

ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E AJUSTAMENTO
OSMÓTICO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-DE-
CORDA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HÍDRICO

ROBERTO CEZAR LOBO DA COSTA

FORTALEZA-CEARÁ

MARÇO - 1999

N.Cham T574.192 C875a T

Autor: Costa, Roberto Cezar Lobo da

Título: Assimilacao de nitrogenio e ajus



1029460

Ac. 32849

BCT

BCT/UFCE CATIVO

ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E AJUSTAMENTO OSMÓTICO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO

CONSULTA LOCAL
C511030
R 1029460

SAU

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

ROBERTO CEZAR LOBO DA COSTA

Tese apresentada à Coordenação do Curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do Título de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal

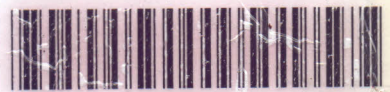
BCT/UFCE CATIVO

FORTALEZA – CEARÁ

MARÇO - 1999

UFCE/BU/BCT

02/03/1999



R1029460 Assimilacao de nitrogenio e
C511030 ajustamento
T574.192

C875a

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E AJUSTAMENTO
OSMÓTICO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-DE-
CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] SUBMETIDAS AO
ESTRESSE HÍDRICO**

ROBERTO CEZAR LOBO DA COSTA
Biólogo

ORIENTADOR : Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA, 12 DE MARÇO DE 1999

**C875a Costa, Roberto Cezar Lobo da
1999** Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse hídrico/
Roberto Cezar Lobo da Costa.
Fortaleza: UFC/Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 1999.
225 f. : il.
1. Fisiologia Vegetal. 2. Bioquímica.
3. Estresse Hídrico. 4. Metabolismo de Nitrogênio. 5. Fixação de N₂. 6. Feijão -de-Corda. I. Título.

CDD 581.8761

Esta tese foi apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese será permitido desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Roberto Cezar Lobo da Costa

TESE APROVADA EM : 12 de março de 1999

Dr. Joaquim ~~Albenisio~~ Gomes da Silveira
Depart^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Dr. Benildo ~~Sousa~~ Cavada
Depart^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr^a. Irenice ~~Maria~~ Santos Vieira
Depart^o de Química
Faculdade de Ciências Agrárias do
Pará
Conselheiro

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Depart^o de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr. Eduardo Caruso ~~Machado~~
Seção de Fisiologia Vegetal
Instituto Agrônomo de Campinas
Conselheiro

O trabalho e os estudos nos são proporcionados por DEUS, a fim de desenvolvermos a força vital que existe dentro de nós. As pessoas mais felizes são aquelas que conhecem a alegria de trabalhar e estudar. O trabalho e os estudos são os meios pelos quais o Homem, ao mesmo tempo que beneficia outras pessoas e o mundo, beneficia também a si mesmo, progredindo e experimentando uma imensa alegria em seu coração.

A DEUS

**EM ESPECIAL A MEUS PAIS:
JOSÉ CANDIDO FILHO E MARIA HELENA LOBO DA COSTA**

**À MINHA ESPOSA DALILA MARIA PINTO LOBO DA COSTA, PELA
CONFIANÇA, COMPREENSÃO, DEDICAÇÃO, COMPANHEIRISMO E APOIO
IRRESTRITO NAS HORAS MAIS DIFÍCEIS DESSE CURSO**

**AOS MEUS AMORES, MEUS FILHOS, A RAZÃO DE MINHA VIDA:
RODRIGO CORDOVIL PINTO LOBO DA COSTA E
REBECCA OHANA PINTO LOBO DA COSTA**

À MINHA SOGRA HELENA OHANA PINTO

**AOS MEUS IRMÃOS : CRISTINA NAZARÉ, JOSÉ RUBENS, MARIA DE FÁTIMA
E CLÁUDIA STELA**

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pela vida, força e amparo espiritual.

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pela valiosa orientação, confiança, apoio e principalmente pela **GRANDE AMIZADE**.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, pelas sugestões durante o decorrer deste trabalho, apoio nas horas difíceis e amizade.

Ao Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, pelas sugestões e apoio na execução da eletroforese de proteínas.

Aos Professores Dr^a. Irenice Maria dos Santos Vieira e Dr. Eduardo Caruso Machado, pelas críticas e sugestões.

Ao Dr. Juan J. Calvette, do Instituto de Biomedicina de Valência (Espanha), pela determinação da composição de aminoácidos totais.

A Prof^a Vânia Maria M. Melo, do Departamento de Biologia da UFC, pelo apoio na elaboração do meio de cultura para bactérias.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelos ensinamentos.

Aos amigos de todas as horas Adeildo Lima Rosa Jr., Vicente de Paulo Pinto e Dárlis Teixeira, pela amizade e agradável convivência.

Aos colegas Ricardo de Almeida Viégas, Antônio Roberto Barreto, Benedito Cardoso, Márcio Viana, José Gerardo Gomes Filho, Jeane Tavares Silva, Samara Góes e Sérgio Silva pela agradável convivência durante o curso.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Laboratório de Metabolismo e Fixação do Nitrogênio (LABFIX) e à Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por intermédio do Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos (PICDT), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA



ROBERTO CEZAR LOBO DA COSTA, filho de José Cândido Filho e Maria Helena Lobo da Costa, nasceu em Limoeiro do Norte, Estado do Ceará, no dia 22 de setembro de 1954.

Graduou-se em Ciências Biológicas (Biologia), em 1979, pela Universidade Federal do Pará (UFPA). Em março de 1980, ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), passando a fazer parte do quadro de professores do Departamento de Biologia Vegetal e Fitossanidade (DBVF).

Pós-graduou-se com o título de "Magister Scientiae" em Fisiologia Vegetal, em 1986, pela Universidade Federal de Viçosa-Minas Gerais, com a Tese : " EFEITO DE NÍVEIS DE ÁGUA E DE DOSES DE NITROGÊNIO SOBRE O CRESCIMENTO, MORFOLOGIA, PARTIÇÃO DE ASSIMILADOS E TROCA DE CO₂ EM *Phaseolus vulgaris* L."

Em março de 1995, iniciou o Curso de Doutorado em Bioquímica na Universidade Federal do Ceará (UFC).

SUMÁRIO

Conteúdo	Páginas
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	x
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xvi
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xvii
<u>RESUMO</u>	xviii
<u>ABSTRACT</u>	xxi
<u>1. INTRODUÇÃO GERAL</u>	1
1.1. <u>Identificação do Problema e Objetivos</u>	1
1.2 <u>Revisão de Literatura</u>	4
1.2.1 A Cultura do Feijão-de-Corda	4
1.2.2 O Déficit Hídrico	7
1.2.3 Utilização de Nitrogênio pelas Plantas	18
1.2.3.1 Fixação Simbiótica de N ₂	20
1.2.3.2 Assimilação e Metabolismo do Nitrato	33
1.2.3.3 Fixação do Nitrogênio e o Déficit Hídrico	47
1.2.3.4 Assimilação de Nitrato e o Déficit Hídrico	56
1.2.3.5 Prolina e o Déficit Hídrico	64
<u>2. CAPÍTULO 1</u>	
“CRESCIMENTO E AJUSTAMENTO OSMÓTICO DE PLANTAS NODULADAS DE	
FEIJÃO-DE-CORDA [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp) SUBMETIDAS AO	
DÉFICIT DE ÁGUA E À REIDRATAÇÃO”	
2.1 <u>INTRODUÇÃO</u>	74
2.2 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	77
2.2.1. <u>Condições do Experimento</u>	77
2.2.2. <u>Material e estirpe utilizada</u>	78
2.2.3. <u>Delineamento estatístico</u>	79

2.2.4. Condução das plantas	79
2.2.5. Coleta das plantas e determinação da massa seca.....	80
2.2.6. Determinação de umidade	81
2.2.7. Determinação de prolina livre	81
2.2.8. Determinação de aminoácidos livres	82
2.2.9. Determinação de ureídeos no caule	83
2.2.10. Determinação de clorofilas	84
2.2.11. Eletroforese	85
2.2.12. Determinação de aminoácidos totais	86
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87

3. CAPÍTULO 2

"ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] SUBMETIDAS AO DÉFICIT DE ÁGUA E À REIDRATAÇÃO"

3.1 INTRODUÇÃO	112
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	115
3.2.1. Condições do experimento	115
3.2.2. Material vegetal e estirpe utilizada	115
3.2.3. Delineamento estatístico	116
3.2.4. Condução das plantas	117
3.2.5. Coleta das plantas e determinação da massa seca.....	118
3.2.6. Determinação da atividade da redutase do nitrato.....	118
3.2.7. Determinação da atividade de glutamina sintetase.....	119
3.2.8. Determinação da concentração de proteínas	120
3.2.9. Determinação de NO ₃ ⁻	121
3.2.10. Determinação da concentração de leghemoglobina.....	122
3.2.11. Determinação de ureídeos na seiva do xilema	122
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	124

4. CAPÍTULO 3

"ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E AJUSTAMENTO OSMÓTICO EM DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp) NODULADAS, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITRATO E SUBMETIDAS AO DÉFICIT DE ÁGUA"

4.1 INTRODUÇÃO.....	142
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	146
4.2.1. Condições do Experimento	146
4.2.2. Material Vegetal e estirpe utilizada	147
4.2.3. Delineamento estatístico	149
4.2.4. Condução das plantas	149
4.2.5. Coleta das plantas e determinação da massa seca.....	151
4.2.6. Determinação de umidade	151
4.2.7. Determinação do C.R.A.	151
4.2.8. Determinação de prolina livre.....	152
4.2.9. Determinação de aminoácidos livres	153
4.2.10. Determinação de ureídeos em caules	154
4.2.11. Determinação de clorofilas	155
4.2.12. Determinação da atividade da redutase do nitrato.....	156
4.2.13. Determinação da atividade de glutamina sintetase.....	157
4.2.14. Determinação de proteínas	158
4.2.15. Determinação de NO ₃ ⁻	159
4.2.16. Determinação da concentração de leghemoglobina.....	159
4.2.17. Determinação de ureídeos na seiva do xilema	160
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	162
5. <u>CONCLUSÕES</u>	189
6. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	192

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Matéria seca total (A) e Relação parte aérea/raiz (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 90

Figura 2. Matéria seca de folhas (A) e matéria seca de caules (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 91

Figura 3. Matéria seca de raízes (A) e matéria seca de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 92

Figura 4. Número de folhas (A) e altura (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 93

Figura 5. Umidade de folhas (A) e umidade de caules (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 94

Figura 6. Umidade de raízes (A) e umidade de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 95

Figura 7. Concentração de clorofila *a* (A) e de clorofilas totais (B) em folhas de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. 96

Figura 8. Concentração de prolina nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4

dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

103

Figura 9. Concentração relativa de prolina (% do total de a.a livres) nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

104

Figura 10. Concentração de aminoácidos livres totais nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

105

Figura 11. Concentração de aminoácidos livres totais em caules (A) e concentração de ureídeos em caules (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

106

Figura 12. Concentração aminoácidos totais em folhas (A) e nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

107

Figura 13. Eletroforese em gel de poli(acrilamida), na presença de SDS e β -mercaptoetanol, da farinha de folhas de feijão-de-corda submetidas à desidratação e reidratação.

108

Figura 14. Eletroforese em gel de poli(acrilamida), na presença de SDS e β -mercaptoetanol, da farinha de nódulos de feijão-de-corda submetidas à desidratação e reidratação.

109

Figura 15. . Atividade *in vivo* de redutase de nitrato em discos de folhas (A) e em fatias de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. Os valores correspondentes a 100% de atividade do controle foram de 1,80 e 0,98 mmoles de NO_2^- / kg MF / hora, para folhas e nódulos, respectivamente.

134

Figura 16. . Concentração de nitrato em folhas (A) e raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

135

Figura 17. . Concentração de nitrato em caules de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

136

Figura 18. Atividade de glutamina sintetase em folhas, em relação à massa seca (A) e em relação a proteínas solúveis totais (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

137

Figura 19. Atividade de glutamina sintetase em nódulos, em relação à massa seca (A) e em relação a proteínas solúveis totais (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

138

Figura 20. Concentração de proteínas solúveis totais em folhas (A) e nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

139

Figura 21. Concentração de ureídeos da seiva do xilema (A) e de ureídeos da seiva do xilema após a reidratação (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

140

Figura 22. Concentração de leghemoglobina dos nódulos, em relação à massa seca (A) e em relação a proteínas solúveis totais (B), de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle

141

Figura 23. Matéria seca total (A) e Relação parte aérea/raiz (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na

presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 168

Figura 24. . Matéria seca de folhas (A) e de caules (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 169

Figura 25. . Matéria seca de raízes (A) e de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 170

Figura 26 Número de folhas (A) e altura das plantas (B) de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 171

Figura 27. Massa média de folhas (A) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7(V7), noduladas na presença (+N) e na ausência de NO_3^- (-N) e conteúdo relativo de água, em discos foliares, de plantas noduladas, na presença de 5 mM de NO_3^- (B), submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 172

Figura 28 Umidade de folhas (A) e umidade de caules (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 173

Figura 29 Umidade de raízes (A) e umidade de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 174

Figura 30. Concentração de clorofila a (A) e clorofilas totais (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 175

Figura 31. Concentração de prolina nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 176

Figura 32. Concentração relativa de prolina (% do total de a.a. livres) nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 177

Figura 33. Concentração aminoácidos livres totais nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 178

Figura 34 Concentração aminoácidos livres totais (A) e concentração de ureídeos (B) em caules de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 179

Figura 35 Atividade *in vivo* de redutase de nitrato em discos de folhas (A) e concentração de NO_3^- (B) em folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores correspondentes a 100% de atividade de RN do controle foram de 1,83 e 1,80 mmoles de $\text{NO}_2^-/\text{kgMF}/\text{hora}$, para Vita 3 e Vita 7, respectivamente. 183

Figura 36 Concentração de NO_3^- em caules (A) e em raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 184

Figura 37. Concentração de proteínas solúveis totais em folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. 185

Figura 38. Atividade de glutamina sintetase, na base de proteínas (A) e na base de massa seca (B) em folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

186

Figura 39. Atividade de glutamina sintetase (GS), em relação à massa seca (A) e proteínas solúveis totais (B) de nódulos de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

187

Figura 40 Concentração de leghemoglobina dos nódulos (A) e ureídeos da seiva do xilema (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

188

LISTA DE TABELAS

	Página
1 - Tabela 1. Composição da solução nutritiva utilizada para o cultivo das plantas de feijão-de-corda e das soluções estoque utilizadas no seu preparo.	78
2 - Tabela 2. Porcentagem de aminoácidos totais de farinha de folhas de plantas de feijão-de-corda submetidas a 4 dias consecutivos de estresse hídrico e reidratadas após esse período.	110
3 - Tabela 3. Porcentagem de aminoácidos totais de farinha de nódulos de plantas de feijão-de-corda submetidas a 4 dias consecutivos de estresse hídrico e reidratadas após esse período.	111

ACTES - Ácido 2-amino-3-carboximínico, 2-amino-3-hidroxi-5-norborneno

MHEDA - N-(3-hidroxi-2-norborneno)metil-2-amino-3-carboximínico

SDS - Dodecilsulfato de sódio

NF - massa

NS - massa

BGA - Albumina de galinha

CRA - caseína

ABA - Ácido ascórbico

TRIS - Hidróxido de trimetilamônio

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

YMB – Yeast medium broth (meio de cultura com levedura)

aRN – Atividade de redutase do nitrato

aGS – Atividade de glutamina sintetase

RUBISCO – Ribulose bifsosfato carboxilase/oxigenase

GS/GOGAT – Glutamina sintetase/glutamato sintase

Ψ_w - Potencial de água

HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperize-N'-2-etenosulfônico

NNEDA – N-1-naftiletlenodiamina dicloridrato

SDS – Dodecil sulfato de sódio

MF – massa fresca

MS – massa seca

BSA – Albumina sérica bovina

CRA – conteúdo relativo de água

ABA – Ácido abscísico

TRIS - Hidroximetilaminometano

RESUMO

A despeito da importância das leguminosas cultivadas no suprimento de proteínas vegetais para o homem e outros animais, a partir da reciclagem do N proveniente do N₂ da atmosfera, praticamente não existem trabalhos sobre a fisiologia da nutrição nitrogenada dessas leguminosas noduladas na presença de nitrato e sob condições de déficit hídrico. Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de esclarecer aspectos relacionados com alguns efeitos e mecanismos do estresse hídrico sobre a assimilação de nitrato e a fixação simbiótica de N₂, relacionado com mecanismos de ajustamento osmótico, em plantas noduladas de [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. Foram conduzidos três experimentos em condições de casa de vegetação, próximas daquelas naturais, no período de setembro à novembro, em Fortaleza, Ceará. As plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, foram inoculadas com a estirpe CB-756 de *Rhizobium* spp., na presença ou ausência de 5 mM de NO₃⁻, em vasos de Leonard modificados contendo uma mistura de sílica : vermiculita 1:2 (v/v) e irrigados com solução nutritiva por aspersão capilar. O estresse hídrico foi introduzido aos 28 dias após emergência (fase vegetativa, início do crescimento exponencial), através da suspensão da irrigação durante 4 (experimentos 1 e 2) ou 3 (experimento 3) dias consecutivos, seguido de reirrigação por dois dias, nos dois primeiros experimentos. Plantas noduladas de feijão-de-corda apresentaram boa adaptação ao déficit de água e excelente recuperação à reidratação. A integridade do aparelho fotossintético, em termos das concentrações de clorofilas, foi pouco alterada pelo estresse hídrico. Os nódulos e em menor intensidade as folhas foram as partes mais severamente afetadas pelo estresse hídrico. As folhas foram menos afetadas pelo estresse do que os nódulos em termos da manutenção do balanço proteínas/fitomassa. A adaptação ao déficit hídrico da cultivar Vita 7 foi mostrada pelo incremento no crescimento das raízes e reduções drásticas na acumulação de massa seca da parte aérea. As plantas de feijão-de-corda mostraram um intenso e rápido acúmulo de prolina livre, particularmente nas raízes, em resposta às pequenas reduções na disponibilidade hídrica, provavelmente como um mecanismo de ajustamento osmótico.

Imediatamente após a reidratação ocorreu um intenso decréscimo nas concentrações de prolina. As concentrações de aminoácidos livres totais e ureídeos foram aumentadas intensamente, em função do déficit de água, enquanto que a composição relativa e as concentrações dos aminoácidos totais nas folhas não sofreram alterações. A biossíntese de prolina nas folhas foi provavelmente relacionada com os aumentos na atividade de glutamina sintetase, induzidos pelo déficit hídrico. O processo de redução assimilatória de nitrato, mensurado através da atividade de redutase de nitrato (aRN) e acúmulo de nitrato nos tecidos, foi drasticamente reduzido, nas folhas, por efeito do estresse hídrico. Entretanto, as plantas estressadas exibiram uma recuperação intensa na atividade da redutase do nitrato e promoveram intensa redução nas concentrações de NO_3^- em raízes, caules e folhas, decorridas 24 horas após a reidratação. Ao contrário, a atividade da redutase do nitrato nos nódulos não foi afetada pelo estresse, sugerindo o predomínio da enzima do tipo constitutiva nesses tecidos, em relação ao tipo induzível pelo nitrato, predominante nas folhas. O processo de fixação simbiótica de N_2 , avaliado a partir do crescimento dos nódulos, atividade de glutamina sintetase, concentrações de leghemoglobina e de ureídeos na seiva do xilema, também foi intensamente reduzido pelo déficit hídrico. O decréscimo assim como a recuperação desse processo, foi mais lento que o da atividade da redutase do nitrato nas folhas e mobilização de nitrato das raízes, reforçando a idéia de que os nódulos foram mais profundamente alterados que as folhas em termos de integridade das proteínas, quando as plantas noduladas foram submetidas à seca/reidratação. As cultivares Vita 3 e Vita 7, quando noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- , apresentaram a mesma intensidade de crescimento e distribuição da fitomassa. O estresse hídrico provocou reduções mais acentuadas no acúmulo de massa seca das folhas da cultivar Vita 3. Por outro lado, Vita 7 apresentou maior crescimento nas raízes, nessas condições. Essa última cultivar exibiu maior concentração de prolina livre nas raízes enquanto que Vita 3 mostrou maior acumulação de aminoácidos livres nas raízes, evidenciando diferentes estratégias de ajustamento osmótico entre as duas cultivares submetidas ao estresse hídrico. A cultivar Vita 3, quando nodulada na ausência de nitrato, apresentou maior produção de fitomassa total, em relação à Vita 7. Entretanto, a primeira cultivar foi mais sensível ao déficit hídrico. A maior sensibilidade de Vita 3,

nessas condições, foi a partir das drásticas alterações na morfologia das folhas, que apresentaram um aumento intenso no tamanho médio dos folíolos, em relação a essa mesma cultivar nodulada na presença de nitrato. A maior sensibilidade de Vita 3, nodulada na ausência de nitrato, foi, ainda, inferida pelos decréscimos na acumulação de prolina nas folhas. Por outro lado, Vita 7 mostrou intensa redução no acúmulo de prolina em folhas e raízes, em relação às plantas noduladas na presença de nitrato, quando ambas foram submetidas ao déficit hídrico. As duas cultivares mostraram semelhantes aumentos nas concentrações de ureídeos no caule por efeito desse tratamento. Na presença de 5 mM de NO_3^- as cultivares Vita 3 e Vita 7 apresentaram semelhanças na assimilação de nitrato (atividade da redutase do nitrato e acúmulo de nitrato) e nos parâmetros relacionados com a fixação de N_2 (concentração de leghemoglobina, atividade de glutamina sintetase nos nódulos e concentração de ureídeos na seiva do xilema), tanto na condição normal como na presença de déficit hídrico. A atividade específica de glutamina sintetase nas folhas foi ligeiramente aumentada pelo estresse hídrico nas duas cultivares. A cultivar Vita 3, nodulada na ausência de nitrato, apresentou maior fixação simbiótica de N_2 , em relação à presença de nitrato e também em relação à Vita 7 nodulada na ausência de nitrato. A maior fixação foi inferida a partir de um maior crescimento dos nódulos, maior concentração de leghemoglobina e maiores fluxos de ureídeos na seiva do xilema. O estresse afetou de maneira semelhante as duas cultivares em termos desses parâmetros relacionados com a fixação de N_2 . Os resultados mostraram que os dois processos de assimilação de N (redução assimilatória de NO_3^- e fixação e assimilação de N_2) foram intensamente sensíveis ao déficit de água, sendo que a recuperação na atividade dos nódulos foi mais lenta do que a das folhas, provavelmente devido a maior degradação de proteínas. As plantas de feijão-de-corda mostraram capacidade de ajustamento osmótico através da acumulação de prolina, principalmente nas raízes. A presença de nitrato favoreceu a adaptação das plantas noduladas às condições de déficit hídrico.

ABSTRACT

Despite the great importance of crop legumes in providing proteins to animals and men through atmospheric nitrogen recycling there is few works dealing with the physiology and biochemistry of nodulated plants in presence of nitrate and under water deficit. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] nodulated plants, cv. Vita 3 and Vita 7, inoculated with *Bradyrhizobium sp.*, CB-756 strain, in presence or absence of 5 mM NO₃⁻, were grown under greenhouse conditions in modified Leonard jars containing a 1:2 silica:vermiculite substrate and watered with a nutrient solution. The water stress, initiated at 28 days after emergence (DAE), was imposed by withholding water for four (experiments 1 and 2) or three (experiment 3) subsequent days followed by rehydration during two days in the case of experiments 1 and 2. Under these conditions the nodulated plants showed a good adaptation to the water deficit and an excellent recuperation after rehydration. In addition, the photosynthetic apparatus seemed to be not affected, based on chlorophyll concentrations. Under water stress nodules and leaves were more seriously affected although leaves suffered less as measured by the balance between protein/mass. The stress tolerance of Vita 7 was recognized by root growth and drastic reduction of dry mass accumulation in the plant shoot. Cowpea plants showed intense and fast accumulation of free proline, particularly in roots, in response to a mild reduction in available water, probably as an osmotic adjustment. Soon after rehydration there was an abrupt decrease in proline concentration. The free amino acid and ureide concentrations increased intensively with the water deficit, whereas the relative composition and concentration of total amino acids stayed unaltered. Leaf proline biosynthesis was likely to be related to the increase in the glutamine synthetase (GS) activity induced by water deficit. The nitrate reduction process in leaves, measured through nitrate reductase activity and nitrate accumulation in plant tissues, was drastically reduced. However, 24 hours after rehydration, the stressed plants recovered their nitrate reductase activity very quickly and showed a significant fall in the nitrate concentrations in the root, stem and leaf. Contrary, nodule nitrate

reductase activity was not affected during the water deficit which suggests the predominance of a constitutive isoform in this tissue in comparison with the enzyme present in leaves inducible by nitrate. The symbiotic fixation of nitrogen was greatly reduced under water deficit as evaluated by nodule growth, glutamine synthetase activity, leghemoglobin, and ureide concentrations into xylem sap. This reduction as well as its recovering from water deficit was slower than recovery of leaf nitrate reductase activity and nitrate mobilization in the roots suggesting that nodules are more affected than leaves regarding to protein integrity when the plants were subjected to water deficit followed by rehydration. Nodulated Vita 3 and Vita 7 cultivars, when in presence of 5 mM NO_3^- , showed the same intensity of growth and dry matter distribution. The water deficit induced in Vita 3 a more conspicuous decrease in leaf dry matter. Vita 7 accumulated free proline mainly in the roots while Vita 3 accumulated free amino acids suggesting that they use different strategies of osmotic adjustment when submitted to water deficit. Nodulated Vita 3 in absence of nitrate produced higher amount of total dry matter than Vita 7. In this condition, Vita 3 was, apparently, more sensitive to the water shortage since its leaves had morphological alterations characterized by an abnormal enlargement and leaf proline accumulation diminished in comparison with the same cultivar in presence of nitrate. Nodulated Vita 7 in absence of nitrate showed a decline in proline accumulation, both in leaves and roots, in contrast with stressed Vita 7 plants in presence of nitrate. Both Vita 3 and Vita 7 cultivars showed similar accumulation of ureides in stem under drought conditions. In presence of 5mM nitrate, irrespective if under water stress or not, both cultivars showed similarities among N assimilation (nitrate reductase activity and nitrate accumulation) and in the parameters related to N_2 fixation (leghemoglobin concentration, nodule glutamine synthetase activity, and ureide concentration in the xylem sap). The specific activity of leaf glutamine synthetase was slightly higher in both cultivars under water stress. Nodulated Vita 3, in absence of nitrate, showed a better N_2 fixation rate in relation to the presence of nitrate and also in comparison with nodulated Vita 7 in absence of nitrate. This higher N_2 fixation capacity was based on a better nodule growth, higher leghemoglobin and ureide concentrations, and higher flux of ureide into xylem sap. Overall the results showed that the two N_2 assimilation processes (assimilatory

reduction of NO_3^- and N_2 fixation and NH_3 assimilation) were highly sensitive to the water stress in Vita 3 and Vita 7 and that the nodule recovering was slower than in the leaves probably owing to a higher protein degradation rate. The cowpea plants were able to evolve an osmotic adjustment through proline accumulation, particularly in the roots. Furthermore the presence of nitrate contributed positively for the adjustment of the nodulated plants under water deficit conditions.

