RN

Como o NO é um provável sinalizador de estresse abiótico (Magalhães *et al*, 2002; Lea *et al*, 2004), no estudo das plantas sob condição de hipóxia, ele pode estar envolvido na atividade de enzimas que têm relação com a resposta ao estresse, no caso, a RN. O SNP é um reagente que em solução e na presença de luz libera NO no meio, o que estimula as respostas ao estresse nas plantas.

O cultivo das plantas foi feito da mesma forma já mencionada anteriormente, e a partir da idade adequada, foi verificada a atividade da RN (RN total, ativa e *in vivo*) em intervalos de 3 h (0, 3, 6, 12 e 24 h), onde em um dos tratamentos a solução de SNP foi pulverizada diretamente nas raízes e no outro caso, o SNP foi dissolvido na solução nutritiva, tendo como controle plantas hipóxicas no mesmo intervalo de tempo, conforme tabela 5. Esse intervalo de tempo para condução dos experimentos foi determinado porque sabe-se que o NO é um radical livre que está na forma gasosa, assim, existe uma grande possibilidade dele reagir com o oxigênio presente no próprio tecido vegetal ou mesmo com o oxigênio atmosférico, ou seja, à medida que a planta supostamente o produz ele acaba reagindo com o oxigênio presente, não ficando então disponível por muito tempo nos tecidos da mesma. Assim, a planta poderia dar uma resposta no início do estresse e não necessariamente por todo o tempo.

Não houve variação significativa entre os diferentes tratamentos nos intervalos de tempo estudados na atividade da RN total e RN ativa, a tendência também se estende aos testes *in vivo* (tabela 5). Portanto, não foi obtida nenhuma evidência de que o NO pudesse estar envolvido nas mudanças na atividade da RN durante o estresse de hipóxia.

**Tabela 5. Atividade de RN *in vitro* (RN total + RN ativa ) e RN *in vivo* em raízes de plantas sob normóxia e hipóxia submetidas à presença de SNP/NO, em intervalos de 3 h. A quantidade relativa de RN inativa é dada em percentual da RN total. A atividade da RN foi expressa em  $\mu\text{mol NO}^2 \cdot \text{g MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .**

Amostra	RN total	RN ativa	RN-inativa (%)	<i>in vivo</i>
Tempo 0 (h) -	0,889 Aab*	0,179 a*	75	0,717 a*
Normóxia	± 0,024	± 0,098		± 0,215
3h Hipóxia	0,924 A	0,220 a	74	0,739 a
	± 0,038	± 0,069		± 0,164
6h Hipóxia	0,765 A	0,190 a	72	0,328 a
	± 0,14	± 0,022		± 0,033
12h Hipóxia	0,833 A	0,108 a	65	0,311 a
	± 0,033	± 0,027		± 0,027
24h Hipóxia	0,373 B	0,062 a	78	0,318 a
	± 0,070	± 0,003		± 0,095
3h Hip + SNP na sol.	0,881 ab	0,133 a	68	0,491 a
	± 0,130	± 0,063		± 0,054
6h Hip + SNP na sol.	1,059 a	0,208 a	63	0,251 a
	± 0,038	± 0,063		± 0,00
12h Hip + SNP na sol.	0,557 b	0,190 a	63	0,253 a
	± 0,109	± 0,033		± 0,064
24h Hip + SNP na sol.	0,724 ab	0,106 a	76	0,208 a
	± 0,054	± 0,014		± 0,077
3h Hip +SNP na raiz	1,186 A	0,151 a	69	0,401 a
	± 0,419	± 0,054		± 0,125
6h Hip + SNP na raiz	0,983 A	0,195 a	76	0,371 a
	± 0,027	± 0,076		± 0,066
12h Hip + SNP raiz	0,676 A	0,130 a	69	0,282 a
	± 0,087	± 0,033		± 0,009
24h Hip + SNP raiz	0,557 A	0,092 a	62	0,383 a
	± 0,076	± 0,027		± 0,086

\* teste de Tukey (apenas em intervalos de tempo do mesmo tratamento; tempo zero comum)

## 5. DISCUSSÃO GERAL

O alagamento constitui um fenômeno bastante comum na natureza levando o sistema radicular das plantas afetadas ao estresse de hipóxia. A capacidade de adaptação das plantas ao estresse de hipóxia está vinculada, do ponto de vista metabólico, aos seus produtos finais resultantes do metabolismo de nitrogênio, como aminoácidos, por exemplo. Esse fenômeno juntamente com outros aspectos metabólicos ajudam na sobrevivência sob hipóxia ou anoxia parcial (Crawford, 1972; Drew, 1997). Entretanto, a tolerância de várias espécies à hipóxia é aumentada pela simples presença do nitrato no meio (Malavolta, 1954; Trought & Drew, 1981; Prioul & Guyot, 1985), incluindo a soja (Thomas, 2004). O mecanismo pelo qual o nitrato exerce esse efeito benéfico tem sido um assunto de muita especulação com poucos resultados concretos. O presente trabalho procurou um entendimento melhor do assunto.

Em condições de hipóxia houve maior consumo de nitrato da solução nutritiva do vaso quando comparado com a normóxia. Existem relatos que o consumo de nitrato em condições de anaerobiose aumenta (Allégre *et al*, 2004), o que também foi verificado aqui em soja. No entanto, quando se acrescentou cloranfenicol à solução, esse consumo adicional foi praticamente eliminado. Foi verificado que sob hipóxia ocorreu acúmulo de nitrito na solução nutritiva, mas embora significativa, este foi menor quando se adicionou antibiótico à solução. Estudos mostram que a produção de nitrito tem uma origem biótica, pois quando a solução nutritiva tem borbulhamento de N<sub>2</sub>, sem a presença da planta, não há ocorrência de nitrito (Caumes, 2002). Por outro lado, Morard *et al* (2004c) sugerem que a redução do nitrato é um processo bioquímico ligado apenas ao metabolismo das células das raízes, uma vez que o nitrito também aparece na solução nutritiva estéril *in vitro* de raízes asfíxiadas e assim não teria envolvimento de microorganismos nesse processo. Os nossos dados, portanto, estão em

conflito com os dados de Morard *et al* (2004c), pois o cloranfenicol reduziu a formação de nitrito no meio, sugerindo a ação de bactérias.

Em plantas superiores, nitrito livre é raramente encontrado. A nitrito redutase geralmente é mais ativa que a nitrato redutase, em condições de normóxia (Stewart, 1972) e a redução é completa, havendo produção de aminoácidos e amidas (Garcia-Novo,1973). Embora em nosso estudo não tenha sido detectada a presença de nitrito no tecido radicular e nem na seiva do xilema, existem relatos que após o alagamento (hipóxia), ocorre presença de nitrito, embora pequena, na seiva do xilema (Morard, *et al*, 2004c), raízes e folhas (Garcia-Novo,1973) e isso não ocorre em condições de normóxia, o que mostra ser o nitrito um sinal distinto e particular das condições de alagamento (Allégre, 2004). Esse fato não é restrito a plantas pouco tolerantes a hipóxia (Garcia-Novo,1973). Investigações têm revelado que esse acúmulo ocorre porque em um tecido sob deficiência de oxigênio, a via de utilização do nitrato é parcialmente ou completamente “parada” no passo da nitrito redutase (Lee, 1978, 1979; Aslam *et al*, 1979; Botrel *et al*, 1996), o que resulta no aumento da concentração do nitrito intracelular associado com a liberação de nitrito no meio (Ferrari & Varmer, 1971; Lee, 1979; Glaab & Kaiser, 1993). O fato da pouca quantidade de nitrito encontrado nos tecidos e da solução nutritiva apresentar uma alta concentração, indica que o nitrito produzido durante a hipóxia é eliminado para fora do tecido (Lee, 1978; Reggini *et al*, 1985a; Botrel *et al*, 1996), o que sugere sua toxicidade para as plantas (Glaab & Kaiser, 1993), e se justifica sua expulsão para o meio externo.

Plantas sob hipóxia mantiveram os pHs de suas soluções nutritivas significativamente mais baixos em comparação as normóxicas, independentemente do tratamento utilizado. No caso, em condições de normóxia, o pH da solução nutritiva foi estabilizando em torno de 7,8, independente do pH inicial, enquanto que em hipóxia o pH estabilizou em 6,6. Allégre *et al*, (2004) também observaram essa diferença no pH e atribuíram o pH mais baixo em hipóxia à

presença de nitrato na solução, pois observaram o pH da solução nutritiva diminuir à medida que foi detectada a presença de nitrito. Por outro lado, o envolvimento do nitrato é questionável, pois de acordo com Brito & Sodek (comunicação pessoal), o pH da solução nutritiva de plantas de soja noduladas, sem adição de nitrato, em condições de hipóxia ficou ainda mais baixo, em torno de 5,8.

Os dados dos compostos nitrogenados nos tecidos da raiz mostram claramente uma alteração no metabolismo de N em condição de hipóxia, pois os teores desses compostos foram bastante modificados nesta condição. Aminoácidos e proteínas acumularam-se, enquanto que o nitrato diminuiu, conforme já observado por Barta (1987), Huang & Johnson (1995) e Sousa & Sodek (2002). Tal fenômeno ocorreu independentemente do tratamento realizado (presença ou não de cloranfenicol, concentração de nitrato e/ou pH da solução nutritiva do vaso). Em hipóxia houve consumo de nitrato endógeno (figura 16, página 48) sugerindo que a quantidade de nitrato absorvida foi insuficiente para suprir a planta (Reggiani *et al*, 1985b; Sousa & Sodek, 2002). O fato de que o consumo do nitrato endógeno durante a hipóxia ter sido semelhante na presença e ausência do cloranfenicol é mais uma indicação de que o maior consumo de nitrato do meio, em hipóxia na ausência do antibiótico, não teve influência no metabolismo de N nas raízes, sendo assim um fenômeno externo ao sistema radicular. Portanto, apesar do consumo semelhante do nitrato durante hipóxia e normóxia (descontado o consumo adicional inibido pelo cloranfenicol), é evidente que o metabolismo do nitrato foi bastante diferente durante a hipóxia. A causa e a finalidade desta alteração são ainda especulativas. Existe a hipótese de que o acúmulo de metabólitos nas raízes tem a finalidade de diminuir o potencial osmótico e absorver água, mantendo a pressão de turgor (Menegus *et al*, 1989; Reggiani *et al*, 1988; Fan *et al*, 1997), para compensar a diminuição na absorção de íons, ocasionada pela baixa disponibilidade de ATP (Barta, 1987; Drew, 1990).

Apesar das evidentes alterações nos teores dos compostos nitrogenados durante a hipóxia, não houve recuperação dos teores de alguns desses compostos após retorno à normóxia. Por outro lado, ao contrário do que foi observado no estudo aqui, no trabalho realizado por Sousa (2001) a recuperação de todos os compostos nitrogenados foi total. É provável que esta discrepância decorra do fato de que no trabalho de Sousa (2001) foi usada uma concentração maior de nitrato (15 mM) do que nesse estudo que foi de 7,5 mM, o que resultou numa baixa concentração de nitrato disponível na solução nutritiva ao final dos 4 dias de hipóxia, uma vez que o consumo de nitrato durante a hipóxia foi elevado. Desta forma, é possível que o total retorno do metabolismo ao normal tenha sido prejudicado pela falta de nitrato no meio quando as plantas voltaram à normóxia.