1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Identificação do Problema e Objetivos

A cultura do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] representa a principal fonte de proteínas de origem vegetal para a população do norte e nordeste do Brasil. A utilização dessa espécie de feijão pela população de baixa renda pode representar, na realidade, a sua principal fonte alimentar. Apesar de sua enorme importância sócio-econômica, observa-se que sua produtividade na região do semi-árido brasileiro alcança valores pouco significativos, em termos do potencial genético-fisiológico dessa leguminosa. Assim, conforme dados do IBGE de 1995, algumas regiões produtoras do Ceará obtiveram produções menores que 200 kg/ha !

Por outro lado, sob condições de irrigação, nas mesmas áreas do semi-árido, as atuais cultivares utilizadas podem alcançar produções próximas de 1.700 kg/ha. É interessante observar que em outras regiões do mundo, como no Vale Central da Califórnia (E.U.A), já alcançaram-se produções de até 4.000 kg/ha. Na realidade, a produtividade do feijão-de-corda em outros países tem aumentado, enquanto que no Brasil ela tem diminuído nos últimos anos. Apesar dessa cultura apresentar excelentes características de tolerância para as condições estressantes de deficiência hídrica e temperaturas elevadas, tem-se observado que as atuais cultivares difundidas, associadas ao baixo nível tecnológico e a grande escassez de água, tem levado aqueles baixos níveis de produtividade dessa leguminosa.

Apesar da existência de um número razoável de trabalhos publicados a respeito do comportamento fisiológico dessa leguminosa frente ao déficit de água, observa-se que os mesmos concentram-se nos aspectos da produção de grãos, crescimento, análise da produção biológica e alguns envolvendo as relações hídricas da planta. Entretanto, ao nível molecular, existe uma carência de estudos publicados tanto para essa espécie como para as leguminosas em geral, em termos dos mecanismos bioquímicos relacionados com os efeitos do déficit de água e com a tolerância diferencial aos estresses. A compreensão desses mecanismos poderão, no

futuro, contribuir para o melhoramento genético dessa e de outras culturas, principalmente através da engenharia genética ou biotecnologia.

Os dois fatores do ambiente que comumente limitam a produtividade agrícola e que podem ser alterados facilmente pelo homem são a disponibilidade de água e de nitrogênio no solo. As culturas de leguminosas são as únicas capazes de utilizarem, como fonte de N, de forma isolada ou simultânea, o nitrato do solo ou fertilizante e o N_2 através de simbiose com bactérias do tipo rhizóbio. O feijão-de-corda, neste contexto, caracteriza-se por apresentar excelente capacidade de nodulação e fixação de N_2 com um largo espectro de estirpes nativas dos solos. Infelizmente, muito pouco é conhecido sobre as interações rhizóbio-leguminosa sob condições de déficit de água. Além do mais, a intensidade da variabilidade genética dos pares simbiontes sob condições de estresse é também muito pouco conhecida.

Apesar da capacidade de utilização simultânea de NO_3^- e N_2 pelas leguminosas em geral, é conhecida, já há bastante tempo, a ocorrência de um forte efeito inibitório do nitrato sobre a nodulação e a fixação de N_2 . Os mecanismos bioquímicos dessa inibição são ainda desconhecidos, apesar de algumas especulações na literatura. Por outro lado, baixos níveis de nitrato no solo são favoráveis para o crescimento inicial da planta nodulada, enquanto que algumas cultivares noduladas podem responder positivamente à aplicação de nitrato na fase de enchimento das vagens, possivelmente como uma fonte adicional de N. É interessante observar que existe uma grande variabilidade genética entre os simbiontes para tolerância aos níveis de nitrato no solo, em termos de capacidade de nodulação e eficiência de fixação de N_2 .

O processo global de assimilação de nitrogênio pode ser caracterizado como o conjunto de transformações bioquímicas que levam as formas de N-inorgânico (NO_3^- , NH_4^+ , N_2) até aminoácidos. A redução de NO_3^- até NH_3 , através das enzimas redutase de nitrato (E.C.1.6.6.1) e redutase de nitrito (E.C.1.6.6.4), é extremamente dependente do potencial de água dos tecidos. Na realidade, redutase de nitrato é uma das enzimas mais sensíveis ao déficit de água nas plantas superiores. Por outro

lado, apesar da escassez de pesquisas sobre os efeitos do estresse hídrico sobre o processo de fixação de N_2 , trabalhos com soja nodulada tem mostrado que a disponibilidade de água afetou muito mais intensamente a fixação de nitrogênio do que a taxa de fotossíntese. Entretanto, nada se conhece sobre qual (is) passo (s) bioquímicos da redução de N_2 e assimilação de NH_3 nos nódulos são mais afetados pelo déficit de água.

Em condições de campo, portanto, o feijão-de-corda poderá utilizar simultaneamente NO_3^- e N_2 como fontes de nitrogênio. Qual das duas vias de assimilação de N será mais sensível ao déficit de água? Qual a importância relativa da assimilação de N na sensibilidade (ou tolerância) ao déficit de água, em termos de reflexos na redução do crescimento? Qual a importância do NO_3^- como fonte suplementar de N e como precursor para o ajustamento osmótico? Quais relações existem entre assimilação de N e o ajustamento osmótico de leguminosas noduladas submetidas ao déficit de água?

O presente trabalho foi realizado visando responder aos questionamentos anteriores, assim como contribuir para um conhecimento mais amplo a respeito da fisiologia de plantas cultivadas submetidas ao estresse hídrico.

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1. A cultura do feijão-de-corda

O feijão caupi ou feijão-de-corda ou feijão macassar ou feijão-da-colônia ou feijão-de-praia [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], é uma leguminosa dicotiledônea comestível, dotada de alto conteúdo protéico, boa capacidade de fixação de nitrogênio, sendo ainda, pouco exigente em fertilidade de solo. Além disso, a cultura apresenta tolerância excelente para as condições de baixa disponibilidade de água nos solos e altas temperaturas, características da região semi-árida. Trata-se de alimento básico para a população, e representa o principal cultivo na maioria dos municípios das regiões Norte e Nordeste do Brasil, constituindo a principal fonte de proteínas de origem vegetal nessas regiões, sendo também amplamente distribuído no mundo (ARAÚJO & WATT, 1988).

O feijão-de-corda é uma leguminosa que pertence à família *Leguminosae*, tribo *Phaseolae*, subtribo *Phaseolinae* e ao gênero *Vigna*. Colocada em sua primeira classificação botânica como pertencente ao gênero *Phaseolus* ou *Dolichos*, hoje, é classificada e aceita mundialmente como *Vigna*. (FREIRE-FILHO, 1988). Esse gênero foi dividido em 7 subgêneros, consistindo de várias espécies e, dentre elas, está a *Vigna unguiculata*, amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais como formas selvagens e cultivadas (MARÉCHAL *et al.*, 1988). A sua origem está ligada, provavelmente, ao continente africano, encontrando, no Brasil, boas condições de clima e solo para a sua adaptação.

Tendo como hábitat as regiões de clima quente (úmida ou semi-árida), o feijão-de-corda é cultivado predominantemente nas regiões Norte e Nordeste do País. Estas regiões, com características edafoclimáticas distintas – o Norte, bastante úmido e quente e coberto pela floresta; e o Nordeste, com o semi-árido e o sertão – enquadram-se na faixa de temperatura ideal para o cultivo do feijão-de-corda (18 °C – 34 °C) (NG & MARÉCHAL, 1985). Atualmente, o gênero *Vigna* é composto por 160

espécies, a maioria de origem africana, com apenas seis espécies cultivadas, destacando-se cinco subespécies dentro da espécie *Vigna unguiculata*: *unguiculata*, *cylindrica*, *sesquipedalis*, *dekintiana* e *menensis* (STEELE & MEHERA, 1980). O feijão-de-corda foi introduzido no Brasil no século XVII por colonizadores portugueses e espanhóis, bem como por escravos africanos (FREIRE-FILHO *et al.*, 1982).

O feijão-de-corda é amplamente cultivado pelo pequeno produtor das regiões mais pobres do Brasil e tem sido crescente a sua comercialização, embora requeira, ainda, maior incremento. Dadas as grandes qualidades do feijão-de-corda, em termos nutricionais superiores aos feijões comuns (*Phaseolus* spp.), e o seu relativamente baixo custo de produção (ARAUJO & WATT, 1988), parece relevante aumentar a produção, comercialização e difusão do feijão-de-corda, não só para o Norte e Nordeste, mas também para as demais regiões do País, que possuem uma população com sérias carências protéicas e alimentares. Portanto, a importância do feijão-de-corda para o Brasil, e, em particular, para o Norte e Nordeste – onde a sua produção está melhor adaptada –, não se restringe, apenas, aos aspectos propriamente sociais, por ser alimento básico rico em proteínas (PINTO, 1998), e por estar ligado aos pequenos agricultores, mas envolve, potencialmente, um leque maior de aspectos econômicos como, por exemplo, uma integração do processo produtivo, como tal, ao complexo agroindustrial.

O feijão-de-corda é cultivado para produção de grãos secos, grãos verdes e vagens, para a alimentação humana e também na produção de ramos e folhas, para a alimentação de animais (STEELE & MEHERA, 1980; OLIVEIRA & CARVALHO, 1988). Pela sua rusticidade, capacidade de se desenvolver bem em solos de baixa fertilidade e sua habilidade de fixar nitrogênio, o feijão-de-corda pode ser utilizado como adubo verde na recuperação de solos naturalmente pobres em nutrientes ou esgotados pelo uso intensivo (BRESSANI & ELIAS, 1980; OLIVEIRA & CARVALHO, 1988 e UZOGARA & OFUYA, 1992). Os modernos centros de produção de sementes secas do feijão-de-corda são o Oeste da África (Nigéria), Índia e Brasil (STEELE & MEHERA, 1980).

No Brasil, dados recentes mostram uma produção de feijão-de-corda de 750.000 toneladas por ano, predominando nas Regiões Norte e Nordeste. Nos Estados do Amazonas, Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte o cultivo do feijão-de-corda representa de 95 a 100% do total das áreas plantadas com feijão (IBGE, 1995). O resultado da nossa baixa produção agrícola é o aumento das importações de alimentos e, conseqüentemente, transferência de divisas para o exterior. De 1990 a 1995, a importação de 0,76 milhões de toneladas de feijão foi responsável por 13,2% do déficit da balança comercial (CUNHA, 1997). No caso específico do feijão, a produção permanece praticamente estagnada ao longo dos últimos 35 anos e o rendimento médio que era de 656 kg/ha na década de 60, caiu para 514 Kg/ha na década de 70, 444 Kg/ha na década de 80 e 556 Ka/ha nos anos 90, contrastando com o crescente aumento de produtividade obtido por grandes centros produtores como Argentina e China (1.000 Ka/ha) e Japão e Estados Unidos (1.700 Ka/ha).

Nos países emergentes, como o Brasil, o consumo de proteínas de origem vegetal chega a 78,8%, tornando-se fonte principal ou, em alguns casos, fonte suplementar das proteínas da dieta (SINGH & SINGH, 1992). Na região Nordeste brasileira, o consumo de feijão-de-corda nas áreas urbanas corresponde a 41% dos feijões em geral, enquanto que nas áreas rurais, onde a qualidade do feijão é melhor, a proporção sobe para 57%. A quantidade de feijão consumida por populações rurais representa mais do que o dobro de algumas áreas urbanas. A única área metropolitana que apresentou valores comparáveis às áreas rurais, foi o município de Fortaleza, onde o feijão-de-corda consumido representou 71,9% do feijão total (IBGE, 1995). O Ceará é o maior produtor brasileiro, sendo responsável por 20% da produção total do País (TEIXEIRA *et al.*, 1988).

A despeito do grande potencial genético-fisiológico do feijão-de-corda para obtenção de produtividades elevadas, observa-se, principalmente na região do semi-árido brasileiro, produções incompatíveis com as necessidades e potencialidades da cultura. Como exemplo, a produtividade obtida no município de Crateús-Ceará, na safra de 1995, foi de apenas 197 kg/ha (PINTO, 1998), enquanto que a maior

produtividade do Estado foi 570 kg/ha, no baixo Jaguaribe. Entretanto, na região do Vale Central da Califórnia, nos EUA, sob condições de irrigação, foram obtidos rendimentos de até 4.000 kg/ha (TURK & HALL, 1980 a).

Os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade de feijão-de-corda na região do semi-árido são o baixo nível tecnológico utilizado (sementes não melhoradas geneticamente, preparo e correção dos solos etc), associado com as condições ambientais desfavoráveis, tais como baixa disponibilidade de água no solo, temperaturas elevadas e presença de salinidade nos solos (ARAÚJO & WATT, 1988). É possível que a ocorrência de temperaturas noturnas elevadas também contribua para a diminuição da produtividade, devido causar esterilidade e abscisão das flores (WARRAG & HALL, 1984). Apesar do feijão-de-corda ser bastante tolerante às condições de seca e de altas temperaturas, principalmente durante sua fase vegetativa, observa-se que a cultura é muito mais sensível a esses estresses durante a fase reprodutiva (TURK & HALL, 1980b).

Vigna unguiculata apresenta uma boa capacidade de nodulação com um largo espectro de estirpes de rhizóbio, tanto aquelas nativas do solo, como sob inoculação artificial, inclusive nas condições do semi-árido (STAMFORD *et al.*, 1988). Entretanto, poucos são os trabalhos da literatura, tanto nacional como estrangeira, que avaliaram os efeitos e os mecanismos da seca sobre os processos envolvidos com a fixação simbiótica de N_2 (sobrevivência do rhizóbio e infecção, nodulação, crescimento e desenvolvimento dos nódulos e mecanismos bioquímico-fisiológicos do processo global) (SPRENT, 1981; GUERIN *et al.*, 1990). Por outro lado, essa leguminosa apresenta boas potencialidades para a utilização simultânea de N_2 e de NO_3^- do solo (baixas concentrações), apesar do antagonismo existentes entre essas duas fontes de N (SILVEIRA *et al.*, 1998 a).

1.2.2 O déficit hídrico

A seca é definida como um prolongado período sem água. Para um período de seca afetar uma comunidade de plantas, o déficit de chuva deve levar a um déficit hídrico do solo e por último, a um déficit hídrico da planta (LEVITT, 1980). O grau no

qual deficiência de chuva provoca um déficit de água no solo depende da taxa de evaporação durante o período sem chuva, das características físicas e químicas do solo e da umidade relativa da atmosfera. Entretanto, depende, de outra forma, de um número de características das plantas que influenciam a absorção de água, a taxa de transpiração e suas respostas à falta de água. É o grau no qual a planta pode suportar a falta de chuva que caracteriza sua resistência à seca (PALEG & ASPINALL, 1981; HANSON & HITZ, 1982; SCHULZE, 1986). Dentre os mecanismos de resistência à seca, existem vários tipos que capacitam as plantas a resistir a seca, conforme mostrados nas revisões de TURNER (1979) e JONES *et al.*(1981).

O esquema a seguir (SALISBURY & ROSS, 1992) demonstra a seqüência de eventos que ocorrem em relação ao desenvolvimento do estresse hídrico. É importante perceber que os últimos eventos são quase que indubitavelmente respostas a um ou mais dos primeiros eventos, mais do que até mesmo do estresse hídrico. O crescimento celular parece ser a resposta mais sensível ao estresse hídrico. Diminuindo-se o potencial de água de somente $-0,1$ Mpa (às vezes menos) resulta no decréscimo perceptível do crescimento celular (irreversível alongamento celular) e assim redução no crescimento da raiz e da parte aérea (SAKURAI & KURAISHI, 1988). HSIAO (1973), sugere que esta sensibilidade é responsável pela observação de que muitas plantas crescem principalmente à noite, quando o estresse hídrico é menor. A inibição da expansão celular é comumente seguida por uma redução na síntese de parede celular (SALISBURY & ROSS, 1992).

A síntese de proteína pode ser quase igualmente sensível ao estresse hídrico (NOBEL, 1992). Estas respostas são observadas somente em tecidos que estão normalmente crescendo rapidamente (sintetizando os polissacarídeos da parede celular e proteínas, bem como se expandindo). Os efeitos sobre a síntese de proteínas ocorrem aparentemente, sobre a atividade do ribossoma (CARPITA, 1992). Em potenciais um pouco mais negativos, a formação de protoclorofila é inibida, embora esta observação seja baseada em poucos estudos (NOBEL, 1992). Muitos estudos indicam que a atividade de certas enzimas, especialmente redutase de nitrato (SHANER & BOYER, 1976 *a*, *b*; SINHA & NICHOLAS, 1981), fenilalanina

amônia liase (PAL) e algumas outras, decrescem prontamente quando o estresse hídrico aumenta (SALISBURY & ROSS, 1992). Poucas enzimas tais como α -amilase e ribonucleases, mostraram aumento de atividade (NOBEL, 1992).

SENSIBILIDADE GENERALIZADA AO ESTRESSE HÍDRICO DE PARÂMETROS OU PROCESSOS DE PLANTAS				
Parâmetros ou Processos Afetados	SENSIBILIDADE AO ESTRESSE			Observações
	MUITO SENSÍVEL	RELATIVAMENTE INSENSÍVEL		
	Potencial do Tecido Exigido para o Processo Afetado			
	0 MPa	-1.0 MPa	-2.0 MPa	
Crescimento celular	—————			Tecido em crescimento rápido
Síntese de parede	—————			Tecido em crescimento rápido
Síntese de proteína	—————			Folhas estioladas
Formação de protoclorofila	—————			
Nível de Redutase de Nitrato	—————			
Acumulação de ABA	-----	—————		
Nível de citocinina		—————		
Abertura estomática	-----	-----	-----	Depende da espécie
Assimilação de CO ₂	-----	-----	-----	Depende da espécie
Respiração		-----		
Acumulação de prolina		-----		
Acumulação de açúcar		—————		

Extraído e adaptada de SALISBURY & ROSS (1992).

Pensou-se que tais enzimas hidrolíticas poderiam quebrar amido e outros materiais para tornar o potencial osmótico mais negativo, desse modo resistindo à seca (ajustamento osmótico) (MORGAN, 1984), mas estudos cuidadosos nem sempre sustentam essa idéia. A fixação e a redução do nitrato também decrescem com o estresse hídrico, uma descoberta que é consistente com a queda observada na atividade da redutase de nitrato (FOYER *et al.*, 1998). Em níveis de estresse que causam mudanças observáveis nas atividades das enzimas, a divisão celular também é inibida e os estômatos começam a fechar, levando a uma redução na transpiração e fotossíntese (SHANER & BOYER, 1976; NICHOLAS & SINHA, 1981; KAISER, 1987).

Tem havido muitas controvérsias se a queda comumente observada na fotossíntese em resposta ao estresse moderado é causada pelo fechamento dos

estômatos ou mais diretamente pelo estresse hídrico *per se* (KAISER, 1987). Cálculos mostraram altas concentrações de CO₂ interno sob estresse hídrico moderado, sugerem que a própria fotossíntese é inibida. Contudo, há evidências sugerindo que as baixas taxas de transpiração podem levar ao decréscimo da fotossíntese (BUNCE, 1988). Medições das respostas de várias enzimas fotossintéticas ao estresse hídrico também sugerem um efeito direto do estresse hídrico (VU & YELENOSKY, 1988).

Mais ou menos no mesmo nível de estresse que esclarece os efeitos sobre enzimas, a concentração de ácido abscísico (ABA) começa a aumentar rapidamente em tecidos de folhas e, em uma menor escala, em outros tecidos, incluindo a raiz (BRADFORD & HSIAO, 1982; SALISBURY & MARINOS, 1985; SALISBURY & ROSS, 1992; GOMES *et al.*, 1997). Isto leva ao fechamento dos estômatos e redução da transpiração (SALISBURY & ROSS, 1992; BRAY, 1993). Em conseqüência, o ABA parece inibir o crescimento da parte aérea, promovendo o crescimento da raiz, o que poderia aumentar o suprimento de água para a planta. Há também evidências de que concentrações baixas de ABA aumentam a taxa de condutância de água através das raízes, o que reduziria o estresse hídrico na parte aérea. Muitas dessas adaptações envolvendo o ABA são melhor observadas em mesófitas. As xerófitas sempre têm outras adaptações (KRIEDEMANN & LOVEYS, 1974).

O etileno também parece ter um papel nas reações de estresse. Ele aparece em resposta a vários fatores de estresse, incluindo excesso de água (JACKSON, 1985), patógenos de plantas, poluição do ar, corte de raiz, transplante, movimentos vegetais e talvez, a seca (TIETZ & TIETZ, 1982). Embora estresses sejam relativamente suave em $\Psi_w = -0,3$ a $-0,8$ MPa, interações e respostas indiretas, começam a ser regra. O decréscimo de citocininas em folhas de algumas espécies diz respeito a esses níveis. Em potenciais um pouco mais negativos, o aminoácido prolina começa a aumentar rapidamente, algumas vezes elevando-se a níveis de 1% da matéria seca do tecido (PALEG & ASPINALL, 1981). Aumentos de 10 a 100 vezes são comuns. Dependendo da espécie, outros aminoácidos e amidas, especialmente betaina, também se acumulam quando o estresse é prolongado. A prolina é sintetizada *de novo* a partir do ácido glutâmico e, provavelmente, a partir de

carboidratos, em último caso (PALEG & ASPINALL, 1981). Estes compostos, possivelmente, contribuem para o ajustamento osmótico.

Em níveis mais elevados de estresse ($\Psi_w = -1,0$ a $-2,0$ MPa) a respiração, a translocação de assimilados e a assimilação de CO_2 caem a níveis próximos de zero. A atividade de enzimas hidrolíticas aumenta consideravelmente e o transporte de íons pode ser diminuído. Na verdade, em várias espécies, a respiração muitas vezes aumenta, não diminuindo até que estresses hídricos de $-5,0$ MPa sejam atingidos. As plantas normalmente recuperam-se se reirrigadas, quando o estresse está entre $-1,0$ a $-2,0$ MPa, significando que, ao invés da severidade do estresse hídrico, a resposta ao estresse é elástica ou, no mínimo, levemente elástica, porque o crescimento e a fotossíntese de folhas jovens frequentemente não alcançam as taxas originais por vários dias e as folhas velhas caem, porque o crescimento é especialmente sensível ao estresse hídrico. As células são menores e as folhas desenvolvem-se menos durante o estresse hídrico, resultando na reduzida área para a fotossíntese. Além disso, as plantas podem ser especialmente sensíveis mesmo a seca moderada durante certos estágios do desenvolvimento. Por último, no sentido de produção final, as respostas ao estresse são realmente plásticas, mesmo com estresse hídrico moderado (SALISBURY & ROSS, 1992).

Embora a área da folha seja importante, porque a fotossíntese é usualmente proporcional a ela, a expansão rápida da folha poderá adversamente afetar a disponibilidade da água. Se ocorre precipitação somente durante o inverno e a primavera e os verões são secos, as plantas jovens, na primavera terão ampla umidade de solo, e o estresse aumenta rapidamente no verão. O crescimento prematuramente acelerado pode resultar em folhas com grandes áreas levando a uma rápida e prematura diminuição da água na planta, agravada pela baixa umidade do solo para que a planta complete seu ciclo de vida. Nesta situação, somente as plantas que retêm alguma água para reprodução ou que completarem o ciclo de vida mais rapidamente, antes do início da seca (fuga da seca) é que produzirão sementes para a próxima geração (TAIZ & ZEIGER, 1991).

As respostas mais rápidas ao estresse hídrico devido à desidratação parecem ser por intervenção de eventos biofísicos, mais do que por mudanças nas reações químicas. Uma vez que o conteúdo de água da planta diminui, as células se contraem e suas paredes retraem (TAIZ & ZEIGER, 1991). Esta diminuição no volume da célula resulta em pressão hidrostática mais baixa ou perda da turgescência. Como a perda de água aumenta e as células se contraem mais, as substâncias dissolvidas nas células tornam-se mais concentradas. A membrana se torna mais densa e mais comprimida, já que ela cobre uma área menor do que antes. Pelo fato de ser a perda da turgescência o primeiro efeito biofísico significativo do estresse da água, podemos esperar que as atividades dependentes de turgescência sejam as mais sensíveis aos déficits da água. A expansão da célula é um processo dependente de turgescência (TAIZ & ZEIGER, 1991) e é extremamente sensível ao déficit de água.