Os vários produtos do metabolismo, incluindo os aminoácidos, podem ser translocados para a parte aérea (Garcia-Novo, 1973). Através da análise da seiva, pode-se obter informações sobre atividade assimilatória da raiz e também informações qualitativas dos tipos de compostos nitrogenados que suprem a parte aérea (Lorenz, 1976). Por exemplo, quanto mais elevado o teor de aminoácidos em relação ao nitrato, mais elevada a assimilação do nitrato na raiz comparada com a folha (Pate 1973; Pate *et al*, 1975; Atkins *et al*, 1980). Informações obtidas da seiva são consideradas úteis para avaliar o efeito do estresse de nutrientes (Pate, 1971). Foi observado que o teor de nitrato transportado pela seiva diminui em condições de hipóxia (figura 20, página 52), embora aumente o teor de aminoácidos livres totais. Isto sugere maior redução de nitrato na raiz ou menor absorção de nitrato. Outros dados obtidos, no entanto, são contrários às duas possibilidades, pois a atividade da RN nas raízes caiu e o desaparecimento do nitrato do meio não foi inferior em hipóxia. A discussão dessa questão será retomada mais adiante. Foi observado também que Asn é o principal aminoácido presente na seiva do xilema em condições de normóxia enquanto que a composição de Ala

fica em média menor que 2 % (Thomas *et al*, 1979, Sousa & Sodek, 2002; Sousa & Sodek, 2003; Thomas, 2004). Quando comparamos as plantas normóxicas com as plantas estressadas, observamos que Asp diminui na maioria dos tratamentos enquanto Asn tem uma acentuada redução em sua proporção em todos os tratamentos. Glu, Ser, Gln, Ala e Gaba aumentam em hipóxia. A Ala foi o aminoácido que mais se destacou em relação a normóxia sob essa condição (hipóxia), de valores menores que 2% ultrapassou os 30%, um fato já observado anteriormente (Puiatti & Sodek, 1999; Sousa & Sodek, 2002; Thomas, 2004). Não se sabe a função deste aumento em Ala, pois a sua formação a partir de piruvato não utiliza NADH, ao contrário do lactato e etanol.

Como menos nitrato foi armazenado na raiz e menos nitrato transportado para a parte aérea, são poucas as alternativas para explicar a utilização do nitrato absorvido do meio durante a hipóxia. Pode ser cogitada uma taxa de assimilação maior, tendo em vista o aumento em aminoácidos livres e proteínas na raiz, além do aumento no transporte de aminoácidos pela seiva do xilema. Entretanto, os nossos dados para a enzima chave da assimilação do nitrato, a RN, demonstram claramente que a sua atividade caiu bastante durante a hipóxia, um fenômeno inconsistente com uma taxa de assimilação maior. Além do mais, uma taxa de assimilação maior entraria em conflito com o conceito de que a hipóxia prejudica a redução do nitrito e, portanto a assimilação do N.

Outra possibilidade que pode ser considerada é a transformação do nitrito gerado (ou parte dele) em óxido nítrico, tido como sinalizador de estresses como hipóxia (Magalhães *et al*, 2002). A própria RN tem a capacidade de realizar esta transformação (Rockel *et al*, 2002). Morard *et al* (2004c) sugeriram que a diferença existente entre o nitrato utilizado e os metabólitos presentes na planta e solução nutritiva do vaso seja atribuída à produção de NO o que, segundo Yamasaki & Sakihama (2000), é catalisada pela RN. Esse processo é embasado

pela evidência de que o NO gerado pela atividade da RN é direcionado para o apoplasto sem contribuir para o aumento do N orgânico (Sthör, 1999).

A produção de NO *in vivo*, pode ser limitada a tecidos, principalmente em compartimentos ácidos da célula (Weitzberg & Lundberg, 1998; Lea, *et al*, 2000), pois a RN é ativada em meio ácido (Botrel *et al*, 1996; Allègre 2003; Stoimenova *et al*, 2003) como ocorre no citoplasma em hipóxia. O fato da enzima RN constitutiva em soja possuir um Km mais baixo para nitrito do que para o nitrato (Dean & Harper, 1988) torna possível uma função de produzir mais NO do que produto normal (nitrito). Isso se torna muito interessante, uma vez que a enzima RN seja regulada através de mecanismos transcricionais e pós-traducionais em respostas a diversas condições ambientais incluindo suprimento de nitrato, luz, pH, temperatura, CO<sub>2</sub> e disponibilidade de O<sub>2</sub> (Huber *et al*, 1996; Kaiser *et al*, 1999). Embora outras evidências fisiológicas e bioquímicas sejam necessárias, acredita-se que este mecanismo de regulação de RN não seja tão importante na assimilação de nitrogênio, mas que possa ser na regulação da produção de NO (Dean & Harper, 1988).