A área total da folha de uma planta não permanece constante depois que todas as folhas tiverem amadurecido. Se a planta tornar-se estressada por escassez de água, depois que uma área substancial da folha estiver desenvolvida, as folhas envelhecerão e cairão (abscisão) (TAIZ & ZEIGER, 1991). Este ajustamento da área da folha é uma mudança importante a longo prazo, que melhora a adaptabilidade da planta para um meio ambiente com restrição de água. Na verdade, muitas plantas decíduas de deserto, durante a seca, dependem de uma versão extrema da reação ao estresse, desfolhando-se totalmente durante a seca e lançando novas folhas após as chuvas. Este ciclo pode ocorrer duas ou mais vezes em uma simples temporada. O processo de abscisão durante o estresse da água resulta do aumento, em grande escala da síntese e da reação ao etileno, hormônio endógeno da planta (TAIZ & ZEIGER, 1991).

Os déficits mais fracos de água também afetam o desenvolvimento do sistema da raiz. A relação raiz/parte aérea parece ser comandada por um equilíbrio funcional entre a absorção de água pela raiz e a fotossíntese da parte aérea. Embora a relação raiz/parte aérea dependa de processos complexos de desenvolvimento e nutrição, o conceito de equilíbrio funcional poderá ser simplesmente assim enunciado: Uma raiz

crescerá até ficar tão grande que a absorção de água pela raiz limitará um maior crescimento; ou o reverso, as raízes crescerão até que sua demanda pelo fotossintato da parte aérea iguale o suprimento. Este equilíbrio funcional será alterado, se o suprimento de água diminuir. Quando a absorção da água é cortada, o processo de expansão da folha é afetado muito cedo, porém a atividade fotossintética é muito menos afetada (TAIZ & ZEIGER, 1991).

A inibição da expansão da folha reduz o consumo de carbono e energia, e uma maior proporção dos assimilados da planta poderá ser distribuída ao sistema radicular, onde poderão suportar um crescimento maior. Ao mesmo tempo, os ápices da raiz num solo seco perdem turgescência e o próprio solo que vai secando apresenta cada vez mais uma estrutura rígida. Todos esses fatores levam o crescimento da raiz para zonas de solo que permanecem úmidas (TAIZ & ZEIGER, 1991). Quando o início do estresse é mais rápido ou a planta atinge sua área total da folha antes do início do estresse, há outras reações que protegem a planta contra a desidratação. Sob tais condições, os estômatos fecham para reduzir a evaporação da área da folha existente. O fechamento do estômato pode ser considerado uma terceira linha de defesa contra a seca. A absorção e a perda de água nas células guardas modificam sua turgescência e controlam a abertura e o fechamento estomático (TAIZ & ZEIGER, 1991).

Uma redução no conteúdo de soluto das células guardas resulta em perda de água e turgescência diminuída, conduzindo ao fechamento estomático. O processo da perda de soluto das células guardas é acionado pela condição de redução da água no resto da folha, havendo evidências de que o ácido abscísico (CORNISH & ZEEVART, 1985; TAIZ & ZEIGER, 1991; BRAY, 1993) desempenha um importante papel neste processo. O aumento da síntese de ABA ocorre após o fechamento ter começado e parece melhorar ou prolongar o efeito do fechamento inicial (HARTUNG *et al.*, 1988). As respostas estomáticas à desidratação da folha podem variar enormemente, tanto entre espécies, quanto dentro da mesma espécie. O estômato de algumas espécies que retardam a desidratação do tecido foliar, como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) e a mandioca (*Manihot esculenta*), não reagem

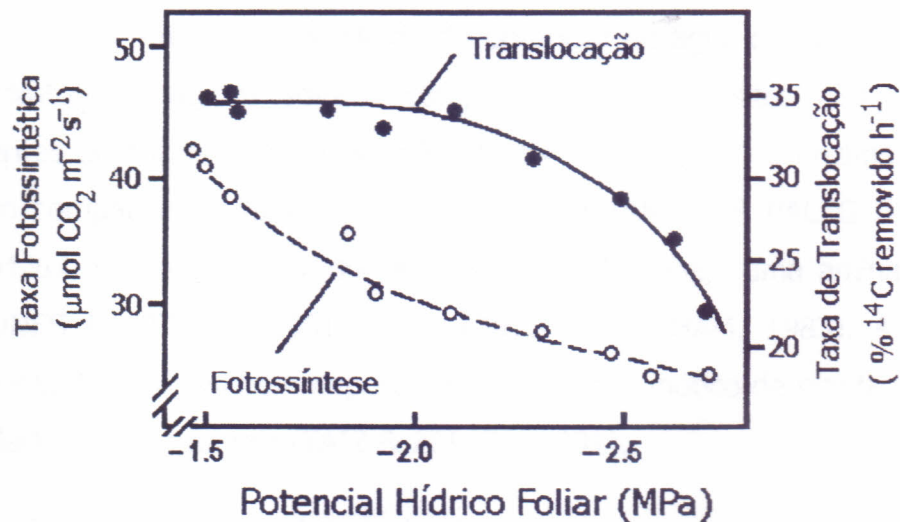
normalmente à falta de água, pois a condutância estomática e a transpiração diminuem tanto, que o potencial de água da folha pode permanecer quase constante durante a seca (RADIN & HENDRIX, 1988).

O estresse da água normalmente afeta tanto a condutância estomática, quanto a atividade fotossintética na folha. Quando do fechamento estomático durante os estágios iniciais do estresse da água, a eficiência do uso da água pode aumentar (mais CO_2 absorvido por unidade de água transpirada), porque o fechamento estomático inibe a transpiração mais do que diminui as concentrações de CO_2 intercelulares e a desidratação das células do mesófilo inibe a fotossíntese. Quando o estresse se torna severo, contudo, a eficiência do uso da água normalmente diminui e a inibição do metabolismo do mesófilo se torna mais forte. O efeito relativo do estresse sobre a condutância estomática e fotossíntese pode ser avaliado quando se coloca as folhas estressadas no ar contendo altas concentrações de CO_2 (HANSON & HITZ, 1982; SCHULZE, 1986). As limitações estomáticas à fotossíntese poderiam ser devido a uma alta concentração de CO_2 externo, mas qualquer efeito direto do estresse hídrico sobre o metabolismo no mesófilo não será revertido por exposição a altas concentrações de CO_2 (TAIZ & ZEIGER, 1991).

Outra questão crítica com respeito aos efeitos do estresse da água é se o processo do estresse afeta diretamente a translocação. O transporte do floema está ligado tanto à fotossíntese, que produz os substratos, quanto ao metabolismo nos drenos. O estresse da água diminui a fotossíntese e o consumo de assimilados nas folhas em expansão. Em conseqüência, o estresse da água indiretamente diminui a quantidade de fotossintatos exportado pelas folhas. Pelo fato de ser o transporte do floema dependente da turgescência, já foi questionado que, se o potencial de água diminui no floema durante o estresse, a diminuição na turgescência deve também inibir o movimento dos assimilados (TAIZ E ZEIGER, 1991; SALISBURY & ROSS, 1992).

As experiências, contudo, têm demonstrado que a remoção dos drenos não é afetada, quando outros processos, tal como fotossíntese, já terão sido fortemente

inibidos, conforme mostra a figura abaixo. Esta relativa insensibilidade ao estresse, permite às plantas uma mobilização e o uso de reservas onde elas são necessárias (por exemplo, no crescimento da semente), mesmo quando o estresse é bastante rigoroso. A habilidade de se continuar removendo carbono é um fator chave, em todos os aspectos da resistência da planta à seca (TAIZ & ZEIGER, 1991).



Extraída e adaptada de TAIZ & ZEIGER (1991)

O ajuste osmótico, ou acumulação de solutos pelas células, é um processo pelo qual o potencial de água pode ser diminuído sem ser acompanhado por uma diminuição na turgescência (MORGAN, 1984). A modificação no potencial de água do tecido resulta simplesmente de modificações na pressão osmótica. O ajuste osmótico não deve ser confundido com o aumento na concentração do soluto, que ocorre durante a desidratação e a murcha da célula. Em vez disso, é um aumento líquido no conteúdo do soluto que ocorre durante a desidratação da célula, independente das modificações de volume, que têm lugar por causa da perda de água. O aumento na pressão osmótica é bastante pequeno, entre 0.2 e 0.8 MPa, exceto em plantas adaptadas às condições extremamente secas. A maior parte do ajuste osmótico pode, normalmente, ser devido ao aumento na concentração de alguns solutos

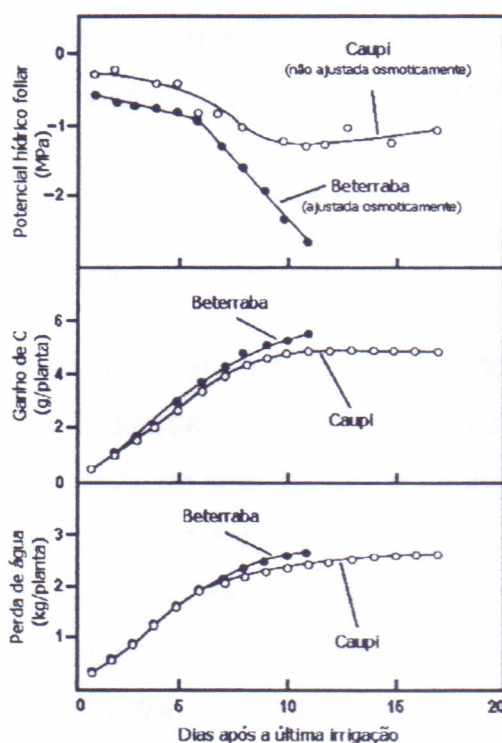
comuns, tais como açúcares, ácidos orgânicos e íons, especialmente K^+ (CRAMER *et al.*, 1985).

Tem sido mostrado que as enzimas do citosol das células da planta são rigorosamente inibidas por altas concentrações de íons. O acúmulo de íons durante o ajuste osmótico parece ocorrer principalmente dentro de vacúolos, onde os íons são conservados fora do contato com as enzimas do citosol e de organelas subcelulares. Por causa da compartimentação dos íons, alguns outros solutos devem se acumular no citoplasma para manter o equilíbrio do potencial de água dentro da célula. Estes outros solutos, chamados solutos compatíveis (ou osmólitos compatíveis), são componentes orgânicos que não interferem com as funções da enzima. A prolina é um soluto compatível normalmente acumulado (ASPINNAL & PALEG, 1981); outros são o sorbitol, um álcool derivado de açúcar e, a betaína, uma amina quaternária (WYN JONES & STOREY, 1981; WYN JONES & GORHAM, 1983). A síntese dos solutos compatíveis é também importante no ajuste osmótico de plantas ao aumento da salinidade na zona da raiz (TAIZ & ZEIGER, 1991).

O ajuste osmótico se desenvolve lentamente, em resposta à desidratação do tecido. É importante, por isso, quando se estuda o ajuste osmótico, permitir-se um lento início do estresse, de modo a se prover tempo suficiente para as trocas substanciais na síntese do soluto. No curso de vários dias, contudo, outras modificações (crescimento, fotossíntese, etc.) estarão também acontecendo. Por esta razão, não está claro se o ajuste osmótico é uma resposta direta e independente ao déficit da água, ou um resultado de algum outro fator, tal como a taxa de redução do crescimento. Não obstante, está claro que as folhas capazes de ajuste osmótico podem manter a turgescência a potenciais de água mais baixos do que as folhas não ajustadas (Mc CREE & RICHARDSON, 1987).

A manutenção da turgescência possibilita a continuação do alongamento da célula e facilita a condutância estomática a potenciais de água mais baixos (TURNER & JONES, 1980). Neste sentido, o ajuste osmótico é uma aclimatação que melhora a verdadeira tolerância à desidratação. A figura a seguir mostra a comparação entre

uma planta de beterraba açucareira (*Beta vulgaris*), crescidas em vaso, uma espécie ajustável osmoticamente, e uma planta de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), uma espécie não ajustável que, ao invés, conserva água por fechamento estomático durante o estresse. As folhas da beterraba açucareira mantiveram um potencial de água inferior ao das folhas de feijão-de-corda; a fotossíntese e a transpiração, contudo, durante o estresse foram apenas levemente maiores na beterraba açucareira (Mc CREE & RICHARDSON, 1987).



Extraída e adaptada de TAIZ & ZEIGER (1991)

A maior diferença entre as duas plantas foi o potencial de água da folha. Estes resultados mostram que o ajuste osmótico promoveu a verdadeira tolerância à desidratação, porém não tendo efeito maior na produtividade (Mc CREE & RICHARDSON, 1987). O ajuste osmótico também ocorre em raízes, embora o processo não tenha sido tão extensivamente estudado como nas folhas. Este ajuste, contudo, pode ocorrer no meristema da raiz, melhorando a turgescência e mantendo

o seu crescimento, sendo um componente importante das mudanças de padrões no crescimento da raiz, durante a redução da água no campo (Mc CREE & RICHARDSON, 1987; TAIZ & ZEIGER, 1991).

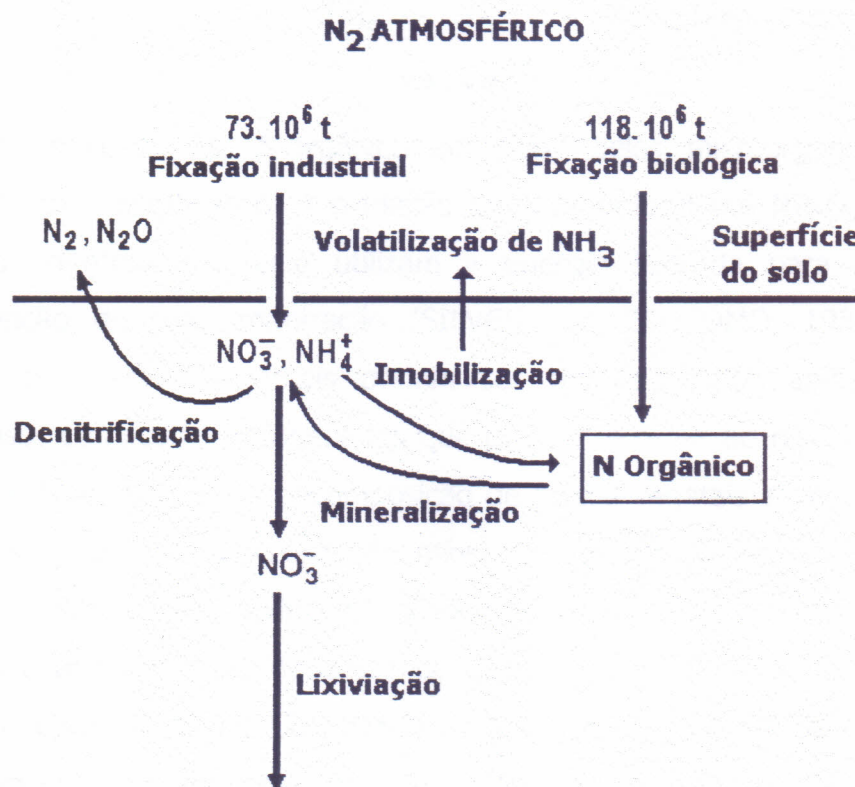
O ajuste osmótico é um mecanismo valioso da aclimatação ao estresse? Os solutos se acumulam em um tecido simplesmente por causa da relação estresse/inibição de crescimento em qualquer outro lugar? Estas perguntas devem ser difíceis de se responder. Tentativas para aumento do ajuste osmótico nas folhas, sejam genéticas (por cultivo e seleção) ou fisiológicas (por indução do ajuste com déficits de água controlados), resultaram em plantas que cresceram mais lentamente. Então, a utilização do ajuste osmótico para melhorar o desempenho da agricultura ainda está por se realizar (TAIZ & ZEIGER, 1991).

1.2.3 Utilização de nitrogênio pelas plantas.

O nitrogênio é fundamental para o crescimento e desenvolvimento de todas as plantas cultivadas que o requerem em grandes quantidades. Normalmente, o nitrogênio é absorvido da solução do solo, na forma de íons nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) (SMITH & GALLON, 1993). A fonte mais importante de nitrogênio é o NO_3^- , forma mais abundante em torno das raízes, do que o NH_4^+ . Entretanto, a solução do solo freqüentemente apresenta baixas concentrações de NO_3^- o que limita o crescimento da planta (SILVEIRA & CROCOMO, 1985). A grande demanda de nitrogênio para altas produções agrícolas tem levado a um rápido aumento na quantidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados.

É prática agrícola corrente adubações nitrogenadas em grandes quantidades e, para economizar o custo de aplicação, em geral, é efetuada uma única aplicação de modo a suprir a demanda de N pela cultura durante a estação de crescimento. O resultado é um suprimento excessivo inicial, seguido de um progressivo declínio através do ciclo da cultura até que o N alcance baixos níveis na solução do solo. Com o tempo, o nível de N no solo diminui devido a absorção pela planta, lixiviação,

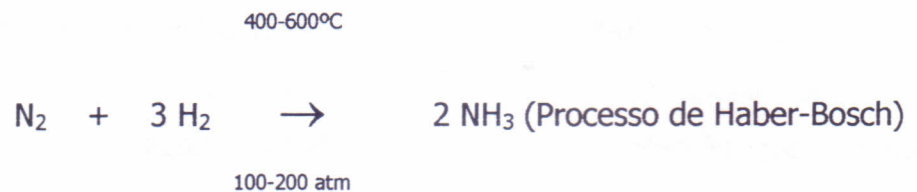
desnitrificação e outros processos de remoção (SMITH & GALLON, 1993; LEA, 1997). A faixa de concentração de NO_3^- na solução nessas condições pode variar de 1 até 20 mM (SILVEIRA, 1985 b). O nitrogênio ocorre na natureza em diversas formas, existindo uma contínua interconversão destas formas por meio de processos físicos e biológicos constituintes do ciclo do nitrogênio, conforme ilustra o esquema abaixo (LEA, 1997).



Extraído e adaptado de LEA (1997)

Das grandes quantidades de N_2 existentes na atmosfera, os vegetais não podem utilizá-lo diretamente, embora penetrem na planta através dos estômatos, em virtude de dificuldades de ordem energética e catalítica, pois as folhas não possuem enzimas para reduzir o N_2 até NH_3 . Assim o N_2 sai livre e rapidamente como entra na planta. A maior parte das reservas nitrogenadas do solo são provenientes da fixação biológica por meio de microorganismos fixadores livres, simbióticos ou em

associação (SPRENT & SPRENT, 1990 ; SMITH & GALLON, 1993). Em menor grau, a fixação não biológica do nitrogênio como descargas elétricas e processos industriais; principalmente pelo processo de Haber-Bosch – síntese industrial de amônia – este processo envolve a reação de nitrogênio e hidrogênio na forma de gases submetidos a altas temperaturas e pressão, contribuem para as reservas de nitrogênio no solo (LEA, 1997).



A conversão do N-orgânico em NH_4^+ pelos microorganismos do solo é chamada de amonificação. A oxidação do N-amoniacal até N-NO_3^- é realizado por bactérias nitrificadoras, que utilizam a energia liberada para o crescimento e manutenção de sua organização (SILVEIRA & CROCOMO, 1985). O nitrogênio contido nos tecidos vegetais podem ser utilizado pelos animais para formar numerosos compostos nitrogenados que podem retornar ao reservatório do solo na forma de fezes e urina. A decomposição de restos vegetais e animais irão formar o N-orgânico que, por processos de mineralização, produzirão N-NO_3^- e N-NH_4^+ . O nitrogênio mineralizado pode ser lixiviado para o lençol freático e pode retornar como N_2 para a atmosfera por processo de desnitrificação (SPRENT & SPRENT, 1990 ; SMITH & GALLON, 1993; LEA, 1997) ou também como óxido de dinitrogênio (N_2O) onde poderia desempenhar um papel de grande importância no processo de destruição da camada de ozônio (MENGEL, 1992).

1.2.3.1 Fixação simbiótica de N_2

A forma mais importante de fixação de nitrogênio agrícola é realizada pela simbiose entre raízes de plantas de leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* (SPRENT & SPRENT, 1990; SMITH & GALLON, 1993). Porém, alguns *Rhizobia*, por exemplo *Azorhizobium*, *Caulinodans* e *Photorhizobium* formam nódulos em caule. Várias plantas não leguminosas, também, produzem nódulos que fixam o nitrogênio,

mas o procariótico simbiote é um actinomiceto chamado *Frankia*. A cianobactéria pode também formar relações simbióticas com uma variedade de organismos, inclusive a esponja de folha de coral *Sphonochalina* (SPRENT & SPRENT, 1990; RAI, 1990).

O processo de nodulação começa com a infecção dos pelos absorventes da raiz, pelos rizóbios, que vivem na rizosfera, onde se multiplicam aproveitando exudados das raízes como alimento (SPRENT & SPRENT, 1990). A primeira reação que é reconhecida é o enrolamento do pêlo da raiz. A parede celular rompe-se, facilitando a penetração da bactéria. Estabelece-se, então, a infecção que começa quando a plasmalema das células infectadas se desenvolvem formando filamentos cheios de bactérias que se prolongarão na córtex da raiz até próximo do periciclo. As células da córtex que estão infectadas, aumentam de tamanho e dividem-se para formar uma esfera rodeada por células não infectadas e uma camada fibrosa externa.

Os bacterióides são envolvidos pela leghemoglobina, uma proteína de origem vegetal que ocorre somente nos tecidos dos nódulos das leguminosas. A leghemoglobina tem o papel de facilitar a difusão do O₂ da superfície do nódulo até o bacterióide e garantir o acesso rápido de O₂ necessário para a respiração da bactéria (síntese de ATP, via fosforilação oxidativa) sem permitir a inativação da enzima responsável pela fixação do N₂, a nitrogenase que é sensível ao oxigênio.

A nitrogenase é uma enzima complexa capaz de catalisar a redução do N₂ a amônia, conforme esquema abaixo. Ela consiste de dois complexos proteicos: complexo Fe-Proteína (Fe-S-Proteína) e complexo Mo-Fe-Proteína (Mo-Fe-S-Proteína) que quando associados para formar a nitrogenase mostram atividade superior a dos complexos separados.



Todas as enzimas nitrogenases contêm uma Ferro-proteína que é composta de duas subunidades sensíveis ao oxigênio, com massas moleculares de,

aproximadamente, 62 kDa, contendo 4 átomos de Fe e 4 átomos S por dímero. O centro de ferro-enxofre tem um potencial elétrico de -350 mV. Quando MgATP são unidos, acontece uma mudança conformacional da Fe-proteína, e o potencial elétrico torna-se 100 mV mais negativo. Estudos de mecanismos demonstraram que a Fe-proteína é uma doadora de elétron específica à proteína contendo molibdênio (SMITH, 1990). A parte da enzima nitrogenase contendo molibdênio é chamada proteína MoFe. O Co-fator Ferro-molibdênio (FeMoCo), que é derivado do homocitrato é ligado a α -subunidade da proteína de MoFe na fenda formada das duas regiões do polipeptídeo aos resíduos dos aminoácidos Cys-175, Gln-191 e His-195 (SCOTT *et al.*, 1990).

Além da redução do nitrogênio, a nitrogenase também pode reduzir uma variedade de outros substratos, tais como, a azida e o acetileno (LEA, 1997). Estes substratos têm em comum, seus pequenos tamanhos e em muitos casos a posição da tripla ligação. Podemos notar que entre estes substratos está o acetileno (etileno), sendo esta conversão, a base mais comumente usada nos ensaios de fixação do nitrogênio. O etileno formado pela nitrogenase pode fazer parte de ensaios, usando-se um simples método de cromatografia gasosa. As medidas mais precisas de fixação de nitrogênio pela incorporação do $^{15}\text{N}_2$ no material orgânico, é usando um espectômetro de massa, mas é caro e gasta muito tempo. Porém, a informação obtida, usando-se o ensaio de redução do acetileno, deveria ser considerado com precaução (MINCHIN *et al.*, 1986 e DENISON *et al.* 1992).

Os nódulos que fixam ativamente o N_2 são reconhecidos pela coloração avermelhada no seu interior. Este processo foi descrito em detalhes por SPRENT & SPRENT (1990). Há três funções principais das células da planta em que ocorre uma rápida fixação de nitrogênio no nódulo:

1. Prover um fluxo rápido de oxigênio para dar suporte a respiração do *rhizobium* à uma concentração suficientemente baixa para evitar a desativação da nitrogenase;

2. Fornecer carboidratos, normalmente na forma de ácido C₄ para suportar as rápidas taxas de respiração do bacterióide;
3. Remover rapidamente a amônia que é sintetizada pelo bacterióide para evitar a inibição da nitrogenase.

Muitos dos mais recentes genes de nodulinas codificam proteínas que dão suporte a estas funções.

A leghemoglobina (LegHb) é a mais abundante proteína sintetizada nos nódulos (~20%). Está localizada no citoplasma da célula da planta infectada e não dentro da membrana do peribacterióide. Essas proteínas pertencem à família de hemoproteínas capazes de ligação reversível com o oxigênio e apresentam massa molecular de aproximadamente 16 KDa (BECANA & KLUCAS, 1992 e BARBOSA & MEIRELLES, 1994). Do ponto de vista estrutural, as leghemoglobinas de todas as leguminosas estudadas são semelhantes às mioglobinas animais (ELLFOLK, 1972). Funcionalmente, diferem destas por possuírem maior afinidade pelos ligantes gasosos : O₂ e CO (WITTENBERG *et al.* 1972) e por formarem complexos com ânions acetato e nicotinato. O acetato é específico para a forma oxidada (APPLEBY *et al.*, 1976), enquanto o nicotinato liga-se tanto na forma oxidada quanto na forma reduzida, sendo, por esta razão e por sua natureza endógena, o ligante mais importante das leghemoglobinas (KLUCAS & APPLEBY, 1991).

A síntese da leghemoglobina nos nódulos é condição necessária para que se estabeleça a fixação de nitrogênio pelo bacterióide. Sua síntese é desencadeada quando grupos hemes sintetizados pelo bacterióide (KEITHLEY & NADLER, 1983; SANGWAN & O'BRIAN, 1991) são transportados para o citoplasma da célula do hospedeiro onde se unem à globina que é codificada pelo genoma do hospedeiro (APPLEBY, 1984 e SANGWAN & O'BRIAN, 1991). Apesar das leghemoglobinas terem a mesma função fisiológica, a síntese de diferentes tipos moleculares em um mesmo hospedeiro é comum a todas as leguminosas e foi definitivamente comprovada com o isolamento de quatro genes distintos responsáveis pela síntese dos quatro principais componentes da leghemoglobina de soja (HYLDIG-NIELSON *et*

al., 1982 e LEE, *et al.*, 1983). O número de componentes da leghemoglobina sintetizados nos nódulos depende da espécie e o alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos entre os componentes de uma mesma espécie diminui quando se comparam componentes de espécies diferentes (APPLEBY, 1984 e SANGWAN & O'BRIAN, 1991).

A predominância de diferentes componentes da leghemoglobina durante o ciclo de fixação de N_2 tem sido determinada para diferentes espécies de leguminosas. Independentemente do número de componentes sintetizados em cada espécie, o aumento ou redução na concentração deles está relacionado com a idade do nódulo (APPLEBY, 1984) e isto foi observado em mucana preta, com a redução total na síntese do componente II, durante a fase de frutificação (BARBOSA & MEIRELLES, 1994). A função fisiológica dos diferentes tipos de leghemoglobina tem sido estudada pela determinação da afinidade dos componentes por diferentes ligantes (MARTIN *et al.*, 1990). Em soja os componentes predominantes em nódulos jovens têm menor afinidade pelo O_2 que os predominantes em nódulos maduros (FUCHSMAN & APPLEBY, 1979); em ervilha, resultados semelhantes foram obtidos (UHEDA & SYŌNO, 1982). A sensibilidade dos componentes aos óxidos de nitrogênio produzidos durante a fixação de N_2 que são tóxicos e oxidam a leghemoglobina tem sido estudada (BECANA & KLUCAS, 1992).

A presença de hemoglobina no reino vegetal deixou de ser restrita às leguminosas após o isolamento da hemoglobina dos nódulos de *Parasponia* (KORTT *et al.* 1985) e de *Casuarina* (FLEMING *et al.* 1987), noduladas por *Bradyrhizobium* e *Frankia*, respectivamente. Seguindo esta descoberta, foi isolado o gene da hemoglobina em raízes de plantas noduladas e não noduladas (BOGUZS *et al.*, 1988). A função da hemoglobina nas raízes está em discussão e um possível papel sinalizador da disponibilidade de O_2 tem sido sugerido (WITTENBERG & WITTENBERG, 1990). Do ponto de vista evolutivo, os genes da hemoglobina no reino vegetal são mais primitivos que os das hemoglobinas animais, porém a conservação da mesma estrutura tanto nos genes de raízes como de nódulos é

indicativa de uma evolução vertical e descontínua entre as dicotiledôneas (APPLEBY *et al.*, 1990).

A amônia excretada pelo bacterióide, após a ação da nitrogenase, é assimilada no citoplasma da planta pela enzima glutamina sintetase (GS). Duas isoenzimas de glutamina sintetase de nódulos foram identificadas (LEA, 1993, 1997). Após a síntese da glutamina, o nitrogênio fixado é transportado para as folhas como amidas e ureídeos. A nodulina-35 que é a segunda proteína solúvel mais abundante do nódulo de soja, tem sido encontrada como sendo a subunidade da uricase-II que catalisa a conversão do ácido úrico em alantoina (SUSUKI & VERMA, 1991). A enzima está presente nos peroxissomos de células não infectadas no nódulo.

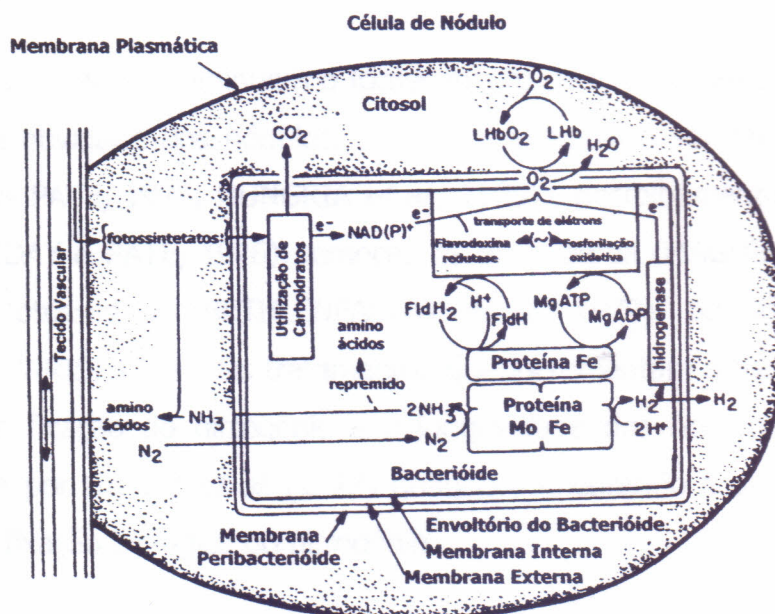
A sacarose é a fonte principal de carbono fixado pela fotossíntese e transportado das folhas até os nódulos. A primeira enzima envolvida na formação da sacarose é chamada incorretamente de sacarose sintase, a qual converte sacarose em frutose e UDP-glicose. As subunidades de sacarose sintase tem sido identificadas como nodulina 100 de soja. O grupo heme livre causa uma dissociação e inibição da enzima sacarose sintase e isto pode estar envolvido na regulação do metabolismo de carboidratos durante a senescência dos nódulos (THUMMLER & VERMA, 1987). Um número considerado de nodulinas podem estar também envolvidas na estrutura e função da membrana peribacterióide; isto está discutido em detalhes por VERMA & MIAO, 1992.

Três principais componentes, baseados na estrutura da uréia, são conhecidos por ocorrerem nas plantas, a saber, alantoina, ácido alantóico e citrulina (LEA *et al.* 1990; SCHUBERT & BOLAND, 1990; MENGEL & PILBEAM, 1991; LEA, 1993, 1997). A alantoina e o ácido alantóico são quase 50-90% do nitrogênio orgânico no xilema de muitas leguminosas tropicais (por exemplo em soja, caupi e feijão *Phaseolus*) (LEA *et al.* 1990; SCHUBERT & BOLAND, 1990; MENGEL & PILBEAM, 1991). Existe uma boa evidência de que os ureídeos são sintetizados como produtos do nitrogênio fixado recentemente nos nódulos da raiz de leguminosas tropicais. Após 10 minutos de exposição dos nódulos de soja ao $^{13}\text{N}_2$, 40% de radioatividade foi encontrada no

ácido alantóico. Em experimentos semelhantes com a caupi, os ureídeos eram mais de 90% do ^{15}N no exudato do xilema, 2 horas após exposição dos nódulos ao $^{15}\text{N}_2$ (SCHUBERT & BOLAND, 1990; MENGEL & PILBEAM, 1991).

O caminho da síntese do ureídeo nos nódulos da raiz de leguminosas é longo e complexo. A alantoina e o ácido alantóico são derivados do monofosfato de purina de inosina, que é sintetizado da ribose-5-fosfato e exige uma contribuição de nitrogênio da glutamina, aspartato e glicina (SCHUBERT & BOLAND, 1990; MENGEL & PILBEAM, 1991). É essencial que, uma vez que a alantoina e o ácido alantóico alcancem a semente ou a raiz em desenvolvimento, eles sejam metabolizados a uma fonte utilizável de nitrogênio (SCHUBERT & BOLAND, 1990; MENGEL & PILBEAM, 1991). Foi originalmente considerado que, seguindo a hidrólise de alantoina para ácido alantóico por alantoinase, o ureídeo fosse separado para produzir duas moléculas de uréia e glioxilato. O papel da uréia, contudo, e seu metabolismo subsequente por urease para dióxido de carbono e amônia têm sido questionados e um segundo caminho foi proposto. Neste caminho, os quatro átomos de nitrogênio do ácido alantóico são liberados como amônia, diretamente, sem a uréia como um intermediário. (SCHUBERT & BOLAND, 1990; MENGEL & PILBEAM, 1991, LEA, 1997).

Está bem estabelecido que o bacterióide dos nódulos de leguminosas contêm todos os sistemas de enzimas necessários para a redução do N_2 à amônia (ROBERTSON & FARNDEN, 1980). Essa fixação do N_2 no bacterióide é catalisada pela enzima nitrogenase e requer energia obtida do metabolismo de carboidratos na forma de um poder redutor e ATP. O esquema a seguir ilustra as principais reações que ocorrem dentro do nódulo, mostrando as interações entre as células da planta e o bacterióide.



Extraído e adaptado de ROBERTSON & FARNDEN (1980)

Os bacterióides e a planta hospedeira são perfeitamente interligados por meio dos vasos do xilema e do floema e, portanto, totalmente integrados em termos nutricionais. Desde o momento em que o *Rhizobium* é atraído e começa a se multiplicar na rizosfera, já existe uma dependência de um contínuo fornecimento de carboidratos pela planta hospedeira (VICENT, 1974). Durante os processos de infecção e desenvolvimento dos nódulos, energia é necessária às divisões celulares, sendo obtida a partir da oxidação dos carboidratos produzidos na parte aérea da planta hospedeira (NEVES, 1981).

O processo de fixação de nitrogênio também requer um suprimento contínuo de carboidratos que fornecem tanto a energia para a redução do nitrogênio quanto os esqueletos de carbono necessários à assimilação da amônia produzida (HUNGRIA & NEVES, 1986 e ROBERTSON & FARNDEN, 1980). A importância dos fotossintetatos em regular a intensidade e periodicidade da fixação de nitrogênio já foi há muito reconhecida (WILSON, 1940), e a interdependência entre os processos de fotossíntese e fixação de nitrogênio já foi demonstrada, indiretamente, através de

inúmeros experimentos de manipulação da planta e/ou seu ambiente (HUNGRIA & NEVES, 1986).

Tratamentos que diminuem o fornecimento de fotossintetatos invariavelmente decrescem a atividade dos nódulos, como por exemplo o sombreamento excessivo (HALLIDAY & PATE, 1976; HUNGRIA *et al.*, 1985), desfolhamento (LAWN & BRUN, 1974; HALLIDAY & PATE, 1976), remoção da parte aérea (MAGUE E BURRIS, 1972), inibidor da fotossíntese (BETHLENFALVAY *et al.*, 1979), ou nódulos destacados (MAGUE E BURRIS, 1972). Os tratamentos que incrementam a fotossíntese também aumentam a fixação do nitrogênio e a longevidade dos nódulos, como pode ser demonstrada por HARDY *et al.* (1977) quando aumentando a pCO_2 verificaram um aumento na fixação biológica do nitrogênio.

QUEBEDEAUX *et al.* (1975), diminuindo a pO_2 , conseguiram os mesmos efeitos, utilizando iluminação suplementar. LAWN & BRUN, 1974, observaram aumento na fixação, quando se fez enxertia de uma segunda parte aérea. Outros experimentos mostram mudanças periódicas na fixação de nitrogênio, sendo esta mais intensa durante o dia (MAGUE & BURRIS, 1972). A redução na fixação de nitrogênio durante a noite foi atribuída ou a uma inibição tipo "feed-back" da síntese da nitrogenase causada pela amônia que não pode ser assimilada por falta de esqueletos de carbono (WONG & EVANS, 1971) ou a uma diminuição na energia total utilizável na concentração de redutores nos bacterióides, essenciais para a manutenção da atividade da nitrogenase (CHING *et al.*, 1975).

Já foi observado que a redução ou a eliminação artificial dos frutos que competem com os nódulos pelos fotoassimilados disponíveis incrementam a fixação de N_2 possivelmente por promover excedentes que são desviados para os nódulos (LAWN & BRUN, 1974). Entretanto os efeitos observados nem sempre podem ser explicados em termos de competição entre nódulos e frutos pelos fotossintetatos produzidos (GORGOCENA *et al.*, 1997). Em alguns experimentos, a remoção de flores (EVANS, 1977) ou frutos diminuíram esses fotossintetatos, pelo menos inicialmente (BETHLENGALVAY *et al.*, 1978). Em algumas leguminosas anuais as

taxas mais altas de fixação de N_2 ocorrem durante o início da frutificação (MAGUE & BURRIS, 1972; MINCHIN *et al.*, 1982), quando também é observado um maior acúmulo de nitrogênio nas plantas.

De um modo geral, os nódulos mantêm apenas uma pequena reserva de compostos de carbono (MINCHIN & PATE, 1974) e, portanto, dependem grandemente, para seu crescimento e funcionamento, dos fotossintetatos correntemente translocados das folhas (ROBERTSON & FARNDEN, 1980) ou das reservas de carboidratos remobilizados de outras regiões da planta (TRINICK *et al.*, 1976). Os fotossintetatos chegam aos nódulos pelo floema na forma de sacarose, como foi demonstrado por meio de estudos com $^{14}CO_2$ (PATE, 1962) e análises de exudatos do floema (PATE, 1975).

A sacarose é o carboidrato mais abundante nos nódulos de soja e de *Phaseolus vulgaris* (ANTONIW & SPRENT, 1978). Entretanto os bacterióides isolados são incapazes de metabolizar essa forma de carbono, pois não possuem invertase (BERGENSEN, 1974), que está presente exclusivamente no citosol da célula vegetal (ROBERTSON & TAYLOR, 1973). Esses fatos sugerem suprimento de outros compostos de carbono aos bacterióides. Apesar da sacarose ser considerada como uma fonte primária de carbono para o crescimento, respiração, manutenção e fixação do nitrogênio, outros açúcares ocorrem nos nódulos, como por exemplo glicose, inositol, arabinose e frutose (STREETER & BOSLER, 1976) e podem servir de fonte de carbono para os bacterióides.

Ainda não está esclarecida qual a via metabólica para a glicose em operação no bacterióide, apesar de se saber que, em meio de cultura, as vias Entner-Doudoroff, Embolem-Meyerhof e Pentose-Fosfato podem ser usadas, dependendo da estirpe de *Rhizobium* (RAWSTHORNE *et al.*, 1980). Cada uma dessas vias difere na quantidade de ATP e redutores produzidos. Alguns nódulos podem acumular compostos de carbono como, por exemplo, o poli- β -hidroxibutirato (PHB), que é acumulado nos bacterióides de soja (KLUCAS & EVANS, 1968) e que pode ser usado para sustentar a fixação do nitrogênio quando o suprimento de fotossintetatos está

de algum modo restrito (KRETOVICH *et al.*, 1977), podendo também servir de fonte de esqueletos de carbono para a assimilação da amônia. Glicogênio e amido são outros compostos de reserva encontrados em nódulos (BERGENSEN, 1974) e já foi demonstrado que a quantidade de amido dos nódulos de ervilha (*Pisum sativum*) e de caupi (*Vigna unguiculata*) diminuem durante a noite, sugerindo uma participação no metabolismo do nódulo (MINCHIN & PATE, 1974).

BERGENSEN & TURNER (1967), estudando suspensões de bacterióides usando $^{15}\text{N}_2$, conseguiram mostrar que a amônia é o primeiro produto estável da fixação de nitrogênio pela nitrogenase e a matéria prima para a incorporação do nitrogênio fixado em compostos orgânicos. O glutamato foi o primeiro composto orgânico marcado nesses experimentos iniciais (BERGENSEN & TURNER, 1967) e é aceito como fornecedor primário de grupo amino para a síntese de outros aminoácidos (BOLLAND *et al.*, 1980). Há duas possíveis vias metabólicas para a assimilação de amônia em glutamato: a primeira envolvendo as enzimas glutamato desidrogenase e glutamina sintetase (GDH/GS) e a segunda envolvendo a glutamina sintetase e glutamato sintase (GS/GOGAT). A atividade de GDH nos nódulos é, em geral, muito mais baixa que a da GOGAT (BOLLAND *et al.*, 1980) o que indica a GS/GOGAT como principal via metabólica para a assimilação da amônia, o que é evidenciado, inclusive, em estudos com $^{13}\text{N}_2$ de MEEKS *et al.* 1978. Além disso, a GS tem a vantagem de possuir uma constante de Michaelis (Km) para a amônia muito mais baixa que a GDH (BOLLAND *et al.*, 1980) e catalisa uma reação irreversível (BOLLAND *et al.*, 1980).

Existem controvérsias quanto ao local da assimilação da amônia, com inúmeros trabalhos apontando ora para os bacterióides (KENNEDY *et al.*, 1966), ora o citosol (KLUCAS & BURRIS, 1966), o que levou BERGENSEN (1965) a sugerir que bacterióides de diferentes espécies de *Rhizobium* diferem no grau de assimilação e excreção da amônia produzida. De fato, a amônia é excretada tanto por bacterióides (BERGENSEN & TURNER, 1967) como por *Rhizobium* em cultura que fixa nitrogênio, porém a proporção de amônia excretada varia de acordo com a estirpe. BOLLAND *et al.* (1980), contudo, sugerem o citosol como sítio principal na assimilação da amônia, uma vez que apenas as atividades da GS e GOGAT do citosol

aumentam paralelamente com a atividade da nitrogenase e com a concentração de leghemoglobina nos nódulos durante períodos de atividade crescentes, enquanto as enzimas dos bacterióides permanecem sempre em níveis constantes.

O glutamato e a glutamina são os aminoácidos primários da fixação, mas o nitrogênio também é transportado para a parte aérea das plantas na forma de asparagina, aspartato e nas leguminosas tropicais principalmente na forma de ureídeos (ROBERTSON & FARNDEN, 1980, SCHUBERT, 1986). A asparagina é sintetizada a partir de glutamato e glutamina na presença de duas enzimas, a aspartato amino transferase e a asparagina sintetase, cujas atividades são intensas no citosol e não nos bacterióides (ROBERTSON & FARNDEN, 1980; SCHUBERT, 1986). Estudos com $^{15}\text{N}_2$ em *Glicina max* e *Vigna unguiculata*, mostraram que a síntese de ureídeos está localizada nos nódulos (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978). A formação de ureídeos é indireta via "síntese de novo" e decomposição de purinas, já que a via alternativa através da condensação de uréia com ácido glioxílico, foi descartada por MATSUMOTO *et al.* (1977 a), baseados em estudos com $^{15}\text{N}_2$.

Já foram evidenciadas nos nódulos as enzimas para dioxidação de purinas (TAJIMA *et al.*, 1977) e com o uso de inibidores foi possível confirmar que os ureídeos são formados por essa via através da "síntese de novo" de purinas (FUJIHARA & YAMAGUCHI, 1978), como posteriormente demonstrada pelos estudos de AKTINS (1984), usando ^{14}C -glucose e ^{14}C -acetato como precursores. Os ureídeos são sintetizados principalmente no citosol das células da planta hospedeira (TRIPLETT *et al.*, 1980), o que compreensível uma vez que os aminoácidos precursores das purinas são sintetizados neste local (SCHUBERT, 1986).

Os produtos originários da fixação de nitrogênio não são acumulados pelos nódulos (PATE, 1962). Embora a concentração de nitrogênio no tecido nodular seja maior que no tecido radicular ou na parte aérea, o nitrogênio dos nódulos pode vir a representar um máximo de 20% do nitrogênio total acumulado pela planta, dependendo da fase de desenvolvimento (MINCHIN *et al.*, 1980). Os produtos da fixação do nitrogênio deixam os nódulos via xilema (OGHOGHORIE & PATE, 1972).

Análises da seiva do xilema e floema têm sido extensivamente empregadas no estudo, em geral, do transporte de compostos nitrogenados em plantas (PATE, 1973). Os compostos exportados pelos nódulos são específicos e, geralmente, envolvem substâncias de baixo peso molecular, ricas em nitrogênio, tais como ureídeos, amidas, aminoácidos e pequenos peptídeos, que possibilitem o transporte de nitrogênio para a parte aérea, com um gasto mínimo de carbono. Cada molécula de ureídeo transporta quatro átomos de nitrogênio, enquanto que cada amida transporta dois.

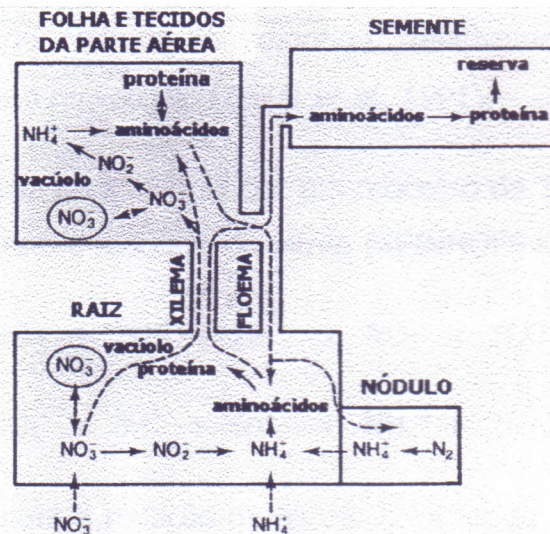
A relação C:N dos ureídeos é baixa, o que confere à planta considerável economia em relação a quantidade de carbono que tem que ser reciclada através da raiz (MINCHIN *et al.*, 1980). Os ureídeos tem a vantagem de uma relação C:N unitária, mas apresentam a desvantagem da baixa solubilidade e, de acordo com SPRENT (1980), para transportar quantidades equivalentes de nitrogênio como alantoína, ao invés de asparagina, são necessárias 2,6 vezes mais água, de modo a transportar os ureídeos na forma de solução saturada. Para plantas de clima tropical, a baixa solubilidade dos ureídeos pode não ser um problema, uma vez que o volume de água transportada pela corrente transpiratória é muito grande. A concentração de ureídeos na seiva do xilema de *Vigna unguiculata* diminui drasticamente durante as horas mais quentes do dia, quando a transpiração é provavelmente muito alta, apesar da atividade dos nódulos ter atingido valores máximos (NEVES, 1981; NEVES & HUNGRIA, 1987) .

Para plantas de clima temperado, o transporte de ureídeos nas concentrações normalmente encontradas na seiva de plantas tropicais torna-se difícil devido não só à baixa temperatura, com menor solubilidade dos ureídeos, e com menor taxa de transpiração nas plantas. A presença de ureídeos em concentrações significativamente altas na seiva de plantas noduladas de soja (*Glicina max*) e de caupi (*Vigna unguiculata*) representa uma das maiores diferenças entre plantas noduladas quando comparadas com plantas não noduladas utilizando nitrato (MINCHIN *et al.*, 1980). Esses compostos foram, entretanto, grandemente ignorados nos estudos de transporte xilemático (SINHA *et al.*, 1978), devido ao conceito

estabelecido de que plantas que fixam nitrogênio empregam os mesmos solutos para o transporte que plantas dependentes de nitrogênio mineral (PATE, 1977).

1.2.3.2 - Assimilação e metabolismo do nitrato

Após a absorção, o nitrato, é transportado para as partes em crescimento da planta. Por fim, o nitrogênio é armazenado na semente e, nas culturas agronomicamente importantes, como os cereais e as leguminosas, que são de considerável valor comercial. A figura a seguir, mostra um resumo das rotas importantes do metabolismo do nitrogênio na planta (LEA, 1993). Durante os últimos cinco anos, tem havido avanços importantes na compreensão da regulação de genes codificando para uma grande número de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio (LEA, 1997).



Extraído e adaptado de LEA, 1993

Os estudos sobre a absorção do nitrato têm tido obstáculos pela falta de um adequado componente químico radioativo. Tem-se feito tentativas usando $^{36}\text{ClO}_3^-$ (NELSON *et al.*, 1983 ABROL, 1990) e estudos com o isótopo $^{13}\text{NO}_3^-$ foram bem sucedidos (MACKOWN *et al.*, 1983, ABROL, 1990), porém os dados podem estar

mascarados pela presença de um sistema de efluxo que transporta NO_3^- para fora da raiz (ABROL, 1990).

Em plantas de cevada crescidas na presença de nitrato, o influxo $^{13}\text{NO}_3^-$ mostra cinéticas típicas de *Michaelis-Menten* (ABROL, 1990; SIDDIQUI *et al.*, 1990 e LEA, 1993). A taxa de absorção é, contudo, dependente da extensão do tratamento prévio com nitrato, sugerindo que um sistema de transporte de nitrato é induzido pelo nitrato. Nas plantas que não foram previamente expostas ao nitrato, a taxa de absorção é baixa, em baixa concentração de nitrato, mas acima de 0.2 mM a taxa de absorção aumenta linearmente (SIDDIQUI *et al.*, 1990 e LEA, 1993). Os dados sugerem que a absorção do nitrato é levada a efeito por um sistema saturável de baixa concentração e um sistema não saturável de alta concentração. Somente um sistema de baixa concentração é estimulado pelo nitrato (SIDDIQUI *et al.*, 1990 e LEA, 1993). Usando-se eletrodos ion-específicos, tem sido sugerido que há um co-transporte de NO_3^-/H^+ através do plasmalema das células da raiz do milho, e que o nível citoplasmático do nitrato é mantido relativamente constante pelo armazenamento do nitrato no vacúolo (ZHEN *et al.*, 1991).

O nitrato é reduzido para amônia por um processo de 2 fases catalisado pelas enzimas redutase do nitrato e redutase do nitrito (KEINHOF & WARNER, 1990).