A hipótese de que a RN, durante a hipóxia, possa desempenhar o papel de produzir o NO, um sinalizador de estresse, está baseada essencialmente em duas condições. Primeiro, que o produto da sua ação, o nitrito, acumula-se durante a hipóxia em função da falta de oxigênio. Os nossos dados não evidenciaram um acúmulo do nitrito nas raízes hipóxicas, embora tenha havido acúmulo de nitrito no meio. Como apenas parte desse nitrito acumulado no meio foi sensível ao cloranfenicol (sugerindo que foi produzido por atividade bacteriana), é concebível que a fração insensível ao CAP tenha sido lançada no meio pelas raízes. Portanto, esses dados não são necessariamente contrários à hipótese. A segunda condição que sustenta a hipótese é de que a atividade da RN aumenta durante a hipóxia (Glaab & Kaiser, 1993; Botrel & Kaiser, 1997; Allègre *et al*, 2004) e mais, que aumenta a proporção da enzima na sua forma ativada (Botrel & Kaiser, 1997). A acidificação do citosol que ocorre durante a hipóxia

(Buwalda *et al*, 1988; Ricard *et al*., 1994; Fox *et al*, 1995; Ratcliffe, 1997) parece ser o fator responsável pela ativação da RN (Botrel & Kaiser, 1997; Stoimenova *et al*, 2003; Allègre 2003), portanto esta resposta da RN à hipóxia tem sido bem caracterizada. No entanto, não foi possível confirmar este fenômeno no nosso estudo com raízes hipóxicas de soja. Pelo contrário, foi encontrada uma queda brusca na atividade da RN durante a hipóxia e ainda uma recuperação da atividade logo após o retorno à normóxia. Tais mudanças em atividade foram observadas tanto pelo ensaio *in vitro* como pelo *in vivo*. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura onde foi relatado (Fox *et al*, 1994) que a atividade da RN não muda em função da deficiência do O<sub>2</sub>. Outras tentativas para verificar o envolvimento de NO no sistema estudado aqui, como o uso de SNP, um precursor de NO, foram sem sucesso.

O efeito benéfico do nitrato na tolerância de plantas ao alagamento ou à hipóxia pode envolver outros aspectos da redução do nitrato além da produção de NO. Sabe-se que a redução do nitrato pode prevenir a queda do pH evitando a formação do ácido lático (Roberts *et al*, Reggiani *et al*, 1985 a,b; Fan *et al*, 1988) ou através da expulsão do H<sup>+</sup> da célula via nitrito (Shingles *et al*, 1996; Botrel & Kaiser, 1997; Allègre, 2003, 2004). É justamente essa queda no pH do citoplasma considerada como a maior responsável pelos danos da hipóxia (Ricard, *et al*, 1994). Essa proteção do nitrato contra o dano da hipóxia/anóxia levanta a hipótese da “respiração de nitrato”. Essa respiração é bem conhecida em microorganismos anaeróbicos facultativos (Morard *et al*, 2004c) e teria a função de servir como dreno de elétrons (a redução do nitrato oxida NADH) e portanto competir com etanol nesta função. No entanto, em vários casos, a taxa de redução do nitrato é considerada desprezível quando relacionada ao “turnover” do NADH associado com produção de etanol (Lee, 1978; Regginai *et al*, 1985b; Saglio *et al*, 1988). Em alguns testes, o nitrato não teve o efeito esperado de diminuir a síntese de etanol (Lee, 1978; Saglio *et al*, 1988) e em outro caso, foi registrado aumento na fermentação alcoólica após

adição de nitrato (Reggiani *et al*, 1985b). Saglio *et al* (1988) não encontraram uma evidência positiva do efeito do nitrato sobre o metabolismo energético. Portanto, a hipótese mais plausível para explicar o efeito benéfico do nitrato não está apoiada pelas evidências disponíveis. Por essa razão, para a maioria dos autores o nitrato aparece apenas com a função de fonte de nitrogênio inorgânico para o metabolismo e crescimento (Morard *et al*, 2004c). Evidentemente, ainda são necessários mais estudos do metabolismo de nitrato durante a hipóxia para se chegar à uma conclusão quanto ao seu efeito benéfico na tolerância à hipóxia.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados permitiram concluir que existe (m) diferença (s) no metabolismo do nitrato em condição de normóxia e hipóxia, mas que (i) a atividade bacteriana no meio (solução nutritiva) pode ser responsável pelo consumo adicional de nitrato durante a hipóxia; (ii) apesar do consumo de nitrato pela planta ser semelhante para normóxia e hipóxia, o metabolismo de N nas raízes é bastante alterado na condição de hipóxia; e (iii) não houve evidências para um papel importante da enzima RN em condições de hipóxia embora a queda brusca de atividade pode estar relacionada com a mudança no metabolismo de N nas raízes.

## 7. LITERATURA CITADA

- Afridi, M.M.R. & Hewitt, E.J., 1965. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. II. Effects of environmental factors, antimetabolites and amino acids on induction. *J. Exp. Bot.* 16:628.
- Allègre, A., 2003. Approche physiologique et biomoléculaire du rôle de la nitrate réductase dans la résistance à l'asphyxie racinaire de la tomate. Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Allègre, A., Silvestre, J., Morard, P., Kallerhoff, J. & Pinelli, E., 2004. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. *J. Exp. Bot.* 55(408):2625-2634.
- Appenroth, K.J, Mecxo, R., Jourdan, V. & Lillo, C., 2000. Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Sci.* 159:51–56.
- Armstrong, W. & Beckett, P.M., 1985. Root aeration in unsaturated soil: a multishelled mathematical model of oxygen diffusion and distribution with and without sectoral wet-soil blocking of the diffusion path. *New Phytol.* 100:293-311.
- Armstrong, W., Justin, S.H.F.W., Beckett, P.M., & Lythe, S., 1991c. Root adaptation to soil waterlogging. *Acquatic Bot.* 39:57-73.
- Armstrong, W., Brändle, R. & Jackson, M.B., 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 43:307-358.
- Arnon, D.I., 1937. Ammonium and nitrate nitrogen nutrition of barley at different seasons in relation to hydrogen ion concentration, manganese, copper and oxygen supply. *Soil Sci.* 44: 91.