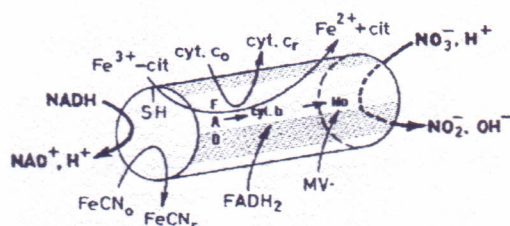
O poder redutor para a redução do nitrato é fornecida, em geral, pelo NADH, enquanto que a ferredoxina é necessária para a transferência dos seis elétrons na redução do nitrito (LEA, 1993, 1997). A redução do nitrato pode acontecer na raiz ou nas partes aéreas, dependendo da espécie de planta, tempo de desenvolvimento ou fornecimento de nitrato. Em geral, já que a concentração externa de nitrato aumenta, a proporção que é transportada à parte aérea para redução aumenta (LEA, 1993, 1997).

A redutase do nitrito está totalmente localizado no cloroplasto, ou plastídio da raiz (LEA, 1993). Apesar de numerosas investigações, a localização da redutase de nitrato no cloroplasto nunca foi confirmada (ABROL, 1990; LEA, 1993). A enzima está localizada no citoplasma, mas pode estar frouxamente ligada à membrana do cloroplasto durante o período de redução do nitrato. Tal sistema permitiria um transporte rápido de nitrito para o cloroplasto e impediria a formação de metabólitos potencialmente tóxicos (ABROL, 1990; LEA, 1993).

A redutase do nitrato (RN) dependente de NADH, sendo composta por duas sub-unidades idênticas de 110-115 kDa, cada uma contendo os grupos prostéticos FAD, heme (citocromo b_{557}) e um cofator de molibdênio (SOLOMONSON & BARBER, 1989; LEA, 1993). Os elétrons fluem do NADH para o nitrato, conforme abaixo indicado:



A enzima pode também levar a uma série de reações parciais (p.exp. a redução do citocromo c), cujo papel fisiológico não está claro. Além do mais, a RN também pode converter o clorato para o metabólito clorito que é tóxico, uma reação que forma a base da ação do herbicida clorato (SOLOMONSON & BARBER, 1989; LEA, 1993). A figura a seguir, representa um modelo catalítico de uma subunidade da RN para as plantas superiores, conforme ABROL (1990).



Extraído e adaptado de ABROL (1990)

A RN recentemente, foi clonada de uma classe de plantas superiores e de fungos. Comparação da sequência completa do cDNA de *Arabidopsis* com outras

conhecidas sequências da proteína indicou que a RN é composta de três campos ou domínios funcionais. Estes são: (a) ligação do FAD, (b) ligação de heme e (c) ligação do molibdênio, identificada por homologia à sulfito oxidase do fígado do rato. Estes domínios correspondem aos grupos prostéticos. Sequências genômicas disponíveis da RN de planta evidenciaram a presença de três "introns" e quatro "exons" - os tamanhos dos "introns" sendo muito diferentes (KEINHOF & WARNER, 1990; LEA, 1993).

A regulação da atividade da RN foi estudada em uma grande variedade de plantas (WALLACE, 1987; CRAWFORD *et al.*, 1988; ABROL, 1990). Como era de se esperar, há diferenças nas espécies, mas um claro padrão geral surgiu. Quando uma planta é exposta ao nitrato, há um aumento dramático na atividade da RN e da proteína tanto nas folhas, como nas raízes. A RN foi, de fato, uma das primeiras enzimas para a qual a evidência clara da síntese "de novo" foi obtida nas plantas superiores. A resposta parece ser dependente de um aumento de fluxo para dentro do "pool" metabólico do nitrato, mais do que do armazenamento do nitrato no vacúolo (WALLACE, 1987; CRAWFORD *et al.*, 1988; ABROL, 1990).

A literatura tem sido, contudo, bem confusa com dificuldades sobre o tipo de análise utilizada e a instabilidade inerente da proteína, junto com a presença de enzimas ativas de protease (WALLACE, 1987; CRAWFORD *et al.*, 1988; ABROL, 1990; LEA, 1993). A situação se tornou mais clara com a disponibilidade de investigações do cDNA, permitindo detectar os níveis de mRNA de RN. Utilizando-se esses procedimentos, o nitrato foi indicado para controlar a atividade da RN já na transcrição (CRAWFORD *et al.*, 1988; ABROL, 1990; LEA, 1993). A luz, provavelmente através da ação do fitocromo, também desempenha um papel importante no estímulo da atividade da RN (WALLACE, 1987). Uma prova recente sugere que existe um forte ritmo diurno no nível do mRNA de RN, o qual antecipa o início do período da luz e assegura o máximo de atividade da RN durante o dia (LEA, 1993). Há também um substancial volume de provas para indicar que a atividade da RN pode ser regulada pelo fornecimento de carboidrato e de uma variedade de reguladores do crescimento e está sujeita à inibição após à aplicação de diversos

estresses ambientais (WALLACE, 1987; CRAWFORD *et al.*, 1988; ABROL, 1990; LEA, 1993).

A redutase do nitrito dependente da ferredoxina (RNi) foi inicialmente considerada como abrangendo uma sub-unidade de peso molecular de 60-64 KDa. O polipeptídeo contém um grupo prostético de siro-heme e um feixe de (4Fe-4S) em seu local ativo. Há alguma evidência que nos leva a sugerir que, para se utilizar a ferredoxina reduzida como um substrato, a enzima completa exige uma segunda sub-unidade de peso molecular 24 kDa (SOLOMONSON & BARBER, 1989; LEA, 1993).

Clones de cDNA da RNi foram caracterizados a partir do espinafre e do milho (KEINHOFES & WARNER, 1990). O genes têm um código nuclear e uma seqüência líder de 32 aminoácidos está presente, a qual é provavelmente o peptídeo de trânsito, que facilita a entrada para o cloroplasto (KEINHOFES & WARNER, 1990). Há uma homologia considerável (86%) entre a seqüência de aminoácidos das enzimas do milho e do espinafre. A homologia, contudo, é menos aparente na seqüência de cDNA (66%), devido ao uso consistente no genes do milho de G/C na terceira posição da seqüência (KEINHOFES & WARNER, 1990; LEA, 1993).

A RNi também é regulada pelo nitrato e pela luz, porém, os efeitos são menos dramáticos do que os observados com a redutase do nitrato (RN) (KEINHOFES & WARNER, 1990; LEA, 1993). O aumento na atividade da RNi tem sido indicado como devido à síntese "*de novo*" da proteína, mas a atividade da enzima e a proteína estão presentes mesmo na total ausência do nitrato. A transcrição do mRNA da RNi é rapidamente induzida pelo nitrato, alcançando um máximo dentro de 5 horas e, depois, declinando para um nível mais baixo, mesmo na presença contínua do nitrato. O mRNA da RNi parece ter vida curta com uma meia vida de 30 minutos. Embora tenha sido sugerido que o nitrito também induza a síntese de mRNA da RNi, não está claro, atualmente, se o nitrato ou o nitrito é a molécula ativa em regular a transcrição (KEINHOFES & WARNER, 1990; LEA, 1993).

O produto da assimilação do nitrato é a amônia. Foi originalmente suposto que a amônia era incorporada para a forma orgânica pela aaminação redutiva do 2-oxoglutarato catalisado pela dehidrogenase do glutamato, como ocorre em células animais. Entretanto, em plantas superiores, considera-se que a enzima funciona na direção do catabolismo do glutamato produzindo 2-oxoglutarato para o metabolismo no ciclo do ácido tricarboxílico (LEA *et al.*, 1990). Um conjunto substancial de provas tem sido formado para demonstrar que a glutamina sintetase (GS) é o único "porto" de entrada da amônia dentro dos aminoácidos nas plantas superiores (LEA *et al.*, 1990). A GS catalisa a conversão, dependente do ATP de glutamato para glutamina (LEA *et al.*, 1990; LEA, 1993, 1997). A enzima tem uma afinidade altíssima pela amônia (K_m 3-5 μ M) e está presente em todos os tecidos da planta (LEA *et al.*, 1990).

A GS nativa das plantas superiores é uma proteína octamérica com massa molecular de 350-400 kDa (FORDE & CULLIMORE, 1989; LEA *et al.*, 1990). No tamanho e na estrutura quaternária, assemelha-se fortemente à enzima isolada de mamíferos, mas é distinta da enzima da bactéria que consiste de 12 sub-unidades (LEA *et al.*, 1990). Níveis extremamente altos da atividade da GS têm sido detectados nos nódulos da raiz de plantas fixadoras de nitrogênio (FORDE & CULLIMORE, 1989; LEA *et al.*, 1990; LEA, 1993). No feijão *Phaseolus vulgaris*, a GS do nódulo pode ser separado em isoenzimas denominadas **GS_{n1}** e **GS_{n2}**, sendo esta última muito semelhante à enzima da raiz não nodulada (FORD & CULLIMORE, 1989).

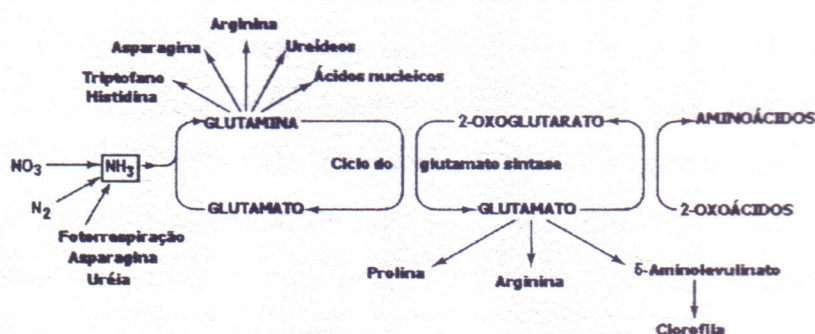
A análise das sub-unidades individuais da GS demonstrou que existem três formas isoelétricas distintas no nódulo (denominado α , β e γ) com uma massa molecular de 43 kDa. Foi indicado que o **GS_{n1}** é composto das sub-unidades β e γ , enquanto que a **GS_{n2}** contém, principalmente, sub-unidades β . Nas folhas, duas isoenzimas principais foram isoladas e indicadas como localizadas no citoplasma (**GS₁**) e no cloroplasto (**GS₂**), respectivamente. A proporção das duas formas isoenzímicas pode variar com a planta estudada e é dependente do tempo de desenvolvimento do tecido (FORD & CULLIMORE, 1989). O cloroplasto compreende

uma sub-unidade maior de 43-45 kDa designada δ . O polipeptídeo é sintetizado nos ribossomos citoplasmáticos e transportados para dentro do cloroplasto depois da remoção de um peptídeo de 4-5 kDa (FORD & CULLIMORE, 1989, LEA, 1993).

Já está bem estabelecido em *P. vulgaris* que a GS é codificada por uma pequena família de multigenes, e muito do que foi previamente descrito da estrutura da sub-unidade, foi explicado a partir de seus genes (FORD & CULLIMORE, 1989). Há similaridade na sequência de aminoácidos relativamente alto (74%) entre o cloroplasto e as sequências citoplásmicas. Tem sido questionado que os dois genes originam-se da duplicação de um gene nuclear pré-existente, seguida de modificações. Desde que as cDNAs de GS₂ de duas dicotiledôneas estão mais estreitamente associadas à GS₂ de cevada do que às sequências da GS₁ de dicotiledôneas, parece que a duplicação e a divergência do gens ancestral da GS precedeu a divergência de monocotiledôneas e dicotiledôneas (FORD & CULLIMORE, 1989; LEA, 1993).

A aparência da GS nos cloroplastos das folhas é aparentemente regulada pela luz (CORUZZI, 1991). Nas folhas de trigo, a atividade da enzima aumenta com a idade da folha (CORUZZI, 1991; LEA, 1993) e há uma clara correlação com a capacidade fotossintética e fotorrespiratória. Em ervilhas, o mRNA de GS₂ aumenta cerca de 20 vezes mais, dentro de 72 horas de iluminação das partes aéreas estioladas, enquanto que mRNA de GS₁ não é afetado (CORUZZI, 1991; LEA, 1993). A atividade da GS da planta tem sido indicada aumentar várias vezes, durante a nodulação de muitas espécies de leguminosas. Este aumento ocorre, mais ou menos, ao mesmo tempo em que a nitrogenase é expressada no bacterióide do *Rhizobium* e a leghemoglobina é produzida no citosol da célula da planta. O aumento no mRNA de GS durante a nodulação de *P. vulgaris* pode ser calculado por uma forte indução do gens *gln- γ* (FORDE & CULLIMORE, 1989; LEA, 1993)

A assimilação de amônia nas plantas superiores ocorre, preferencialmente, através do ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase). Esta segunda enzima é responsável pela transferência do grupo amido da glutamina para o 2-oxoglutarato, a fim de produzir duas moléculas de glutamato (LEA *et al.*, 1990; LEA, 1993, 1997). Duas formas diferentes de glutamato sintase estão presentes nas plantas superiores: uma utiliza ferredoxina reduzida como uma fonte redutora, e a outra utiliza NADH (LEA *et al.*, 1990; LEA, 1993, 1997). A operação combinada da GS e glutamato sintase na assimilação de amônia está indicada no esquema a seguir.



Extraído e adaptado de LEA (1993).

Um ponto interessante que tem surgido firmemente nos estudos sobre o metabolismo do nitrogênio nas plantas superiores é que a amônia é continuamente formada, durante vários processos metabólicos (MENGEL & PILBEAN, 1991; LEA, 1993).

Os grupos amino de todos os outros aminoácidos podem ser canalizados através do glutamato, liberando 2-oxoácidos que podem ser metabolizados para produção de energia (MENGEL & PILBEAN, 1991; LEA, 1993). Está claro que, depois da entrada de nitrogênio como nitrato nas raízes, a amônia pode ser liberada em um número de ocasiões diferentes, antes da deposição final de nitrogênio na proteína armazenada da semente. Em cada ocasião a amônia é rapidamente reassimilada dentro da posição amida da glutamina, catalisada pela enzima glutamina sintetase. A maior parte do nitrogênio amídico é transferido para outros aminoácidos via glutamato sintase, mas algum pode ser usado diretamente (MENGEL & PILBEAN,

1991; LEA, 1993). A confirmação da importância da reciclagem da amônia foi obtida pelo uso de inibidores específicos da glutamina sintetase, a sulfoximina metionina e fosfotricina. (LEA, 1991; LEA, 1993).

A evidência chave que diz respeito à importância da fotorrespiração na produção de amônia foi obtida usando-se mutantes das plantas C_3 onde falta ou a glutamina sintetase cloroplástica (cevada) ou a glutamato sintase dependente de ferredoxina (cevada, *Arabidopsis* e ervilha). Tais mutantes são incapazes de assimilar a amônia liberada durante a conversão de glicina para serina na fotorrespiração. As plantas mostram sintomas rigorosos de estresse, quando expostas ao ar a 0,034% de dióxido de carbono, mas crescem normalmente no ar a 0.7% de dióxido de carbono, quando a fotorrespiração é suprimida. O metabolismo das plantas tratadas com fosfotricina e deficientes de glutamina sintetase é notadamente semelhante e apoia bem claramente a sugestão de que o caminho da fotorrespiração (LEEGOOD, 1993) é quantitativamente, e em grau considerável, o mais importante caminho metabólico necessitado de nitrogênio nas folhas das plantas C_3 (LEA *et al.*, 1990; LEA, 1991; LEEGOOD, 1993; LEA, 1993). O NADPH e o ATP gerados pelos dois fotossistemas da fotossíntese, podem ser utilizadas para a síntese de uma grande quantidade de outros compostos nitrogenados, tais como aminoácidos e lipídios (LEEGOOD, 1993; LEA, 1993).

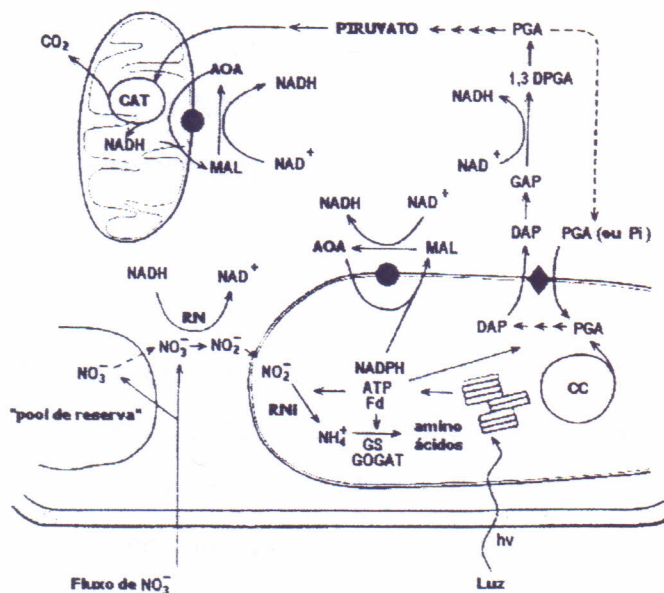
1.2.3.2.1 Regulação da utilização de nitrato em plantas superiores

Em quase todas as plantas a única forma de RN é a enzima dependente de NADH, que é substrato-induzível. Outros tipos de RN, ativos com o NADH e o NADPH, tem sido observados por BEEVERS & HEGEMAN, 1983. Isto tem sido estudados mais extensivamente em folhas de soja (NELSON *et al.*, 1986), onde sua síntese é constitutiva.

Visto que a redutase do nitrito (RNi) está localizada no cloroplasto das folhas (ou plastídeos de raiz) e o NO_2^- não se acumula, uma associação da redutase do

nitrato(RN) com o cloroplasto é comumente considerada. A maioria dos estudos sobre fracionamento celular tem indicado que a redutase do nitrato(RN) não estava presa a nenhuma organela da célula (LEECH & MURPHY, 1976). Um estudo imunocitoquímico do cotilédone de soja (VAUGHN *et al.*, 1984) indicou que a redutase do nitrato (RN) está localizada no citosol, com altas concentrações na periferia da célula, e ainda, associada com o cloroplasto.

Estudos semelhantes com *Neurospora* (ROLDAN *et al.*, 1982) mostraram que a redutase do nitrato estava localizada na região da plasmalema, parede celular e tonoplasto, uma descoberta relevante para a observação de que há uma íntima relação entre a absorção e a redução do nitrato em tecidos de raízes. As vesículas contendo nitrato, detectadas no citosol de cotilédones de soja (VAUGHN & DUKE, 1981), poderiam transportar este íon para os plastídeos, para posterior redução. O esquema a seguir mostra as principais inter-relações entre fotossíntese (cloroplastos), respiração (mitocôndrios), mobilização de NO_3^- (xilema e vacúolos) e assimilação de nitrato em folhas de plantas superiores.



Extraído e adaptado de WALLACE (1987).

Usando anticorpos específicos para redutase do nitrato (RN) tem sido confirmado para folha de cevada (SOMERS *et al.*, 1983) e para cotilédone de pepino

(ULITZSCH & SCHIEMANN, 1984) que a proteína redutase do nitrato não está presente na ausência de NO_3^- . Aumentos na atividade da redutase do nitrato, induzidos por nitrato, igualou à síntese da enzima. Quando o fornecimento de NO_3^- para a folha de cevada foi interrompido, a quantidade da proteína redutase do nitrato estava ligeiramente menor que o decréscimo na atividade. Nenhum produto da degradação da enzima foi detectado. CAMPBELL & REMMLER(1986), melhorando os procedimentos imunológicos para a análise da proteína redutase do nitrato, estudaram mudanças da enzima foliar após transferir da luz para o escuro.

O estudo de ZIELKE & FILNER (1971), com cultura de células de tabaco, indicaram que a redutase do nitrato possui uma taxa constante de degradação, independentemente de qualquer forma de síntese da enzima que esteja ocorrendo. Assim, a quantidade de redutase de nitrato reflete o excesso de sua síntese sobre a degradação. A instabilidade *in vivo* da redutase do nitrato está correlacionada com a sua suscetibilidade à proteólise *in vitro*. Uma endopeptidase serínica dependente de tiol, que promove uma proteólise inicial limitada de redutase do nitrato, foi caracterizada (WALLACE & OAKS, 1986). A redutase do nitrato, parece ter sítios proteoliticamente sensíveis, que poderiam ser expostos por mudanças conformacionais. O NO_3^- ou o NADH não alteram a sensibilidade da redutase do nitrato ao ataque da endopeptidase referida acima, mesmo que o NO_3^- tenha mostrado reduzir *in vivo* o declínio da redutase do nitrato de folhas e raízes de milho (ASLAM & OAKS, 1976).

A remoção do nitrato externo resulta numa rápida interrupção da redução do NO_3^- (1 hora) nos tecidos das plantas, mesmo com o NO_3^- endógeno ainda presente (FERRARI *et al.*, 1973). WALLACE (1987) observou que há dois *pools* de NO_3^- ; um pequeno, denominado como um *pool metabólico* (citosólico) que determina a atividade da redutase do nitrato e um inacessível ou *pool de armazenamento* (vacuolar). Várias tentativas têm sido feitas para estabelecer o tamanho do *pool metabólico*, mas tais estudos não mostram que a acumulação de nitrito (NO_2^-) sob anaerobiose (redutase do nitrito inibida), como proposto por FERRARI *et al.*, 1973, é um indicativo confiável da quantidade de NO_3^- no *pool metabólico*.

Contudo, dados evidentes não tem sido estabelecidos sobre o tamanho do *pool metabólico* de NO_3^- . ASLAM *et al.*, 1976, demonstraram que: (1) Existe uma correlação entre o tamanho do *pool metabólico* e a atividade de redutase do nitrato; (2) a absorção a partir do meio externo para o *pool metabólico* é estimulado por glicose na raiz e por luz e/ou glicose na folha; (3) o acesso do NO_3^- do *pool de armazenamento* para o *pool metabólico* na folha é influenciado pela luz, mas não por glicose. O nível de nitrato (NO_3^-) no *pool metabólico* também controla a taxa de síntese da redutase do nitrato. Indução ótima da síntese é obtida com níveis relativamente baixos de nitrato (BARNEIX *et al.* 1984), mas o aumento na atividade da redutase de nitrato continua após a taxa máxima de redução do nitrato ter sido obtida (CHANTAROTWONG *et al.*, 1976). Níveis altos de nitrato, que tem também um pequeno ou insignificante efeito sobre a indução da redutase de nitrato, aumentam a atividade "steady-state" da enzima (WALLACE, 1986).

A absorção líquida do nitrato para dentro das raízes é o balanço do influxo sobre o efluxo (MORGAN *et al.*, 1973). Tem sido proposto por MACKOWN *et al.* (1983), que existem dois tipos *pool de armazenamento* de nitrato (NO_3^-) na raiz, um associado com a translocação para o xilema e o outro ligado ao efluxo a partir da raiz e possivelmente redução subsequente. A redução do nitrato (NO_3^-) está intimamente associada com a sua absorção para dentro da célula da raiz; ocorrendo também durante ou imediatamente à sua passagem pela plasmalema (MACKOWN *et al.*, 1983 e MORGAN *et al.*, 1985). A absorção e redução não são obrigatoriamente processos acoplados (MORGAN *et al.*, 1985) como originalmente proposto por BUTZ & JACKSON (1977). Em tecido de raiz, parece existir uma restrição à redução de nitrato endógeno, quando o nitrato do ambiente está sendo utilizado. Além disso, tem sido proposto que o nitrato endógeno é somente reduzido após o efluxo e a reabsorção do mesmo pela raiz. Esta reciclagem de nitrato endógeno garante que ele é somente reduzido quando outras fontes são indisponíveis (WALLACE, 1987).

SHANER & BOYER (1976 a e b) demonstraram que o fluxo de nitrato para as folhas de milho tem uma grande influência na atividade da redutase do nitrato. O fluxo de nitrato na corrente transpiratória foi de $150 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ MS comparado com

$10 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, estocado no vacúolo. Assim, quando o fluxo de nitrato para a folha foi reduzido, houve um rápido e correspondente decréscimo da atividade de redutase do nitrato. A atividade da redutase do nitrato na folha de milho estava em excesso, mais do que o requerido para reduzir o nitrato disponível. A entrada de nitrato seria rapidamente reduzida e o tamanho do *pool metabólico* controlado pelo fluxo para a célula da folha. Em plantas de girassol, transferidas para local de baixa iluminação, o decréscimo da atividade da redutase do nitrato nas folhas estava correlacionado com a diminuição do fluxo de nitrato para a parte aérea (UDAYAKUMAR *et al.* 1981).

A atividade da redutase do nitrato medida por ensaio *in vivo* pode ser acentuada pela adição de gliceraldeído-3-fosfato ou outro ácido orgânico do ciclo de Krebs (BEEVERS & HAGEMAN, 1983). A utilização desses substratos no tecido gera NADH e um aumento acentuado da atividade da redutase do nitrato, mostrando que a redutase do nitrato é limitada pela disponibilidade de NADH. Contudo, DRY *et al.* (1986) chamaram a atenção que as condições anaeróbicas escuras, usadas no ensaio *in vivo* para redutase do nitrato, não podem refletir adequadamente o metabolismo na luz e em condições aeróbicas. Medidas da atividade da redutase de nitrato *in vivo* tem mostrado, com exceções de algumas leguminosas, que a RN é principalmente encontrada em folhas (WALLACE, 1987). CAMPBELL & REMMLER (1986), usando um procedimento imunoquímico, estimaram o conteúdo da redutase de nitrato de folhas de milho foi 10 vezes maior que em raízes, sendo a mesma encontrada em leguminosas da tribo *Viciae* e *Lupin* (WALLACE, 1986).