- Aslam, M., Oaks, A. & Huffaker, R.C., 1976. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* 58:588–591.
- Aslam, M., Huffaker, R.C., Rains, D.W. & Rao, K.P., 1979. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol.* 63:1205-1209.
- Aslam, M., Travis, R.L. & Rains, D.W., 2001. Enhancement of nitrate reductase activity and metabolic nitrate concentration by methionine sulfoximine in barley roots. *Plant Sci.* 161:133–142.
- Atkins, C.A., Pate, J.S., Griffiths, G., White, S.T., 1980. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated (NO<sub>3</sub>-grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Plant Physiol.* 66: 978-983.
- Barta, A.L., 1987. Supply and partitioning of assimilates to roots of *Medicago sativa* L. and *Lotus corniculatus* L. under anoxia. *Plant Cell and Environ.* 10:151-156.
- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P.S. & Bailey-Serres, J., 2002. RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Sci.* 296:2026–2028.
- Beckman, J. S. & Koppenol, W. H., 1996. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *American J. Physiol-cell Physiol.* 271 (5):1424-1427.
- Benson, Jr. & Hare, Pe., 1975. Ortho-phthalaldehyde-fluorogenic detection of primary amines in picomole range – Comparison with fluorescamine and ninhydrin . *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America.* 72 (2): 619-622.
- Bielecki, R.L. & Turner, N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-293.

- Blokhina, O.B., 2000. Anoxia and oxidative stress: lipid peroxidation, antioxidant status and mitochondrial functions in plants. PhD thesis, Helsinki University, Finland.
- Bloom, A.J., Sikrapanna, S.S & Werner, R.L., 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99:1294-1301.
- Botrel, A. & Kaiser, W.M., 1997. Nitrate reductase stat in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta.* 201:496-501.
- Botrel, A., Magné, C. & Kaiser, W.M., 1996. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* 34:645-652.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L., 2001. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* 3 ed. American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA. 1367p.
- Burström, H., 1945. The nitrate nutrition of plants. *K. Lantbr Högsk. Annlr.*, I3, I.
- Buwalda, K.J., Thomson, C.J., Steiger, W., Barret-Lennard, E.G., Gibbs, J. & Greenway, H., 1988. Hypoxia induces membrane depolarization and potassium loss from wheat roots, but does not increase their permeability to sorbitol. *J. Exp.Bot.* 39:1169–1183.
- Cadenas, E. & Davies, K. J. A., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad.Biol. Med.* 29, 222–230.
- Campbell, W.H., 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. *Cell and Mol. Life Sci.* 58:194–204.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. & Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil*

- Sci. and Plant Anal. 6:71-80.
- Caumes, E., 2002. Contribution a l'étude des mécanismes d'adaptation de la tomate a l'asphyxie racinaire. Thesis INP Toulouse fr. 110p.
- Chrikova, T.V. & Belonogova, V.A., 1991. Nitrate reductase activity and productivity of grain crops under waterlogged conditions. Soviet Soil Sci. 22:19–29.
- Chung, H.L., Sehnke, P.C. & Ferl, R.J., 1999. The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. Plant Sci. 4:367–371.
- Costa, J.A., 1996. Cultura de soja. Porto Alegre: I. Manica & J.A. Costa (eds). 233p.
- Crawford, R.M.M., 1966. The control of anaerobic respiration as a determining factor in the distribution of the genus *Senecio*. F. Ecol. 54: 403.
- Crawford, R.M.M., 1972. Some metabolic aspects of ecology. Trans. Edin. Bot. Soc.. 41:309.
- Davies, D.D., 1980. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: Davies, D.D., ed. The biochemistry of plants, vol. 2. New York: Academic Press. 581-611.
- Datta, R. & Sharma, R., 1999. Temporal and spatial regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in greening maize leaves. Plant Sci. 144:77–83.
- de la Haba, P., Aguñera, E., Benitez, L. & Maldonado, J.M., 2001. Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. Plant Sci. 161:231–237.
- Dean, J.V. & Harper, J.E., 1988. The conversion of nitrite to nitrogen oxide (s) by the constitutive NAD(P)H- reductase enzyme from soybean. Plant Physiol. 88:389-395.
- Dennis, E.S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F.U., Grover, A., Ismond, K.P., Good, A.G. & Peacock, W.J., 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. J. Exp. Bot. vol. 51, n. 342:89-97.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J. & Neill, S., 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 99:16314–16318.

- Dobereiner, J., 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* 29:771-774.
- Dongen, J. T. van, Schurr, U., Pfister, M. & Geigenberger, P., 2003. Phloem Metabolism and Function Have to Cope with Low Internal Oxygen. *Plant Physiol.* 131:1529-1543.
- Drew, M.C., 1990. Sensing soil oxygen. *Plant Cell and Environ.* 13:681-693.
- Drew, M.C., 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimatation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 48: 223-250.
- Drew, M.C. & Armstrong, W., 2002. Root growth and metabolism under oxygen deficiency. In: Waisel Y, Kafkafi U, Ezkel A, eds. *Plant root growth, the hidden half*. New York, Basel: Marcel Dekker, 1120.
- Drew, M.C., He, C. & Morgan, P.W., 2000. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Plants Sci.* 5:123-127.
- Ellis, R. J., 1969. Chloroplast ribosomes: stereospecificity of inhibition by chloramphenicol. *Science, N.Y.*, 163:477-478.
- Empresa Brasileira de Agropecuária, 2002. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. *Tecnologia de Produção da Soja – Região Central do Brasil 2003*. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Empresa Agropecuária Oeste; ESALQ, 199 p. (Embrapa Soja/ Sistemas de Produção 1).
- Empresa Brasileira de Agropecuária, 2003. Centro Nacional de Pesquisa da Soja. *Tecnologia de Produção da Soja – Região Central do Brasil 2004*. Londrina: Embrapa Soja; Empresa Agropecuária Oeste; Embrapa Cerrados; EPAMIG; Fundação Triângulo, 237 p.
- Erdmann, B. Wiedenroth, E.M., 1988. Changes in the root system of wheat seedlings following anaerobiosis. III. Oxygen concentration in the roots. *Ann. Bot.* 62:277-286.
- Evans, L.T., 1996. *Crop evolution, adaptation and yield*. Cambridge, University Press, 500p.
- Fan T.W-M., Higashi, R.M. & Lane, A.N., 1988. An in vivo <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR investigation