A redução de NAD^+ no citosol poderia estar ligada a lançadeiras de metabólicos do cloroplasto ou da mitocôndria. Estes pontos de vista, são revisados por ABROL *et al.*, (1983), enquanto NAIK & NICHOLAS (1986) têm discutido a evidência de um elo entre o metabolismo do malato e a assimilação do nitrato. DRY *et al.* (1986) argumentaram que nos ensaios anaeróbicos escuros usados, a probabilidade da redutase do nitrato de usar o NADH mitocondrial é aumentada. Estes pesquisadores, também demonstraram que enquanto a redução do NAD^+ ocorre na mitocôndria, na luz, por oxidação da glicina na fotorrespiração, uma

quantidade equivalente de NADH é requerida para a redução do hidroxipiruvato no peroxissomo. Este passo da taxa de fotorrespiração sendo consideravelmente mais significativa do que a assimilação do nitrato. Assim, em competição com o ciclo da fotorrespiração, o acesso da redutase do nitrato aos equivalentes redutores da mitocôndria seria limitado. DRY *et al.* (1986) concluíram que o NADH requerido para a redução do nitrato é mais apropriado para ser suprido pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, utilizando trioses fosfatos exportado do cloroplasto. Contudo, a disponibilidade de trioses fosfatos nas folhas dependerá da taxa de síntese de amido e sacarose.

Importantes contribuições para o estudo da assimilação e partição do nitrato nas plantas são os trabalhos utilizando o $^{15}\text{N-NO}_3^-$ (WALLACE, 1987). Em 1 hora após o suprimento de $^{15}\text{N-NO}_3^-$ para as raízes milho do miúdo, milho e soja, 63-76% do ^{15}N reduzido achado na planta, na luz, foi na parte aérea. A assimilação de nitrato da raiz, continuou no escuro com a mesma taxa que na luz (WALLACE, 1987) enquanto que na parte aérea, em 27-42% da taxa na luz. No período experimental de 1 hora, não seria de se esperar, significativa retranslocação de ^{15}N reduzido, especialmente da parte aérea para a raiz. A análise do exudato de soja, mostrou que somente 7-9% do ^{15}N alcança o xilema, sendo reduzido na raiz (WALLACE, 1987).

Apesar da energia predominante da assimilação de nitrato da folha está ligada à fotossíntese (SCHRADER & THOMAS, 1981), uma taxa significativa de redução ocorre no escuro e também, na raiz. O nível dessa assimilação no escuro depende, largamente, das reservas de carboidratos da planta. KOW *et al.* (1982) têm descrito um mecanismo para o suprimento de equivalentes redutores para a redução do NO_2^- , no escuro, nos cloroplastos. Muitas observações têm sido feitas sobre as flutuações diurna da atividade da redutase do nitrato. Estas podem ser largamente explicadas por alterações no fluxo de nitrato para a parte aérea e a disponibilidade de carboidratos, mas outros fatores, tal como o fitocromo (DUKE & DUKE, 1984), podem exercer algum papel. Fitohormônios poderiam ter uma influência indireta pelo seu efeito na partição do carbono na planta (CRAFTS-BRANDNER *et al.*, 1983).

REMMLER & CAMPBELL (1986) demonstraram que, em folhas de milho transferidos para o escuro, houve um decréscimo de 30% na atividade da redutase do nitrato dessas folhas, em 1 hora. Nenhuma mudança ocorreu na quantidade da proteína redutase do nitrato ou na disponibilidade de carboidratos. Um inibidor da proteína redutase do nitrato (massa molecular de 31 KDa) em folhas de soja, foi inativado na luz (JOLLY & TOLBERT, 1978), enquanto LEONG & SHEN (1982) demonstraram que um inibidor da proteína redutase do nitrato na parte aérea de arroz, foi induzido no escuro. LILLO & HENRIKSEN (1984), acharam que a redutase do nitrato, em folhas de cevada, foi rapidamente convertida a uma forma mais ativa, mas menos estável na luz. Em contraste, JONES & MHUIMHNEACHÁIN (1985) observaram que, em folhas de trigo, altas atividades da redutase do nitrato na luz foram correlacionadas com o decréscimo instável em extratos brutos.

SHERRARD *et al.* (1979) encontraram que o aumento na atividade da redutase do nitrato em presença de luz, se correlacionava com a diminuição no nível do inibidor da proteína redutase do nitrato e com o aumento na atividade de duas moléculas protetoras de redutase do nitrato. A completa significância destes protetores de redutase do nitrato, não é entendido (WALLACE & OAKS, 1986), embora a ligação do inibidor para redutase do nitrato de arroz tenha sido demonstrado (SOLOMONSON *et al.*, 1984 b). Fatores metabólicos e fisiológicos podem apenas explicar parcialmente as flutuações na atividade da redutase do nitrato durante o dia. Mudanças na quantidade da redutase do nitrato também ocorrem, presumivelmente, devido as alterações na taxa de síntese (WALLACE, 1987).

1.2.3.3 Fixação do nitrogênio e o déficit hídrico

Crescem as evidências de que a fixação do nitrogênio é mais sensível ao estresse do que a absorção do nitrogênio mineral (HABISH & MAHDI, 1976). Apesar disso, os efeitos da seca sobre a fixação do nitrogênio foram mais do que negligenciados até poucos anos atrás. A literatura sobre as plantas superiores, até 1975, foi revista por SPRENT (1976). Desde então, mais informações se tornaram

disponíveis sobre os efeitos da umidade do solo sobre rhizobium spp., infecção dos pêlos da raiz da leguminosa, e nos vários aspectos da fixação do nitrogênio pelos líquens. Nenhum dos trabalhos publicados considera os mecanismos de resistência, dos sistemas de fixação do nitrogênio, à seca em si (SPRENT, 1981).

Tem sido investigado o efeito da falta de água em plantas leguminosas, especificamente em feijões com relação à sua capacidade de fixar N_2 (SPRENT, 1972 a). Em soja, o decréscimo da atividade da nitrogenase foi relacionada à diminuição da capacidade de energia dos nódulos (PETTERSON *et al.*, 1979) e às mudanças nas medidas do *pool* de fotossintetatos (FINN & BRUN, 1980). Porém, o declínio na atividade de fixação de N_2 durante o estresse não pareceu correlacionado com a disponibilidade de carboidrato, visto que um grande acúmulo de sacarose foi encontrado em nódulos estressados de soja (FELLOWS *et al.*, 1987).

Por outro lado, o estresse hídrico induziu um declínio de 5% na fotossíntese em soja, enquanto a redução do C_2H_2 do nódulo mostrou um decréscimo de 70% (DURANT *et al.*, 1987), mostrando o envolvimento de outros mecanismos na diminuição da fixação do N_2 . Assim, a possibilidade de um aumento na resistência à difusão de O_2 do córtex do nódulo para o tecido central tem sido proposto (DURANT *et al.*, 1987 e GUERIN *et al.*, 1990). Pouca informação está disponível no que concerne ao efeito do déficit de água sobre os bacterióides (PANKHURST & SPRENT, 1975 e GUERIN *et al.*, 1990).

A capacidade de sobrevivência e multiplicação dos rhizobium de vida livre no solo é claramente um pré-requisito para a fixação do nitrogênio. As espécies de rhizobium são freqüentemente classificadas com base em sua capacidade de crescer rapidamente, ou vagarosamente, no meio de extrato de fungo. As espécies que crescem rápido, as quais infectam as ervilhas, feijões (tipos *Vicia* e *Phaseolus*) e trevos, são menos capazes de sobreviver em solos secos do que as espécies que crescem devagar, as quais infectam os feijões de soja e as lupínias. Ao investigarem as razões para isto, BUSHBY E MARSALL (1977) não puderam achar nenhuma diferença na permeabilidade à água.

O grupo de crescimento lento, no entanto, retinha muito menos água do que o grupo, suscetível de equilíbrio, de crescimento rápido no solo seco. Foi concluído que as espécies de crescimento rápido possuem uma afinidade maior com a água do que as espécies de crescimento lento, como uma consequência de terem mais energia disponível para a absorção de água (SPRENT, 1981). Foi sugerido que (i) o equilíbrio do conteúdo interno de água dos rhizobium de crescimento lento no solo seco é suficientemente baixo para capacitá-los a sobreviverem à desidratação, por terem uma taxa metabólica muito baixa, e (ii) as rhizóbias de crescimento rápido não têm um conteúdo de água com equilíbrio suficientemente baixo e são, então, prejudicados.

WORRALL & ROUGHLEY (1976) não encontraram nenhum efeito do estresse hídrico sobre as populações de rhizobium na rizosfera das plantações de *Trifolium subterraneum* inoculadas e concluíram que os efeitos do estresse sobre a infecção e a nodulação estavam relacionados com a fisiologia do pêlo da raiz. Uma diminuição na umidade do solo de 5,5 para 3,5 % resultou em pêlos pequenos e grossos, mais do que os normais, longos e finos. Os pêlos parcialmente crescidos retomaram o crescimento na reirrigação e somente os pêlos da raiz que cresciam normalmente foram capazes de ser infectados com os rhizobium. Uma vez que a falha na nodulação em solo seco pode ser uma ocorrência comum (HABISH & MAHDI, 1976), uma procura por plantas que possam desenvolver os pêlos da raiz em potenciais baixos de água poderia ser vantajosa. Esta característica poderia ser também acompanhada de um hábito de enraizamento profundo, uma adaptação conhecida em algumas leguminosas de regiões áridas e semi-áridas, embora tais plantas não sejam sempre encontradas como naturalmente bem noduladas (por exemplo, *Trigonella arabica*) (HELY & OFER, 1972).

Em seguida à infecção pelos rhizobium, os nódulos são induzidos para se formarem no córtex da raiz. O padrão geral parece ser semelhante em todas as espécies estudadas, mas há diferenças em detalhes que podem ser significativas na resistência à seca. Estas diferenças são relativas ao diâmetro da raiz e à posição no córtex (superficial ou profundamente enterrado) onde a atividade meristemática

começa. As raízes de diâmetro pequeno (cerca de 1mm ou menos), como são encontradas no trevo branco (*Trifolium repens*), e as raízes laterais de leguminosas, tais como a *Vicia faba*, têm córtex que possuem largura apenas de cerca de 6-12 células, enquanto que as raízes jovens de *Vicia faba*, por exemplo, têm de 3-5 mm de diâmetro e têm córtex largos, com muitas células. Na *Vicia faba*, os nódulos se elevam muito perto da endoderme e podem não emergir por 2-3 semanas, dependendo das condições ambientais.

GALLACHER & SPRENT (1978) acharam que um ambiente com limitação de água parava o desenvolvimento dos nódulos da *Vicia faba*, os quais tinham sido iniciados previamente com pleno fornecimento de água. Em troca de um suprimento adequado de água, esses nódulos retomavam o crescimento. Não há dados correspondentes disponíveis para mais nódulos formados superficialmente, porém é possível que os nódulos de origem profunda sejam mais capazes de resistir a períodos de estresse hídrico. Os nódulos são classificados em dois grandes grupos, indeterminados, (às vezes ramificados), os quais têm um meristema apical e são, normalmente, de uma relativa longa vida (de algumas semanas a indefinidamente), e esféricos determinados, os quais possuem um meristema não persistente e uma relativa vida curta (poucas semanas). Os nódulos de *Trifolium spp.* (trevo), e de *Pisum sativum* (ervilha) são exemplos do primeiro grupo; os de *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Vigna unguiculata* (caupi) são exemplos do segundo (SPRENT, 1981).

As observações sobre trevo branco (*Trifolium repens*) (ENGIN & SPRENT, 1973) e *Vicia faba* (SPRENT, 1972 b) mostraram que os nódulos com um meristema persistente podem retomar o crescimento após um rigoroso estresse hídrico, enquanto que o tipo determinado (soja) pode ser irreversivelmente prejudicado por um estresse equivalente (SPRENT, 1971, 1972 a). Esta resistência pode ocorrer pelo fato de que as células do meristema são não vacuoladas. Mesmo nos nódulos suscetíveis da soja, as últimas células a mostrar sinais de dano ultra-estrutural são as não-vacuoladas. WAHAB & ZAHRAN (1979) confirmaram esses achados e os estenderam para a ervilha e o caupi. Se os nódulos do tipo esférico são estressados

além do ponto de recuperação, eles podem murchar ou ter o crescimento interrompido; em qualquer dos casos, a planta tem de produzir um novo produto de nódulos em troca de fornecimento de água adequado. Isto pode ser uma vantagem ou uma desvantagem, dependendo das condições. Raiz renovada e crescimento de nódulo poderiam ocorrer numa camada de solo diferente, a qual pode ser menos afetada por períodos de estresse subsequentes. Por outro lado, a produção de novos nódulos pode reduzir bastante as reservas da planta, como foi demonstrado claramente para a caupi, durante a recuperação ao estresse de alagamento. Quando o excesso de água é retirado, grande parte das reservas da planta são dierecionadas à produção do nódulo que cresce temporariamente e cessa quando os novos nódulos começam a fixar nitrogênio (HONG *et al.*, 1977).

As exigências de um nódulo efetivo são complexas; a água é a maior, não apenas para manter a turgescência da célula, como também para transportar substâncias para dentro e para fora dos nódulos. Embora muito da água necessária seja obtida diretamente do solo ou do sistema radicular, via xilema, uma quantidade significativa pode chegar como compostos de carbono via floema. MINCHIN & PATE (1973) avaliaram que dos 0,35ml de água necessários pelos nódulos de ervilha para exportar 1mg do N fixado, quase metade pode ser fornecida via floema. Assim, qualquer limitação da translocação poderia afetar a fisiologia do nódulo, reduzindo os fornecimentos essenciais tanto dos componentes orgânicos, como de água. Os compostos de carbono são necessários como recipientes da amônia produzida pela redução do nitrogênio e, como em qualquer sistema vivo, isto está inevitavelmente combinado com os problemas de perda de água. Tanto o *Phaseolus vulgaris* como a *Glycine max* têm nódulos determinados, que carecem de células de transferência (SPRENT, 1981).

PATE (1976) discutiu o problema de se fazer comparações entre as plantas, cujos nódulos têm células de transferência e àquelas que não os têm, por causa de inúmeras outras diferenças que também ocorrem. As seguintes propostas, as quais são experiências anatômicas e fisiológicas, sugerem que a presença ou a ausência de células de transferência podem estar ligadas com diferenças fundamentais nos

sistemas de transporte de nódulos determinados e indeterminados. Nos nódulos com meristemas apicais, o crescimento continua por um tempo considerável, juntamente com a extensão do sistema vascular, o qual permanece descontínuo por toda parte (SPRENT, 1981). Em um determinado nódulo maduro, os vestígios vasculares se misturam no ápice (FRASER, 1942). Então, um sistema vascular fechado é formado, o qual pode ser considerado uma alça ramificada do tecido vascular da raiz oposta (SPRENT, 1981).

Em ambos os tipos de nódulos, a água pode passar através do sistema vascular ao longo do potencial de água estabelecido entre os múltiplos locais de junção, onde o sistema vascular do nódulo se une com o da raiz. A proporção do fluxo transpiratório ao longo da raiz, o qual passa através do nódulo, dependerá de resistências relativas ao fluxo no xilema da raiz e no xilema do nódulo, entre os locais de entrada e saída. O fluxo transpiratório através do xilema do nódulo será também fortemente influenciado pela absorção direta, pelo nódulo, da água do solo circundante e pelo movimento, através do nódulo, da água do solo circundante. A importância relativa deste caminho dependerá da quantidade da umidade do solo em volta do nódulo, da área de superfície do nódulo, da permeabilidade da epiderme do nódulo, dos potenciais de água e das resistências ao fluxo (SPRENT, 1981).

Quando o solo circundante do nódulo está seco, um fluxo intermitente de água vinda do nódulo também é possível. Durante o dia, quando a planta está transpirando, a água será retirada pelo nódulo e o potencial de água do nódulo cairá. À noite, na ausência da transpiração, e com o re-estabelecimento do equilíbrio da água no solo e no sistema radicular, a água fluirá de volta para o nódulo e elevará o potencial de água. Este modelo permite o fluxo de um pequeno volume de água uma vez ao dia, mas as flutuações na pressão ou transpiração da raiz poderiam resultar em fluxos intermitentes mais freqüentes. Em cada um desses possíveis mecanismos, a exportação, via xilema, é intermediada pelo fluxo transpiratório e a evidência considerada acima é consistente com isto (SPRENT, 1981).

Uma resistência maior ao movimento da água, através do nódulo indeterminado, poderia sujeitar o sistema de transporte a restrições tanto no espaço (dentro de elementos diferentes do xilema) como no tempo (separação de períodos de importação e exportação) ou ambos. Essas restrições poderiam levar a exigências para (i) um sistema particularmente eficiente de carga e descarga, necessitando da formação de células de transferência, ou (ii) a exportação de produtos altamente solúveis, os quais amortecem contra flutuações na taxa de transpiração. No momento, não é possível dizer se o tipo de nódulo determinado ou indeterminado é o mais resistente ao estresse. Pode ser significativo, porém, que o desenho determinado é o mais comum em leguminosas cuja origem tem base em regiões tropicais ou sub-tropicais (SPRENT, 1981).

PATE *et al.* (1969) reportaram que os nódulos da *Vicia faba* exportam asparagina de maneira concentrada e altamente seletiva, próximo aos limites de sua solubilidade. A chave para esta eficiência, pode residir na existência de abundantes células vasculares de transferência. MINCHIN & PATE (1973), trabalhando com *Pisum sativum*, que tem nódulos geralmente semelhantes na estrutura aos da *Vicia faba*, demonstraram que a concentração de materiais nitrogenados nos nódulos estava associada com a taxa de transpiração. Quando as taxas de transpiração eram altas, os compostos nitrogenados eram livremente transportados para fora dos nódulos; quando elas estavam baixas, eles se acumulavam. Posteriormente, PATE (1976), concluiu que os nódulos normalmente se ajustavam a largas variações no potencial de água da planta hospedeira (taxa de transpiração) e podiam, também, ser capazes de exibir uma adaptabilidade maior, durante períodos de estresse ambiental (SPRENT, 1981). Esta adaptabilidade exige que o produto nitrogenado de exportação do nódulo seja suficientemente solúvel para que ele permaneça em solução (SPRENT, 1981).

A Alantoina e o ácido alantóico são os principais compostos nitrogenados exportados pelos nódulos e são muito mais econômicos com relação ao carbono do que as amidas e aminoácidos (asparagina, glutamina e citrulinas). Isto poderia facilmente impor uma restrição de transporte sob condições de estresse da seca.

Tantos estes componentes como as amidas são transportados pelo *Phaseolus vulgaris* (PATE, 1971) e *Glicinia max* (TAJIMA *et al.*, 1977; ANTONIW & SPRENT, 1978; PATE, 1971). Seria interessante saber se o equilíbrio entre os dois tipos de componentes exportados varia com o estresse hídrico ou com a temperatura (SPRENT, 1981).

Há muita evidência de que os fornecimentos fotossintéticos podem limitar a atividade do nódulo (HARDY & HAVELKA, 1976). Em geral, a situação pode se tornar muito mais aguda nas espécies anuais do que nas espécies perenes, desde que estas últimas tendem a possuir maiores reservas de carboidrato. A soja parece ser uma das espécies mais sensíveis neste sentido. HUANG *et al.* (1975) concluíram que todos os efeitos do estresse da seca sobre a fixação do nitrogênio nestas espécies poderiam ser explicadas na base da reduzida fixação do carbono, mas TU & HIETKAMP (1977) consideraram que os efeitos diretos sobre os nódulos também eram operantes. Não pode haver dúvida de que, mais cedo ou mais tarde, uma redução na fixação do carbono afetará a atividade do nódulo (SPRENT, 1981).

A resistência ao estresse hídrico, provavelmente, se baseia no armazenamento do fotossintetato no nódulo. Mesmo as espécies anuais variam consideravelmente em sua dependência dos fornecimentos do fotossintetato recentemente fixado, como é provado pelas (i) variações na extensão das flutuações diurnas em atividade, e (ii) variações na taxa pela qual a atividade do nódulo cai, após o início da senescência (SPRENT, 1981). As leguminosas forrageiras, geralmente adaptadas às condições de seca, provavelmente mostrarão efeitos menores de estresse da água sobre a fixação do nitrogênio do que àquelas que não estão bem adaptadas. Por exemplo, o cultivar de terra seca da *Medicago sativa*, foi capaz de crescer, transpirar e fixar nitrogênio (reduzir acetileno) com potenciais mais baixos de água do que o cultivar "Aragon". A recuperação do estresse foi também mais rápida no cultivar adaptado da terra seca (APARICO-TEJO *et al.*, 1980).

Mesmo que um pleno fornecimento de fotossintetato seja disponível, a respiração eficiente no nódulo é necessária para gerar ATPs, importantes em todo o

processo da fixação do nitrogênio. SPRENT (1976) discutiu os efeitos concomitantes do estresse hídrico sobre a fixação do nitrogênio e a respiração do nódulo. Pelo menos, julga-se que uma parte destes efeitos tem por base um aumento da seca, como barreira à difusão do oxigênio nos nódulos. Na soja (SPRENT & GALLACHER, 1976), mas não na *Vicia faba* (SPRENT, 1981), o estresse causou uma transferência de caminho respiratório para produção de etanol. Uma outra diferença entre o tipo determinado (soja) e o indeterminado de nódulo (*Vicia*) é que o primeiro tem lenticelas através das quais há trocas gasosas (PANKHURST & SPRENT, 1975 b). Nenhuma dessas estruturas foram encontradas em nódulos indeterminados e que possam ser capazes de fazer tais trocas gasosas (GALLACHER & SPRENT, 1978). Este fato, acompanhado da falta da produção de etanol, uma maior superfície, e estruturas basicamente cilíndricas, parecem oferecer melhores perspectivas para a resistência à impermeabilidade induzida pela seca.

Certamente, os nódulos que foram produzidos nas plantas de *Vicia* sob estresse hídrico tinham a mesma atividade específica (por exemplo, a atividade por unidade de peso do nódulo) como aqueles produzidos sob um pleno fornecimento de água (GALLACHER & SPRENT, 1978). Eles eram menores, porém, com células menores e mais densas, indicando um grau de adaptação. CUTLER *et al.*, (1977) sugeriram que o tamanho menor da célula pode proporcionar resistência à seca. Em soja (CRISWELL *et al.*, 1977) sugeriram que os nódulos das plantas intactas, como os nódulos destacados e sistemas de raiz nodulados, podiam ser capazes de se ajustarem às variações no suprimento de oxigênio. Como este ajuste é efetuado, ainda, não está claro, mas ele pode capacitar os nódulos do tipo do de soja (esféricos) a ultrapassarem as barreiras da seca impostas à difusão do oxigênio. Parece que as associações da leguminosa x *Rhizobium* têm evoluído em direção a duas estratégias, envolvendo diferenças básicas na estrutura, para maximizar a fixação do nitrogênio. Os nódulos da raiz das plantas não leguminosas, que também são sensíveis ao estresse hídrico, ainda apresentam um outro conjunto de problemas e soluções, uma vez que sua estrutura difere dos nódulos de leguminosas em muitas maneiras (SPRENT, 1981).

1.2.3.4 Assimilação de nitrato e déficit hídrico

Se a atividade da redutase do nitrato durante o déficit hídrico é uma determinante importante do crescimento, supõe-se que deveria haver uma estreita relação entre estes dois parâmetros. Tal relação tem sido mantida por outros fatores, por exemplo, diferenças entre genótipos (DECKARD *et al.*, 1973; SINHA & NICHOLAS, 1981). Quando o crescimento ou a produção é comparado com a atividade da redutase do nitrato por unidade da planta (p.exp. área da folha), uma correlação é freqüentemente encontrado (ABROL & NAIR, 1978). Esta correlação, contudo, não pode ser estreita (DALLING & LOYN, 1977) ou não pode estar presente de modo algum (SINHA & NICHOLAS, 1981).

Se o crescimento ou a produção for comparado com a atividade total da redutase do nitrato por planta, há comumente uma correlação estreita (DECKARD *et al.*, 1973). Espera-se apenas isto, já que a correlação aqui é entre o crescimento de um lado, com a produção resultante do crescimento e a atividade da redutase do nitrato, em uma base unitária, do outro lado. A total atividade da redutase do nitrato por planta será fortemente influenciada pela área da folha, a qual, por sua vez, é dependente de muitos outros fatores (SINHA & NICHOLAS, 1981, FERRARIO *et al.*, 1998; FOYER *et al.*, 1998). O déficit da água e recuperação após um período de estresse marcaram efeitos na retenção e no crescimento da folha (TAIZ & ZEIGER, 1991) o que afetará toda a capacidade da planta para a redução do nitrato. Ao avaliar os efeitos do estresse na assimilação do nitrato, tem que ser levado em conta a influência da atividade da redutase do nitrato, mas também as variações na área da folha.

HANWAY E ENGLEHORN (1958) forneceram provas de que o acúmulo de nitrato nas plantas é devido a vários fatores, dentre os quais, a seca sendo, possivelmente, o mais importante. Nas culturas irrigadas, não ocorre o acúmulo do nitrato, a menos que a aplicação de nitrogênio seja excessiva. Já havia sido demonstrado que o nitrato acumulado em várias plantas seria responsável pela

toxidez à planta (MAYO, 1985). Esta foi a preocupação que incitou a investigação inicial do problema dos efeitos da seca sobre a redutase do nitrato (MATTAS & PAULI, 1965; YOUNIS *et al.*, 1965).

A redutase do nitrato foi também considerada importante, em relação ao metabolismo do nitrogênio e ao crescimento da planta. HAGEMAN *et al.*, 1961 demonstraram que a intensidade da luz e a disponibilidade do nitrato tinham um forte efeito sobre esta enzima, tendo em vista que o milho crescia em pouca luz quando o nitrato foi acumulado. Os estudos de MATTAS & PAULI 1965 e YOUNIS *et al.*, 1965, tiveram por alvo examinar o relacionamento entre a atividade da redutase do nitrato e o metabolismo do nitrogênio, particularmente o "pool" de aminoácidos livres e o conteúdo de proteína do tecido, sob condições de seca e alta temperatura.