- of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 266:592-606.
- Fan, T. W-M., Higashi, R. M., Frenkiel, T. A. & Lane, A. N., 1997. Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerance rice coleoptiles. *J. Exp. Bot.* 48:1655-1666.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. & Pennington, J. S., 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11:929-931.
- Ferrari, T.E. & Varmer, J.E., 1971. Intact tissue assay for nitrite reductase in barley aleurone layer. *Plant Physiol.* 47:790-794.
- Ferrari, T.E., Yoder, O.C. & Filner, P., 1973. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol.* 51:423-431.
- Fox, T.C., Kennedy, R.A. & Rumpho, M.E., 1994. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. *Ann. Bot.* 74:445-455.
- Fox, G.G, McCallan, N.R. & Ratcliffe, R.G., 1995. Manipulation cytoplasmic pH under anoxia: a critical test of the role of pH in the switch from aerobic to anaerobic metabolism. *Planta.* 195:324-330.
- Garcia-Novo, F. & Crawford, M.M., 1973. Soil aeration, nitrate reduction and flooding tolerance in higher plants. *New Phytol.* 72:1031-1039.
- Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M. & Stitt, M., 2000. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol. Chem.* 381:723-740.
- Gilmour, D., 1965. *The metabolism of insects.* Oliver & Bold Ltd. Edinburgh, 1965. 195 p.
- Glaab, J. & Kaiser, W.M., 1993. Rapid modulation of nitrate reduction in pea roots. *Planta.* 191:173-179.
- Gomes, F.P., 1990. *Curso de Estatística Experimental.* 13<sup>a</sup> ed., Livraria Nobel, Piracicaba,

467 p.

- Good, A.G. & Muench, D.G., 1992. Purification and characterization of an aerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. *Plant Physiol.* 99:1520-1525.
- Hageman, R.H. & Reed, A.J., 1980. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymol.* 69:270-280.
- Heller, R., Esnault, R. & Lance, C., 1998. *Physiologie végétale: nutrition*, Vol. 1, 6 ed. Paris: Dunod.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M. & Pei, Z.M., 2004. Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Sci.* 305:1968–1971.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I., 1938. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California-Agricultural Experiment Station, 39 p (Circular 347).
- Hook, D.D. & Crawford, M.M., 1978. *Plant life in anaerobic environments*. Ann Arbor, Michigan: Ann'Arbor Science Publications.
- Huang, B. & Johnson, J.W., 1995. Root respiration and carbohydrate status of two wheat genotypes in response to hypoxia. *Ann. Bot.* 75:427-432.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M.J. & Durner, J., 2004. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in Arabidopsis thaliana. *Planta* 218:938–946.
- Huber, S.C., Bachmann, M. & Huber, J.L., 1996. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca<sup>2+</sup> and 14-3-3 proteins. *Plants Sci.* 1:432–438.
- IRGA. 2001. *Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil*. IRGA, Porto Alegre-RS, 2001. 128 p.
- Jarret, H.W., Cooksy, K.D., Ellis, B. & Anderson, J.M., 1986. The separation of

- ophthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. *Anal. Biochem.* 153:189-198.
- Kaiser, W.M. & Huber, S.C., 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52:1981–1989.
- Kaiser, W.M., Weiner, H. & Huber, S.C., 1999. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity *Physiol. Plant.* 105:385-390.
- Kanamaru, K., Wang, R., Su, W. & Crawford, N.M., 1999. Ser-543 in the hinge-1 region of Arabidopsis: nitrate reductase is conditionally required for binding 14-3-3 proteins and in vitro inhibition. *J. Biol. Chem.* 274:4160–4165.
- Kennedy, R.A., Rumpho, M.E. & Fox, T.C., 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* 100:1-6.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A. & Wendehenne, D., 2005. Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta.* Vol. 221 1:1-4.
- Lea, U., Hoopen, F., Provan, F., Kaiser, W.M., Meyer, C. & Lillo, C., 2004. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue, *Planta*, 219:59 – 65.
- Lee, R.B., 1978. Inorganic nitrogen metabolism in barley root under poorly aerated conditions. *J. Exp. Bot.* 29:693-708.
- Lee, R.B., 1979. The release of nitrite from barley roots in response to metabolic inhibitors, uncoupling agents, and anoxia. *J. Exp. Bot.* 30:119-133.
- Leshem, Y.Y., 1996. Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regul.* 18:155–159.