O crescimento das plântulas declinou no 4º dia do estresse, quando a turgescência relativa tinha caído para 77%. A taxa de aumento no nitrogênio total por planta também caiu após o 3º dia e, após isso, permaneceu baixa (MATTAS & PAULI, 1965). Durante essas experiências, o conteúdo do nitrato da planta aumentou por toda parte e a atividade da redutase do nitrato declinou, mesmo no 1º dia, quando a turgescência relativa tinha caído para apenas 2%. No 2º dia do estresse, a atividade da enzima caiu para cerca de 25% da atividade no primeiro dia (SINHA & NICHOLAS, 1981). Ficou claro, com esta investigação, que a redutase do nitrato era extremamente sensível ao estresse da água e foi inibida mais rapidamente do que a absorção do nitrato. Nesta experiência, contudo, os efeitos da seca e da temperatura não puderam ser separados (SINHA & NICHOLAS, 1981).

YOUNIS *et al.*, 1965, tentaram separar os efeitos da temperatura, do estresse da água e da luz. O aumento da temperatura sob o crescimento das plantas de 25 °C/20 °C para 35 °C/30 °C causou apenas uma diminuição de 28% no conteúdo do nitrato, mas diminuiu a atividade da redutase do nitrato para 49%. O estresse da água diminuiu o conteúdo do nitrato para um máximo de 25%, mas a atividade da redutase do nitrato foi reduzida de cerca de 48-63% além da ordem de combinações de temperatura testadas. Uma alta temperatura diminuiu a atividade da enzima e

este efeito foi acentuado pelo estresse da umidade. Estes estudos não elucidaram o motivo da perda de atividade, embora pareça ser um dos primeiros efeitos do estresse da água.

Os efeitos de um estresse brando de água, variando o potencial de água da folha de - 0,2 a - 0,4 MPa, sobre a atividade da redutase do nitrato, da redutase do nitrito, da fosfoenolpiruvato carboxilase, da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, do conteúdo de nitrato e do conteúdo de proteína da cevada foram examinados por HUFFAKER *et al.*, 1970 que também estudaram a recuperação desses sistemas, em seguida à irrigação. Os resultados demonstram que a redutase do nitrato foi afetada de maneira mais acentuada do que o foi a redutase do nitrito. A concentração do nitrato nos tecidos da folha foi menos afetada do que o foi a atividade da redutase do nitrato. As atividades das duas enzimas fotossintéticas, fosfoenolpiruvato carboxilase e a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, foram também consideravelmente menos sensíveis ao estresse da água do que a redutase do nitrato. Além do mais, a diminuição no conteúdo da proteína foi também relativamente menor do que a perda da redutase do nitrato.

Numa tentativa de interpretar o significado fisiológico da inibição da redutase do nitrato durante o estresse da água, HUFFAKER *et al.* (1970) enfatizaram a importância da sequência de fatos, em relação ao estresse hídrico. Se os processos tais como expansão e divisão da célula são os primeiros a serem influenciados, e o crescimento reduzido é a consequência desses fatos, segue-se, então, que as necessidades de proteína das células seriam reduzidas. De acordo com isso, a resposta da redutase do nitrato deve ser considerada a partir deste ponto de vista.

Ao estudar os efeitos do estresse da água sobre a atividade de várias enzimas, BARDZIK *et al.*, 1971, escolheram a redutase do nitrato, fenilalanina amônia liase e a NADH oxidase. As duas primeiras são conhecidas por terem uma meia vida relativamente curta. Um déficit de água de 10-20% causou uma redução de 50% nas atividades da redutase do nitrato e na fenilalanina amônia liase, mas a atividade da NADH oxidase ou não era afetada, ou mostrava um leve aumento. Mesmo com

50% de déficit de água, contudo, a atividade da redutase do nitrato não foi reduzida a zero; a atividade atingiu um valor fixo e quando as plantas foram regadas houve uma completa recuperação em 24 horas.

Foi postulado que a atividade da redutase do nitrato e a atividade da fenilalanina amônia liase, são o resultado de um equilíbrio entre a síntese e a decomposição. Outros estudos demonstraram que o nível do polirribossomo é reduzido e a síntese da proteína é inibida pelo estresse hídrico (HSIAO, 1970) e esta perda líquida da atividade da enzima poderia ser o resultado da síntese reduzida combinada com a inativação da enzima. BARDZIK *et al.*, 1971, sugeriram que, após um certo grau de estresse hídrico, mesmo o sistema inativando é também inativado, levando a um "steady state". Como uma possibilidade a mais, BARDZIK *et al.*, 1971, postularam que a resposta era devido à existência de duas espécies de redutase do nitrato com comportamentos diferentes, porém esta idéia não foi suportada por trabalhos subsequentes.

MORILLA *et al.* (1973) tentaram relatar mudanças na redutase do nitrato para o conteúdo de polirribossomo do tecido, uma vez que o último reflete a capacidade de síntese da proteína e é diminuído pelo estresse hídrico (HSIAO, 1970). O conteúdo do nitrato da folha e a atividade da redutase do nitrato não foram relatados em seus experimentos. Foi sugerido que a consequente redução na síntese de proteína, quando era baixo o nível de polirribossomos, foi responsável pela reduzida atividade da redutase do nitrato (SINHA & NICHOLAS, 1981). É questionável se tal relacionamento direto entre o conteúdo de polirribossomo e a atividade de uma enzima específica poderia ser suportado em bases de dados limitados e com os efeitos conhecidos do estresse hídrico sobre várias outras enzimas.

Duas observações a mais a partir de seus resultados são dignas de mencionar: a atividade da redutase do nitrato estabilizada após um período de estresse, como notado por BARDZIK *et al.*, 1971, e a atividade da enzima "*in vitro*", foi caracterizada por uma meia-vida mais longa na preparação vinda das plantas

estressadas, comparadas com aquelas vindas dos controles. Isto sugere que a enzima vinda das plantas estressadas tinha adquirido alguma propriedade que a tornou menos estável ou que os sistemas inativadores eram menos pronunciados.

Contrastando com essas sugestões, de que a atividade da redutase do nitrato é diminuída no estresse hídrico, como uma consequência de agressão ao sistema sintético, SHANER & BOYER (1976 a, 1976 b) sugeriram que a atividade da redutase do nitrato no milho fosse regulada pelo fluxo do nitrato, o qual era reduzido nas plantas estressadas pela água, levando a uma redução da atividade da enzima. Vários métodos foram usados para reduzir a transpiração, para mostrar que a síntese da enzima era regulada pela consequente mudança no fluxo do nitrato. O fluxo do nitrato foi determinado expondo-se o sistema radicular à pressão, para se obter uma amostra da corrente transpiratória. Tal método é passível de crítica, já que podia injetar íons dentro das raízes, o que não seria esperado ocorrer em um sistema natural.

Os primeiros estudos tinham demonstrado que o nitrato e nitrogênio total aumentavam por planta, à medida que o déficit hídrico progredia, enquanto que um declínio acentuado foi observado na atividade da redutase do nitrato (MATTAS & PAULI, 1965). Um contínuo aumento no conteúdo do nitrato e do nitrogênio total por planta indicam que o fluxo do nitrato foi mantido, embora a atividade da enzima declinasse. Os experimentos de SHANER & BOYER (1976 b) são limitados pela presunção de que a atividade da redutase do nitrato poderia ser influenciada apenas pela disponibilidade do nitrato ou pela síntese de proteína. O fato de que tanto a redução do nitrato como a síntese de proteína envolvem necessidades de energia não foi considerado.

Além disso, no girassol, quando o ácido abscísico (ABA) 10 μ M foi aplicado através da corrente transpiratória, as folhas apresentaram uma alta resistência estomática e um potencial de água, com a consequente redução na taxa de transpiração e no fluxo de nitrato, mas este tratamento tinha quase nenhum efeito sobre a atividade da redutase do nitrato. Por isso, parece que a perda da atividade

da redutase do nitrato, durante o estresse da água pode, em certas circunstâncias, fluir de uma redução no fluxo do nitrato. Um efeito mais direto do potencial hídrico, através da diminuição da formação do NADH tem sido proposto por SINHA & NICHOLAS, 1981.

A resposta da redutase do nitrato ao estresse da água e ao estresse de sal foi estudada por BALUSUBRAMANIAN *et al.* (1974) para determinar a estabilidade desta enzima em várias culturas. As redutases do nitrato do trigo e da cevada foram encontradas terem uma meia vida mais longa do que a enzima de outras espécies de plantas. Na ausência de nitrato e luz, a meia vida variava de 33 h a 67 h a 20 °C. Em cevada, uma investigação detalhada demonstrou que a enzima na folha bandeira era mais suscetível ao estresse da água no tempo de antese (BALUSUBRAMANIAN *et al.*, 1974; SINHA & NICHOLAS, 1981). Um método de comparação para a sensibilidade da folha bandeira em etapas diferentes de crescimento foi desenvolvido e designava o índice de sensibilidade.

A resposta da redutase do nitrato ao estresse hídrico posterior a um ciclo de 24 horas foi estudada no trigo, junto com o conteúdo relativo de água e o conteúdo de nitrato e prolina da folha. Todas as variáveis mostraram mudanças para um ciclo posterior à 24 horas: mudanças no conteúdo de nitrato da folha, seguindo-se às mudanças no conteúdo relativo de água. Além do mais, o conteúdo de prolina nas plantas não irrigadas foi máximo, quando o conteúdo relativo de água foi o mais baixo, o qual coincidiu com a atividade reduzida da redutase do nitrato. (RAJAGOPAL *et al.*, 1977).

Uma vez que o acúmulo de prolina é uma das mudanças principais no metabolismo do nitrogênio das plantas estressadas pela água, o relacionamento entre a redutase do nitrato e o acúmulo de prolina foi examinado em várias espécies cultivadas (SINHA & RAJAGOPAL, 1975). Houve um declínio acentuado na atividade da enzima em resposta ao estresse hídrico no trigo, na cevada, no sorgo, no milho, e um rápido e considerável acúmulo simultâneo de prolina em todas essas espécies (SINHA & RAJAGOPAL, 1975; SINHA & NICHOLAS, 1981). Então, é possível que

essas duas respostas estejam ligadas. Na cevada e no trigo, quando a prolina foi suprimida das plantas estressadas com polietilenoglicol, a perda da atividade da redutase do nitrato foi reduzida (SINHA & RAJAGOPAL, 1975). Isto sugere que a prolina exógena e, possivelmente, a endógena protege a enzima de ser inativada, durante o estresse da água. Esta possibilidade pode apenas ser explorada com materiais da planta que diferem em taxas de acúmulo de prolina.

A perda da atividade da redutase do nitrato em resposta ao estresse da água está bem estabelecida (ANIKIEV & KURAMAGOMETOX, 1975), mas o efeito do estresse hídrico sobre outras enzimas desta rota não está bem compreendido. Na cevada, no trigo, no rabanete e no pepino, as atividades da redutase do nitrito e da glutamina sintetase foram menos afetadas pela seca ou pela temperatura alta do que a atividade da redutase do nitrato (SINHA & NICHOLAS, 1981). As atividades destas duas enzimas foram sempre e relativamente várias vezes mais altas do que a da redutase do nitrato e, quando a última atividade foi reduzida a 30% do valor de controle pelo estresse hídrico, a atividade da redutase do nitrito e a glutamina sintetase foram reduzidos a apenas 70%. Houve diferenças claras e varietais nestas respostas, que não eram associadas à tolerância à seca. (SINHA & NICHOLAS, 1981). Estes estudos demonstram que todas as enzimas de uma sequência de reação não são necessariamente influenciadas do mesmo modo e na mesma medida por um estresse particular. Neste caso, a primeira enzima da sequência de reação; a redutase do nitrato, é muitíssimo afetada e, aparentemente, as funções são um ponto regulador (SINHA & NICHOLAS, 1981).

A sensibilidade da atividade da redutase do nitrato ao déficit da água pode ser devido a uma variedade de fatores, inclusive a possível inativação da enzima (SINHA & NICHOLAS, 1981). Se a enzima for inativada pelo estresse hídrico, pode ser também possível reativar a enzima em condições as quais tornam impossível a síntese da enzima fresca. Em três variedades de cevada, a atividade da enzima foi reduzida nas plantas estressadas a cerca de 30% do controle (SINHA & NICHOLAS, 1981). Quando um extrato tanto das plantas do controle como das plantas estressadas foi incubado por uma hora com NADH a 4 °C antes do ensaio, houve

uma quase completa recuperação da atividade nos extratos das plantas estressadas para o nível encontrado nas plantas de controle. Não houve nenhum aumento nos extratos das plantas de controle (SINHA & NICHOLAS, 1981). A ativação e a inativação da redutase do nitrito no arroz pelo NADH tem sido reportada (GANDHI *et al.*, 1973), e o NADH também ultrapassou o efeito de um sistema de proteína inibidor (KADAM *et al.*, 1974).

Se a inativação da redutase do nitrato pelo déficit hídrico e sua ativação pelo NADH seguindo-se ao alívio do estresse são possibilidades, então seria viável demonstrar-se este efeito "*in vivo*". A recuperação substancial da atividade da redutase do nitrato, inicialmente reduzida pelo estresse hídrico, tem sido observada em uma variedade de circunstâncias nas quais a síntese de proteína não era provável, como na irrigação das plantas mantidas na escuridão (SINHA & NICHOLAS, 1981), nas plantas m presença de luz e mantidas em uma taxa média livre de nitrato, nas plantas irrigadas na presença do tungstato (um inibidor da síntese da enzima), ou nas plantas tratadas com cicloheximida (SINHA & NICHOLAS, 1981). Embora cada uma dessas condições experimentais tenha sido escolhida para minimizar a possível síntese *de novo* da enzima, uma total inibição da síntese pode não ter sido induzida. O aumento substancial na atividade da enzima obtida suporta a possibilidade de uma regulação da redutase do nitrato, através da disponibilidade de NADH nas plantas estressadas, bem como através dos efeitos sobre a síntese e a degradação da enzima (SINHA & NICHOLAS, 1981).

1.2.3.5 Prolina e o déficit hídrico

A prolina foi observada primeiramente acumulando-se no tecido desidratado da planta por KEMBLE & MAC PHERSON (1954). Eles observaram que a prolina se acumulava no tecido desidratado em quantidades maiores do que as observadas por proteólise. Nesses experimentos, as plantas eram continuamente desidratadas durante o curso do experimento e a prolina somente se acumulava nas plantas murchas. THOMPSON & MORRIS (1957), confirmaram tais resultados em experimentos com folhas cortadas de nabo túrgidas e murchas. Nesses experimentos, as folhas murchas foram mantidas com um conteúdo constante de água e a prolina acumulada desaparecia após 3 dias. Em 1966, três trabalhos descreveram o fenômeno do acúmulo da prolina durante o estresse hídrico (BARNETT & NAYLOR, 1966; ROUTLEY, 1966; STEWART *et al.*, 1966).

Nessa época, várias características do acúmulo da prolina ficaram claros: acumulava-se em resposta a murcha nas folhas cortadas e nas plantas intactas; acumulava-se na luz ou no escuro mas no ambiente escuro havia a exigência para carboidratos; havia uma nova síntese da prolina, desde que se acumulava em quantidades maiores do que aquelas liberadas pela proteólise; a nova prolina era sintetizada do ácido glutâmico; e o acúmulo da prolina tinha sido observado em espécies suficientes para mostrar que era, aparentemente, um fenômeno geral nas plantas. Parece que o acúmulo da prolina pode ser uma resposta geral ao estresse, desde que também se acumula sob estresses de temperatura e salinidade. (CHU *et al.*, 1974, 1976).

A prolina é preferencialmente única entre os aminoácidos em seu acúmulo durante o estresse. A maior parte dos aminoácidos se acumulam em uma proporção limitada (THOMPSON *et al.*, 1966) e há algumas indicações de que a asparagina, e talvez outros aminoácidos, como a prolina, se acumulem em quantidades que excedem as quantidades liberadas pela proteólise. Somente a prolina, porém, se acumula de forma consistente em numerosas espécies de plantas e sob uma ordem

de condições ambientais. Certamente, os efeitos metabólicos do murchamento que levam ao acúmulo da prolina não foram observados com qualquer outro aminoácido (ASPINALL & PALEG, 1981).

O acúmulo da prolina em várias plantas é iniciado por uma redução no potencial hídrico das células dos tecidos. Na cevada, o acúmulo começa rapidamente na hora em que os tecidos são expostos à desidratação, sendo a concentração de prolina livre nas folhas da planta, uma função da intensidade de exposição ao déficit hídrico, do potencial hídrico das folhas e da quantidade transportada das folhas aos outros tecidos (SINGH *et al.*, 1973 a). Em todos os dados disponíveis, o acúmulo progressivo da prolina tem sido acompanhado por uma queda no potencial hídrico do tecido com o tempo (ASPINALL & PALEG, 1981). Infelizmente, porém, nenhum experimento foi descrito, no qual as plantas intactas tenham sido mantidas a potenciais hídricos fixos, por um período prolongado, com o registro das taxas do acúmulo de prolina. Na ausência de tais medidas, é impossível determinar um limite superior do potencial hídrico para a indução do acúmulo da prolina.

A iniciação do acúmulo da prolina nos tecidos da planta, em resposta a uma diminuição no potencial hídrico do tecido poderia ser, idealmente, devido às mudanças em um dos vários componentes do potencial total. Convencionalmente, o potencial hídrico dos tecidos das plantas superiores tem sido dividido em dois ou três componentes, o potencial osmótico, o potencial de turgescência e, em alguns estudos, o potencial mátrico. Não é, experimentalmente, uma tarefa fácil separar, inequivocamente, os efeitos das mudanças nestes componentes. Alguns estudos, usando solutos de penetração variável no tecido, sugerem que as mudanças no potencial da turgescência controlam as respostas bioquímicas da planta (GREENWAY & LEAHY, 1972). Este ponto de vista tem sido questionado por CHU *et al.* (1976 a) que reportaram que o acúmulo da prolina na planta de cevada era dependente das mudanças no potencial osmótico, mais do que das mudanças na turgescência. Em qualquer caso, um sistema envolvido com osmorregulação (BROWN & HELLEBUST, 1978; MORGAN, 1984) poderia reagir à turgescência, não sendo provável que as medições brutas da turgescência do tecido e do potencial osmótico representassem,

adequadamente, a influência do déficit hídrico no comportamento sub-celular, onde o acúmulo da prolina é controlado.

O acúmulo da prolina durante o déficit hídrico continua, pelo menos, por vários dias (SINGH *et al.*, 1973 d), mas não há nenhum relato mais recente de concentrações alcançando um nível máximo nas plantas superiores intactas, embora concentrações tão elevadas quanto 10% do peso total da folha seca tenham sido registradas (STEWART & LEE, 1974). As folhas cortadas das plantas superiores não respondem de maneira análoga aos organismos unicelulares já que, em circunstâncias semelhantes de experimentos, a prolina, primeiro, acumula rapidamente (24-48 horas), mas depois cai rapidamente, devido, presumivelmente, às conseqüências metabólicas do corte (SINGH *et al.*, 1973 b).

O acúmulo da prolina responde relativamente rápido a mudanças nas condições de água da folha. RAJAGOPAL *et al.* (1977), demonstraram que, no trigo crescido em condições de campo e não irrigado, o conteúdo de prolina alcança um ponto máximo, ao meio-dia, coincidente com um conteúdo relativo de água mínimo naquelas folhas. Complementando estes estudos das mudanças a curto prazo na concentração da prolina, STEWART & LEE (1974) examinaram a variação sazonal na concentração da prolina nos tecidos das partes aéreas da planta halófita *Triglochin maritima* L., crescendo num ambiente salínico. A concentração da prolina foi alta, através da época de crescimento (mínimo de $50 \mu\text{mol.g MF}^{-1}$) e alcançou um máximo ($150 \mu\text{mol.g MF}^{-1}$) no tempo em que a planta estava crescendo mais rapidamente. Evidentemente, uma alta concentração de prolina livre no tecido não é compatível com o crescimento destas espécies.

A maior parte dos estudos do acúmulo de prolina, em resposta ao déficit hídrico, tem sido envolvidos com as mudanças na concentração nas partes aéreas da planta ou, mais especificamente, nas folhas. A prolina, contudo, se acumula em todos os órgãos da planta intacta, durante o déficit hídrico, embora o acúmulo seja mais rápido e extensivo nas folhas (SINGH *et al.*, 1973 d; MORGAN, 1984). O acúmulo na raiz ocorre tanto mais tarde quanto menos extensivamente do que o

acúmulo na folha, seguindo-se ao estabelecimento do déficit de água. As folhas e caules cortados também acumulam prolina, quando sujeitos ao déficit hídrico mas, sob condições semelhantes, os ápices das folhas cortadas acumulam pouca prolina, e as raízes cortadas, absolutamente, nenhuma (SINGH *et al.*, 1973 b; MORGAN, 1984).

A prolina se acumulou, contudo, nas pontas das raízes arrancadas de *Pisum sativum* e *Tamarix* ssp expostas ao estresse salino (BAR-NUN & POLJAKOFF-MAYBER, 1977) e nos tubérculos da alcachofra sob estresse hídrico (WRIGHT *et al.*, 1977). Tais descobertas levaram à sugestão de que a prolina acumulada nas raízes das plantas intactas e estressadas de cevada tinham sido transportadas das folhas para lá . Isto foi sustentado pelo fato de que, a exposição das raízes de uma planta com deficiência de água à anaerobiose inibiu o acúmulo da prolina, porém, melhorou o acúmulo nas folhas, não sendo afetada pelo tratamento a quantidade total acumulada em toda planta (SINGH *et al.*, 1973 d).

A diferença mais óbvia entre os tecidos que são capazes de acumular prolina, quando cortados e aqueles que não são cortados, é a presença da clorofila. Tanto os tecidos crescidos no escuro, como também os tecidos geneticamente cloróticos da folha da cevada são capazes de acumular prolina, se supridos com precursores e sujeitos ao déficit hídrico, enquanto que o tecido da raiz não o é (SINGH *et al.*, 1973 b). Muitas das hipóteses que envolvem os efeitos da presença da prolina acumulada na célula giram sobre a presunção de que a prolina acumulada, ou pelo menos a sua maior parte, está presente no citoplasma. Até hoje este ponto não foi definitivamente testado, mas a evidência disponível é consistente com este ponto de vista. A prolina acumulada não é imediatamente metabolizada nos tecidos; na verdade, em alguns casos, é difícil de se assegurar que a prolina exógena penetre no citoplasma (BOGGESS *et al.*, 1976 a). Evidentemente, a plasmalema oferece uma barreira considerável à passagem da prolina.

A distribuição da prolina acumulada nas raízes do milho sob estresse salino sugere uma localização citoplásmica (GORING *et al.*, 1977). Raízes de plantas

intactas e submetidas ao estresse foram seccionadas e analisadas para o teor de prolina. A concentração da prolina foi observada aumentando em direção a ponta da raiz, sendo o máximo de concentração observada em 1-2 mm da ponta da raiz, onde a maioria das células não apresentavam vacúolos, e diminuía de modo bem marcante em segmentos mais distantes da ponta, onde todas as células estavam altamente vacuolizadas. O acúmulo de prolina no vacúolo não está excluído pelos dados atualmente disponíveis, mas se isto ocorrer, o transporte através do tonoplasto deve ser rápido e bi-direcional, desde que acumulada, a prolina marcada foi rapidamente metabolizada quando o déficit hídrico foi suspenso (BOGGESS *et al.*, 1976 b). A prolina não pareceu ser acumulada no cloroplasto, ou ser excluída dos cloroplastos, e outras organelas na célula não ocuparam um volume suficiente para serem consideradas como uma localização exclusiva e viável para a prolina acumulada (BOGGESS *et al.*, 1976 b).

Se as consequências do acúmulo da prolina nos tecidos da planta, durante o período do estresse são, em conjunto, benéficas ou nocivas ao futuro crescimento e sobrevivência da planta, pode-se, razoavelmente, esperar uma correlação, positiva ou negativa, entre o acúmulo da prolina e a resistência ao estresse. Somente se, ou quando, o acúmulo da prolina fosse um atributo neutro na resistência ao estresse (uma expectativa não provável) tal correlação não seria aparente. Para estabelecer tal correlação, contudo, numerosas "armadilhas" devem ser evitadas. Primeiramente, desde que o acúmulo de prolina é uma função do potencial hídrico do tecido e do tempo, deve-se tomar cuidado para se ter certeza de que o potencial hídrico do tecido e a duração experimental sejam variadas, exatamente, da mesma maneira, nas comparações entre as espécies, variedades ou tratamentos. Na prática, isto é difícil de se adquirir desde que as variações entre as plantas, na fisiologia e na morfologia dos estômatos, no tamanho da planta e da folha, atributos da raiz, etc., afetarão as taxas de seca e as relações do potencial hídrico e do tempo (ASPINALL & PALEG, 1981).

Mais um problema existe na tentativa de se deduzir uma medida efetiva e imediatamente utilizável de resistência ao estresse. Na pesquisa agrícola, a medida

básica deve ser a produção comparada, numa situação de estresse de campo. Pode parecer que tal medida seja apenas uma função de uma multiplicidade de características de resistência, e não é provável que um relacionamento estreito possa ser estabelecido entre qualquer caráter simples e a resistência medida pela produção no campo. Não obstante, tal análise foi tentada para o acúmulo da prolina e para o índice de estabilidade (uma estimativa da estabilidade da produção, em uma variedade de ambientes) e foi reportada uma alta correlação (SINGH *et al.*, 1972).

Outras medidas envolvidas com os aspectos individuais da resistência da planta ao estresse são mais prováveis de serem correlacionadas com o acúmulo da prolina e, questionavelmente, fornecem um teste mais realístico da hipótese. Tanto a taxa de crescimento da planta, seguindo-se, imediatamente, a um período de estresse, como a sobrevivência da folha foram encontradas correlacionadas com o acúmulo da prolina (SINGH *et al.*, 1973 c) e sustentam o relacionamento geral. Deve ser entendido contudo, que cada uma envolve uma hipótese diferente, embora não necessariamente exclusiva, sobre o papel da prolina no metabolismo do estresse.