- Leshem, Y.Y., Haramaty, E., Iluz, D., Malik, Z., Sofer, Y., Roitman, L. & Leshem, Y., 1997. Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiol. Biochem.* 35:573–579.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H. & Ku, V.V-V., 1998. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem* 36:825–833.
- Liesack, W., Schnell, S. & Revsbech, N.P., 2000. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:625-645.
- Lorenz, H., 1976. Nitrate, ammonium and amino acids in the bleeding sap of tomato plants in relation to form and concentration of nitrogen in the medium. *Plant soil.* 45:169.
- Magalhães, J.R., Silva, F.L.I.M., Salgado, I., Ferrarese-Filho, O., Rockel, P. & Kaiser, W.M., 2002. Nitric oxide and nitrate reductase in higher plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 8:11-17.
- Majerowicz, N., França, M.G.C., Peres, L.E.P., Médici, L.O & Figueiredo, S.A., 2003 *Fisiologia Vegetal - Curso Prático, Âmbito Cultural Edições Ltda., RJ.*
- Malavolta, E., 1954. Studies on the nitrogenous nutrition of rice. *Plant. Physiol. Lancaster,* 29:98-99.
- Martinoia E., Heck U. & Wiemken, A., 1981. Vacuoles as storage compartment for nitrate in barley leaves. *Nature* 289:292–294.
- Marur, C.J., Sodek, L. & Magalhães, A.C., 1994. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 6(2):103-108.
- McClure, P.R. & Israel, D.W., 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- McCullough, H., 1967. Determination of ammonia in – whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim. Acta* 17:297-304.

- Menegus, F., Cattaruzza, L., Chersi, A. & Fronza, G., 1989. Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol.* 90:29-32.
- Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M. & Lillo, C., 2004. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game?. *Photosynth Res* (in press).
- Millar, A.H., Bergersen, F.J. & Day, D.A., 1994. Oxygen affinity of terminal oxidases in soyabean mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 32(6):847-852.
- Moore, S. & Stein, W.H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176:367-388.
- Morard, P. & Silvestre, J., 1996. Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: a review. *Plant and Soil.* 184:243-254.
- Morard, P., Lacoste, L. & Silvestre, J., 2000. The effect of oxygen deficiency on the uptake of water and mineral nutrients by tomato plants in soilless culture. *J. Plant Nut.* 23:1063–1078.
- Morard, P., Silvestre, J., Lacoste, L., Caumes, E. & Lamaze, T., 2004c. Nitrate uptake and nitrite release by tomato roots in response to anoxia. *J. Plant Physiol.* 161:855-865.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. & Hancock, J.T., 2002a. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53:1237–1247.
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A. & Hancock, J.T. 2002b. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 128:13–16.
- Nightingale, G. T., 1937. The nitrogen nutrition of green plants. *Bot Rev.* 3: 85.
- Opik, H., 1980. *The respiration of higher plants.* London: Edward Arnold Publishing.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W. & Goldman, S.L., 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotech J* 2:359–366.

- Pate, J. S., 1971. Measurement of nitrogenous solutes in plants. In *Nitrogen-15 in Soil-Plant Studies*:165-187. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Pate, J.S., 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* 5, 109-119.
- Pate, J.S., Sharkey, P.J., Lewis, O.A.M., 1975. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. *Planta* 122, 11-26.
- Pauletto, E.A., Sousa, R.O. & Gomes, A.S., 1998. Caracterização e manejo de solos de várzea cultivados com arroz irrigado. In: *Produção de arroz irrigado*. Peske, S.T., Nedel, J.L., Barros, A.C.S.A. (eds). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 1998. 659 p.
- Pires, J.L., Soprano, E. & Cassol, B., 2002. Adaptações morfo-fisiológicas da soja em solo inundado. *Pesq. Agrop. Bras.* 37:41-50.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M. & Delledonne M., 2003. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1094–1105.
- Prioul, J. L. & Guyot, C., 1985. Role of oxygen-transport and nitrate metabolism in the adaptation of wheat plants to root anaerobiosis. *Physiol. Vegetale.* 23(2):175-185.
- Pryor, W.A. & Squadrito, G.L., 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J. Physiol* 268:699–722.
- Puiatti, M. & Sodek, L., 1999. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 37(10):767-773.
- Radi, R., Pelu, O.G., Alvarez, M.N., Naviliat, M. & Cayota, A., 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Rad Biol Med* 30:463–488.
- Ratcliffe, R.G., 1997. In vivo NMR studies of the metabolic response of plant tissues to anoxia. *Annals of Bot.* 79 (Suppl A):39-48.

- Reggiani, R., 1999. Amino acid metabolism under oxygen deficiency. *Curr. Top. Phytochem.* 2:171-174.
- Reggiani, R., Brambilla, I. & Bertani, A., 1985. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots-I Nitrate reduction and pyridine nucleotide pools. *J. Exp. Bot.* 169:1193-1199.
- Reggiani, R., Brambilla, I. & Bertani, A., 1985. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots-II Fermentative activity and adenylic energy charge. *J. Exp. Bot.* 36:1698-1704.
- Reggiani, R., Cantú, C.A., Brambilla, I. & Bertani, A., 1988. Accumulation and introconversion of amino acids in rice roots under anoxia. *Plant Cell Physiol.* 29:981-987.
- Reggiani, R., Nebuloni, M., Matanna, M. & Brambilla, I., 2000. Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino Acids.* 18:207-217.
- Ricard, B., Couée I., Raymond, P., Saglio, P., Saint-Ges, V. & Pradet, A., 1994. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* 32:1-10.
- Rinaldi, C.A & Comandini, O., 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in plant science correspondence.* Vol. 4, 4:128-129.
- Roberts, J.K.M., Callis, J., Wemmer, D., Jardetzky, O. & Walbot, V., 1984b. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 81:6029-6033.
- Roberts, J.K.M., Andrade, F.H. & Anderson, I.C., 1985. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *Plant Physiol.* 77:492-494.

- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. & Kaiser, W. M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J.Exp.Bot.* Vol 53, 366:103-110.
- Rucki, R., 1997. Sodium nitroprusside. In: K. Florey, Editor, *Analytical Profiles of Drug Substances* **6**, Academic Press, New York. 781–792.
- Ruhland, W. & Ullrich, H., 1929. Über den Einfluss von Nitraten und von Saltpetersäure auf der Atmung grünen Blätter. *Planta*. 8: 424.
- Saglio, P.H., Rancillac, F., Bruzan, F. & Pradet, A., 1984. Critical oxygen for growth and respiration of excised and intact roots. *Plant Physiol*. 76:151-154.
- Saglio, P.H., Drew, M.C. & Pradet, A., 1988. Metabolic acclimatation to anoxia induced by low (2-4Kpa partial pressure) oxygen pretreatment (hypoxia) in root tips of *Zea mays*. *Plant Physiol*. 86:61-66.
- Shaner, D.L. & Boyer, J.S., 1976. Nitrate reductase activity in Maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol*. 58: 499.
- Shelp, B.J., Brown, A.W. & McLean, M.D., 1999. Metabolic and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci*. 4:446-452.
- Shingles, R., Roh, M.H. & McCarty, R.E., 1996. Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles (direct measurement of protonlinked transport). *Plant Physiol*. 112:1375-1381.
- Sousa, C.A.F. de, 2001. Metabolismo de nitrogênio em plantas de soja [*Glycine Max*(L.) Merr. Cv. IAC-17] submetidas à deficiência de O<sub>2</sub> no sistema radicular. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado. 102 p.
- Sousa, C.A.F de. & Sodek, L. 2002. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Braz. J. Plant Physiol*. 14:83-94.

- Sousa, C.A.F. de & Sodek, L. 2003. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environ. Exp. Bot.* 50:1-8.
- Stewart, G.R., 1972. The regulation of nitrate reductase level in *Lemna minor*. *J. Exp. Bot.* 23:171.
- Stoimenova, M., Hänsch, R., Mendel, R., Gimmler, H. & Kaiser, W.M., 2003. The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots. I. Characterization of root morphology and normoxic metabolism of wild type tobacco and a transformant lacking root nitrate reductase. *Plant and Soil* 253:145–153.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R. & Rockel, P., 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212:835–841.
- Stoner, C., Hodges, T.K. & Hanson, J.B., 1964. Chloramphenicol as an inhibitor of energy linked functions in maize mitochondria. *Nature, Lond.* 203:258-261.
- Streeter, J.G. & Thompson, J.F., 1972a. Anaerobic accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves, (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol.* 49:572-578.
- Summers, J.E., Ratcliffe, R.G. & Jackson, M.B., 2000. Anoxia tolerance in the aquatic monocot. *Potamogeton pectinatus* absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. *J. Exp. Bot.* 51:1413-1422.
- Thomas, A.L., 2004. Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine Max*) com sistemas radiculares sob deficiência de O<sub>2</sub>. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado. 76 p.
- Thomas, A.L., Pires, J.L.F. & Menezes, V.G., 2000. Rendimento de grãos de cultivares de soja na várzea. *Pesq. Agrop. Gaúcha.* 6:107-112.
- Thomas, R. J., Feller, U. & Erismann, K.H., 1979. The effect of different inorganic nitrogen

- sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.* 82:657-659.
- Thomson, C.J. & Greeway, H., 1991. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O<sub>2</sub> concentrations. *Plant Physiol.* 96:1294-1301.
- Trought, M. C. T. & Drew, M. C., 1981. Alleviation of injury to young wheat plants in anaerobic solution cultures in relation to the supply of nitrate and other inorganic nutrients, *J. Exp. Bot.* 32(128):509-522.
- VanToai, T.T, Beuerlein, J.E., Schmitthenner, A.F. & Martin, S.K.St., 1994. Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. *Crop Sci.* 34:1112-1115.
- Vartapetian, B.B., Andreeva, I.N., Generozova, I.P., Polyakova, L.I., Maslova, I.P., Dolgikh, Y.I. & Stepanova, A.Y., 2003. Review: functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Annals Bot.* 91:155–172.
- Waters, I., Kuiper, P.J.C., Watkin, E. & Greenway, H., 1991. Effects of anoxia on wheat seedlings I. Interaction between anoxia and other environmental factors. *J. Exp. Bot.* 42:1427-1435.
- Weiner, H. & Kaiser, W.M., 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Letters* 455:75–78.
- Weiner, H. & Kaiser, W.M., 2000. Binding to 14-3-3 protein is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Letters* 480:217–220.
- Weiner, H. & Kaiser, W.M., 2001. Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine-543 and its binding to 14-3-3 proteins. *J. Exp. Bot.* 52(359):1165-1172.
- Weitzberg, E. & Lundberg, J.O.N., 1998. Nonenzymatic nitric oxide production in humans *Nitric Oxide* 2:1-7.

- Wendehenne, D., Durner, J. & Klessig, D.F., 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 7:449–455.
- Williams, L.E. & Miller, A.J., 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:659-688.
- Xia, J. H. & Roberts, J. K. M., 1996. Regulation of H<sup>+</sup> extrusion and cytoplasmic pH in maize root tips acclimated to a low-oxygen environment. *Plant Physiol.* 1:227-233.
- Yamasaki, H., 2005. The NO world for plants: achieving balance in an open system *Plant, Cell Environ.* 28:78–84.
- Yamasaki, H. & Sakihama, Y., 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrite reductase: in vitro evidence for nr-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* 468:89-92.
- Zhen, R.G., Koyro, H.W., Leigh, R.A., Tomos, A.D. & Miller, A.J., 1991. Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta* 185:356–361.