O acúmulo da prolina é simplesmente o aumento no nível da prolina livre no tecido. Na fisiologia deste efeito do estresse, dois pontos são importantes. Primeiro, o acúmulo da prolina ocorre sob o estresse hídrico, relativamente brando (potenciais de água de $-1,0$ MPa) e a quantidade que acumula depende do rigor do estresse (por exemplo, quanto mais baixo for o potencial de água da folha, maior o acúmulo de prolina sobre essa condições). O segundo ponto é que os níveis de prolina representam um efeito cumulativo do tecido que é desidratado durante um certo período de tempo. Por isso, o nível de prolina será muito afetado durante o tempo em que o tecido estiver sob estresse. Então, ao se avaliar os efeitos do estresse sobre o metabolismo de prolina, as taxas de síntese e oxidação nas folhas murchas devem ser comparadas com as taxas destes processos nas folhas túrgidas (STEWART, 1981). O acúmulo de prolina pode resultar de um estímulo da taxa de formação de prolina ou uma diminuição na taxa de utilização. A proteólise e a síntese provenientes de precursores resulta na formação da prolina, enquanto que a oxidação e a síntese de proteína resultam na utilização da prolina (STEWART, 1981).

Um estímulo da síntese de prolina vinda dos precursores pelo estresse hídrico foi previsto nos trabalhos iniciais demonstrando que o acúmulo da prolina excedia a prolina liberada pela proteólise (THOMPSON *et al.*, 1966). De fato, um estímulo induzido pela murcha, na incorporação de glutamato- C^{14} na prolina foi observado por BOGGESS *et al.* (1976 *a*). Porém, este estímulo aparente pode ser devido ao "engano" do composto marcado resultante da utilização reduzida de prolina, ou da síntese de algum outro precursor. BOGGESS *et al.* (1976 *b*) demonstraram que a quantidade de C^{14} na prolina total (livre + proteína) do glutamato era estimulada pela murcha e que a radioatividade específica da prolina livre, bem como a radioatividade total na prolina, era aumentada pela murcha. Então, ficou claro que o estresse hídrico estimula a síntese da prolina vinda do glutamato na cevada (BOGGESS *et al.*, 1976 *b*).

A transformação da ornitina (BOGGESS *et al.*, 1976 *b*) e arginina (BOGGESS & STEWART, 1976) em prolina é também estimulada pelo estresse hídrico em cevada. Isto, porém, é observado, por vezes, bem depois que a prolina começa a se acumular, indicando que é um resultado, mais do que uma causa, do acúmulo da prolina. O estímulo aparente é devido a um "engano" na marcação radioativa da prolina, como um resultado do aumento da síntese do glutamato e utilização reduzida através da oxidação e da síntese da proteína. Então, o aumento da síntese da prolina a partir do glutamato, devido a murcha, é aparentemente um efeito sobre o primeiro passo na síntese da prolina, a conversão para Δ' -pirrolina-5-carboxilato (BOGGESS *et al.*, 1976 *b*). Claramente, há uma perda de controle de resposta da síntese da prolina pela prolina, porque a síntese é estimulada, enquanto os níveis de prolina são aumentados. BOGGESS *et al.* (1976 *a*) demonstraram a perda da regulação durante o estresse hídrico, tanto na cevada quanto nas folhas de tabaco.

Nas folhas de feijão, o estímulo murchar - induzir da síntese da prolina a partir do glutamato foi mais difícil de se demonstrar (STEWART & BOGGESS, 1977) porque o glutamato foi rapidamente metabolizado para outros componentes e a taxa de acúmulo da prolina foi muito menor do que na cevada (0,1 comparada com 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g MF}^{-1}$). A conversão tanto da ornitina como da arginina para a prolina foi

estimulada no feijão antes de qualquer acúmulo de prolina observado. A prolina se acumulou, porém, em quantidades maiores do que poderia ser calculada pela perda de arginina e prolina da proteína. Além disso, o estímulo do glutamato para a conversão da prolina foi observado quando grandes quantidades de glutamato não marcado foram adicionadas para tornar mais lenta a perda de C^{14} do glutamato. Então, o estresse hídrico também estimula a síntese da prolina a partir do glutamato no feijão (STEWART & BOGGESS, 1977).

Foi sugerido por STEWART (1981), que a regulação da taxa da oxidação da prolina pelos níveis da prolina poderiam funcionar como um controle sobre o nível desse aminoácido num tecido normal da planta não estressada. Então, como a prolina se acumula devido ao aumento da síntese, ocorrerá a melhora da oxidação da prolina e, eventualmente, os níveis da prolina alcançarão um novo e firme estado. Durante o estresse, porém, a prolina se acumula a níveis completamente altos, sugerindo que o murchamento também inibe a oxidação da prolina. A observação de que alguns dos produtos oxidados podem ser reconvertidos à prolina nas folhas murchas (STEWART & BOGGESS; 1978) poderia ainda permitir alguma oxidação da prolina, mas certamente a oxidação da prolina é inibida pelo estresse hídrico e a taxa muito provavelmente, se aproxima de zero.

A inibição da oxidação da prolina pelo estresse hídrico não foi observada nas folhas de feijão (STEWART, 1972 c), e a prolina apenas se acumulava quando níveis suficientemente altos de carboidratos estavam presentes para inibir a oxidação da prolina. A murcha não inibia a oxidação da prolina nas folhas de feijão. A não inibição impediu a prolina de se acumular naquelas folhas, desde que o estímulo da síntese dos precursores foi observado (STEWART 1972 c). Este resultado indica que a inibição da oxidação da prolina é essencial para a prolina se acumular, embora a inibição por si só, não possa causar o acúmulo.

O efeito da murcha sobre a oxidação da prolina representa um efeito sobre o mitocôndrio. SELLS & KOEPPE, 1980, observaram que uma taxa menor que 70% na oxidação da prolina no mitocôndrio isolado das folhas de milho sob estresse hídrico

(-1 Mpa). Este grau de estresse resultou apenas numa leve redução nas taxas de oxidação de outros substratos tais como succinato, malato, piruvato, e NADH. O mitocôndrio das folhas de plantas estressadas deram taxas inferiores da razão ADP:O comparadas com os controles túrgidos para prolina, mas as taxas para outros substratos não foram afetadas pelo estresse. Também, a sugestão (STEWART & BOGGESS, 1978) de que a murcha causa uma perda na compartimentação dos produtos de oxidação da prolina sugere um vazamento de produtos de oxidação do mitocôndrio para o citoplasma. Talvez o estresse hídrico afete a integridade da membrana mitocondrial.

Ficou claro que a incorporação de prolina na proteína é inibida pelo estresse da água (STEWART, 1972 c; STEWART *et al.*, 1977). Isto é devido à influencia da desidratação do tecido sobre a síntese da proteína e tem sido observado pela medição dos níveis de polirribossomo (HSAIO, 1970; MORILLA *et al.*, 1973), pela atividade da redutase do nitrato (MORILLA *et al.*, 1973) e pela incorporação da leucina (BEN-ZIONI *et al.*, 1967). Os resultados, porém, indicam que os níveis baixos de redutase do nitrato nas folhas sob estresse da água, são devidos aos fluxos reduzidos do nitrato, mais do que um efeito sobre a síntese da proteína (SHANER & BOYER, 1976 a e b). O mecanismo pelo qual o estresse reduz a síntese de proteína não está claro, mas é imediatamente reversível (HSIAO, 1973).

A possibilidade de que o acúmulo da prolina é uma consequência da redução na síntese de proteína foi examinada por BOGGESS & STEWART (1980). Baseada em experimentos com inibidores da síntese de proteína, eles concluíram que a inibição da síntese de proteína não foi suficiente para fazer a prolina se acumular. Desde que a síntese de proteína contribui para a maior parte da utilização da prolina no tecido túrgido, sua redução contribui para o acúmulo da prolina, tornando mais lenta a taxa de utilização da prolina (STEWART 1972 c).

Nas folhas de feijão, a taxa de utilização da prolina para a síntese da proteína foi $0,07 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g MF}^{-1}$ (STEWART, 1972 a). Assim, a inibição da síntese da proteína, com a síntese e a oxidação da prolina permanecendo constantes, poderiam

ser calculadas para mais de 70% da taxa de acúmulo da prolina. Este percentual é maior para o feijão e a cevada, mas em nenhum caso foi a incorporação da prolina em proteína completamente inibida pelo estresse da água (STEWART, 1972 c; STEWART *et al.*, 1977).

2. CAPÍTULO 1

"CRESCIMENTO E AJUSTAMENTO OSMÓTICO DE PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] SUBMETIDAS AO DÉFICIT DE ÁGUA E À REIDRATAÇÃO"

2.1 INTRODUÇÃO

O déficit de água no solo provoca reduções no potencial de água da planta com reflexos diretos no metabolismo e crescimento. O processo de crescimento celular, através das sínteses de proteínas e parede celular, é o mais sensível às reduções na disponibilidade de água nos tecidos (SALISBURY & ROSSI, 1992; NOBEL, 1992). Os mecanismos moleculares que respondem às pequenas reduções no potencial de água e que desencadeiam os processos responsáveis pela redução na elongação celular ainda não são conhecidos, apesar de se acreditar na mediação do ácido abscísico (ABA), o qual tem sua concentração aumentada várias vezes (BRAY, 1993; INGRAM & BARTELS, 1996). Paralelamente ao aumento na concentração do ABA, várias espécies exibem um grande aumento nas concentrações de substâncias nitrogenadas como prolina, betainas, citrulina e alguns aminoácidos (RABE, 1993). Outras substâncias como sacarose e açúcares-alcoois como o pinitol, também podem se acumular em resposta ao déficit de água (INGRAM & BARTELS, 1996).

As diversas espécies vegetais apresentam grande variabilidade genética para a adaptação e tolerância ao déficit de água (TAIZ & ZEIGER, 1991). Existe uma diversidade bastante ampla para os mecanismos fisiológicos de escape à seca, apesar dos mecanismos moleculares ainda não serem conhecidos (INGRAM & BARTELS, 1996). Aparentemente, *Vigna unguiculata* apresenta uma excelente tolerância ao déficit de água através de um mecanismo não-osmótico, com um

eficiente controle na abertura estomática para a manutenção do potencial da água (McCREE & RICHARDSON, 1987; CARVALHO et al., 1998). Entretanto, a existência de um ajustamento osmótico através do acúmulo de solutos osmoticamente compatíveis não deve ser descartada tendo em vista a possibilidade de compartimentalização celular e dificuldades de mensurações nas concentrações dos diversos solutos osmoticamente compatíveis (ASPINALL & PALEG, 1981).

Várias evidências experimentais mostram que a síntese de proteínas é fortemente inibida pelo déficit de água (BRADFORD & HSIAO, 1982). Simultaneamente à diminuição na síntese protéica observa-se o aumento no "turnover" de proteínas através do aumento da atividade de proteases, ocorrendo um grande aumento na concentração de aminoácidos livres (RABE, 1993). Prolina é o aminoácido que se acumula em maior quantidade na maioria das espécies (ASPINALL & PALEG, 1981). Apesar das inúmeras pesquisas sobre o acúmulo desse aminoácido em condições de estresses ambientais, em geral, pouco é conhecido sobre seu papel efetivo no ajustamento osmótico assim como sobre a sua origem metabólica sob condição de estresse hídrico e salino (LEA, 1993). Algumas espécies vegetais apresentam acúmulo de prolina nas folhas na ordem de até 100 vezes em resposta ao estresse hídrico (LEA, 1997). Entretanto, poucos trabalhos tem mostrado a variação na concentração desse aminoácido nas raízes (ASPINALL & PALEG, 1981).

O acúmulo de prolina sob condições de estresses pode ocorrer devido a ação de diferentes mecanismos. As evidências experimentais sugerem que a via mais importante de biossíntese ocorre a partir do glutamato (LEA, 1993). Associado a isso poderia ocorrer uma diminuição nas taxas de oxidação de prolina (ASPINALL & PALEG, 1981). Outra possibilidade seria a diminuição na intensidade de sua incorporação na síntese protéica ou aumento de sua liberação a partir da hidrólise de proteínas ricas nesse aminoácido (STEWART & LARHER, 1980). Recentemente, VIÉGAS & SILVEIRA - não publicado, tem sugerido que o aumento no catabolismo de proteínas provocados pelo estresse hídrico e salino, associados com aumentos na

fotorrespiração, poderia incrementar as concentrações de glutamato e amônio e, a partir do estímulo nas atividades das enzimas GS/GOGAT, ocorrer um aumento nas concentrações de prolina a partir do glutamato produzido.

2.2.1 Neste trabalho procurou-se estudar as respostas de plantas noduladas de feijão-de-corda submetidas à seca/reidratação, no nível de crescimento vegetativo, através da produção e partição da matéria seca e no ajustamento osmótico ao nível das variações nas concentrações de compostos nitrogenados, com ênfase nas variações nas concentrações de prolina e aminoácidos em raízes e folhas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Condições do Experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-Ce, no período de outubro a dezembro de 1995. As temperaturas e umidades médias mínimas (noite) e máximas (dia), na casa de vegetação, variaram de 25 °C a 36°C e 39% a 85%, respectivamente, durante o período experimental.

O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de sílica : vermiculita na proporção de 1:2 (v:v), sendo a mesma lavada com água destilada por 5 vezes e posteriormente autoclavada por 20 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Utilizou-se vasos de Leonard modificados produzidos a partir de frascos de vidro de reagentes de 1 L, cortados nas duas extremidades opostas (em cima e em baixo) e ajustados um sobre o outro em sentido contrário, sendo a parte externa pintada com tinta cor prata.

As partes dos vasos apresentaram 20 cm de altura e 9 cm de diâmetro, perfazendo um volume de aproximadamente 800 cm³ em cada parte. Os vasos foram lavados internamente com hipoclorito de sódio comercial 20% (v:v). Cada vaso foi irrigado com solução de CaSO₄ 0,1 mM, até a saturação do substrato sólido da parte superior, para favorecer as condições de pH e suprimento de Ca⁺² para germinação e nodulação. Foi fornecida solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada no Laboratório de Metabolismo e Fixação de Nitrogênio da UFC (LABFIX), conforme tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da solução nutritiva utilizada para o cultivo das plantas de feijão-de-corda e das soluções estoque utilizadas no seu preparo.

SOLUÇÃO ESTOQUE		g/L	mL/L
SAL	CONCENTRAÇÃO		
1. K ₂ SO ₄	0,5 M	87,13	2
2. K ₂ HPO ₄	1,0 M	174,18	0,5
3. KH ₂ PO ₄	1,0 M	136,09	0,5
4. CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,0 M	174,02	2
5. MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0 M	246,48	1
6. Fe(EDTA)			1
a) FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 M	27,80	
b) Na ₂ (EDTA)	0,08M	29,77	
7. Micronutrientes:			1
a) H ₃ BO ₃	0,04M	2,47	
b) MnCl ₂ .4H ₂ O	0,009M	1,781	
c) CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0003M	0,075	
d) ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0007M	0,201	
e) Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0001M	0,024	
8. CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,004M	0,950	1
9. Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	1,0 M	236,15	2,5

2.2.2 Material vegetal e estirpe utilizada

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], cultivar vita 7, foram procedentes do Centro Nacional de Pesquisa do Meio Norte/EMBRAPA, Teresina, Piauí. Conforme descrito por FREIRE FILHO *et al.* (1983), essa cultivar de feijão-de-corda é recomendada para cultivo tanto em condições de baixa disponibilidade hídrica (sequeiro), como em condições de irrigação. Alguns trabalhos tem sugerido que a cultivar vita 3 apresenta melhores características de tolerância ao déficit hídrico em relação às cultivares vita 5 e vita 7 (GOMES FILHO *et al.* 1996). A estirpe de *Rhizobium* spp. utilizada foi a Br 3256 fornecida pela Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia/EMBRAPA/ Rio de Janeiro, cuja planta hospedeira é *Vigna unguiculata*, de origem africana (Zimbabue), também a designada CB-756.

A estirpe foi crescida em meio YMB (DALTON, 1980) que foi utilizado como inoculante líquido, tendo sido feita contagem de células conforme SOMASEGARAN & HOBEN (1985) e padronização de 10⁹ células/mL. Foram feitas 3 inoculações (1 mL/planta) :

1ª inoculação : 2 dias após o plantio

2ª inoculação : 3 dias após o plantio

3ª inoculação : 4 dias após o plantio

2.2.3 Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial tipo $2 \times 7 \times 1$ (condições hídricas x tempo x cultivar), com 3 repetições. Foi utilizado um tratamento controle (plantas somente inoculadas e sem a presença de nitrato). A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média ao longo do tempo.

2.2.4 Condução das plantas

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) 10 % (v/v), por 20 minutos sob aeração forçada, sendo imediatamente lavadas em água destilada por 3 vezes para retirar o excesso do NaClO . Em seguida, as sementes foram mergulhadas em água destilada, com aeração forçada, por um período de 20 minutos e lavadas por 5 vezes em água destilada para embebição. As sementes foram colocadas para germinar no próprio substrato, saturado no dia anterior com CaSO_4 0,1 mM, sendo plantadas 6 sementes / vaso. Após a emergência, foram mantidas e inoculadas 2 plantas/vaso conforme descrito no item 2.2.

As plantas receberam nutrientes minerais na forma de solução nutritiva (Tabela 1), através de sub-irrigação por capilaridade a partir da parte inferior dos vasos de Leonard, sendo que na 1ª semana a solução foi diluída 1/10, na 2ª semana a solução foi diluída 1/5 e nas semanas seguintes a solução foi empregada sem diluição e contendo 5 mM de NO_3^- . A solução nutritiva foi trocada a cada 2 dias, sendo que na 1ª semana foi fornecido apenas 1 mM de NO_3^- (exceto no controle com

plantas somente inoculadas). Foi anotado diariamente o valor pH da solução descartada.

Todos os dias foi feita adição de água destilada através da parte superior até completar o volume da solução contida na parte inferior. As temperaturas máximas e mínimas registradas no interior da casa de vegetação durante o período experimental são apresentadas no apêndice 2. Semanalmente, houve rodízio, ao acaso, dos vasos sobre as bancadas. Para tratamento fitossanitário, inseticida e fungicida foram utilizados quando necessário, conforme recomendação do Setor de Fitossanidade do Centro de Ciências Agrárias da UFC.

No vigésimo oitavo dia após a emergência das plantas (28^o DAE) as plantas do tratamento "estresse hídrico" foram submetidas à retirada da água (solução) da parte inferior dos vasos, permanecendo apenas com a água retida na fase sólida da parte superior durante 4 dias consecutivos e, após esse período, reidratadas diariamente durante 2 dias (reidratação), enquanto que as plantas controle foram mantidas diariamente na presença de solução nutritiva.

2.2.5 Coleta das plantas e determinação da massa seca

Foram feitas 7 coletas destrutivas, sempre às 9:00 horas, as plantas foram separadas em raiz, caule com pecíolos, folhas e nódulos. Em seguida, as partes foram pesadas separadamente para determinação da massa fresca. Amostras de cada parte foram reservadas para determinar a porcentagem de umidade através da determinação da massa seca em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C, com exceção dos nódulos, cuja massa seca foi determinada após liofilização. Foram determinadas, também, a altura das plantas, com o auxílio de uma fita métrica e o número de folhas contado. Imediatamente após a coleta, as partes foram congeladas com N₂ líquido e mantidas em freezer (-20 °C) até a liofilização para preparo da farinha das partes.

2.2.6 Determinação da umidade nos tecidos

A umidade nos tecidos de cada parte da planta foi determinada segundo SLAVIK (1974), utilizando-se a seguinte relação:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = \frac{\text{M F} - \text{M S}}{\text{M F}} \times 100 \text{ (kg H}_2\text{O/100kg de MF)}$$

onde : M F = massa fresca de cada uma das partes da planta

M S = massa seca de cada uma das partes da planta

2.2.7 Determinação de prolina livre em tecidos de folhas e raízes

O método utilizado foi o de BATES (1973). 20 mg de tecido vegetal liofilizado foram pesados e, em seguida, triturados em almofariz, por 2 minutos, em presença de 3 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v). O macerado foi transferido para tubos "Eppendorf" de 1,5 mL com o auxílio de uma seringa descartável de 3 mL e, posteriormente, centrifugado a 12.000 rpm em uma centrífuga "Eppendorf" de mesa, refrigerada. O sobrenadante foi coletado em tubos de ensaio comum e o resíduo descartado. A reação foi preparada, em tubo de ensaio com rolha, com 1 mL do extrato + 1 mL de ninhidrina ácida (1 g de ninhidrina + 24 mL de ácido acético glacial + 16 mL de ácido fosfórico 6 M) + 1 mL de ácido acético glacial. Os tubos foram herméticamente fechados e agitados em agitador de tubos, tipo vortex. Após, os tubos foram colocados em banho - maria a 100 °C, por 1 hora. Em seguida, a reação foi imediatamente interrompida em banho de gelo por alguns minutos até atingir a temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 2 mL de tolueno puro seguido de agitação vigorosa, em agitador de tubos tipo vortex, por 20 segundos. Após atingida a temperatura ambiente, a fase aquosa avermelhada (cromóforo + tolueno = parte superior) foi aspirada e a leitura feita em espectrofotômetro a 520 nm, usando-se tolueno como branco. A concentração de prolina foi determinada a

partir da curva padrão com L-prolina p.a (Sigma) e os resultados foram expressos em mmoles de prolina /kg MS de tecido.

2.2.8 Determinação de aminoácidos livres totais (N- α -amino livre) em tecidos de raiz, caules e folhas

O método utilizado foi o de PEOPLES *et al.* (1989). 100 mg de tecido vegetal liofilizado foram colocados em tubos de ensaio com rolha de borracha. Foram adicionados 5 mL de água "milli-Q" e a suspensão foi colocada para ferver em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por alguns minutos e, posteriormente, centrifugados em centrífuga de mesa, a 3.000 rpm por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e o resíduo ressuspendido com outros 5 mL de água "milli-Q", repetindo-se o procedimento de extração anterior. Em seguida, os extratos foram coletados em tubo de ensaio graduado e o volume completado com água "milli-Q" até atingir 10 mL. Em seguida, os extratos foram congelados para posterior determinação de N- α -amino.

A reação foi preparada em tubo de ensaio, com rolha, adicionando-se 0,1 mL de extrato + 0,4 mL de água "milli-Q" + 1 mL de tampão citrato 0,2 M pH=5 + 1 mL do reagente de ninhidrina (10 mL de KCN 0,01 M + 590 mL de metil cellosolve 100% + 5 g de ninhidrina). A mistura foi homogeneizada através de agitação dos tubos e colocada em banho-maria a 100 °C, por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram removidos do banho-maria e colocados em banho de gelo, por alguns minutos, para interromper a reação. Após atingida a temperatura ambiente, as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 570 nm, usando-se água "milli-Q" (em substituição ao extrato) + reagentes como branco. A concentração de aminoácidos livres totais foi determinada a partir da curva padrão através de uma mistura-padrão de L-asparagina + L-glutamina (Sigma) e os resultados expressos em mmoles de N- α -amino / kg MS de tecido.

2.2.9 Determinação de ureídeos em tecidos de caule

O método utilizado foi o de PEOPLES *et al.* (1989). 100 mg de tecido vegetal liofilizado foram colocados em tubos de ensaio com rolha de borracha. Foram adicionados 5 mL de Água "milli-Q" e a suspensão colocada para ferver em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Após isso, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por alguns minutos e, posteriormente, centrifugados em centrífuga de mesa, a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e o resíduo ressuspensionado com outros 5 mL de água "milli-Q", repetindo-se o procedimento de extração anterior. Os extratos foram coletados em tubo de ensaio graduado e o volume completado com água "milli-Q" até atingir 10 mL. Após, os extratos foram congelados para posterior determinação de N-ureídico.

A reação foi preparada em tubos de ensaio, com rolhas, onde foram adicionados 0,1 mL de extrato + 1,15 mL de água "milli-Q". Em seguida, foi adicionado 0,25 mL de NaOH 0,5 M em cada tubo e a mistura agitada em agitador de tubos tipo vortex e aquecida em banho-maria, a 100 °C, durante 15 minutos. Os tubos foram removidos do banho-maria e resfriados, imediatamente, em banho de gelo e deixados à temperatura ambiente por alguns minutos. Após, 0,25 mL de HCl 0,65 M foi adicionado, misturado e aquecido novamente, em banho-maria a 100 °C, por 4 minutos. Após resfriamento imediato em banho de gelo, durante 15 minutos, foi adicionado 0,25 mL de tampão fosfato 0,4 M pH=7 + 0,25 mL de fenilhidrazina. Após agitação mecânica dos tubos, 1,25 mL de HCl concentrado e pré-resfriado + 0,25 mL de ferricianeto de potássio 0,05 M foram adicionados, misturados e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da cor rósea foi feita em espectrofotômetro a 535 nm, usando-se água "milli-Q" + reagentes como branco. A concentração de ureídeos foi determinada a partir da curva padrão obtida com alantoína p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em mmoles de N-ureídico / kg MS de tecido.

2.2.10 Determinação do teor de clorofilas *a*, *b* e totais

A extração da clorofila foi feita pelo método descrito por ENGUEL & POGGIANI (1991), com base no clássico de ARNON (1949). 7 mg de folhas secas liofilizadas foram maceradas em almofariz com acetona 80% (v/v) durante 5 minutos. Após centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos, os teores de clorofilas foram medidos através de leituras do sobrenadante em espectrofotômetro a 645, 652 e 663 nm. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais foram determinadas conforme as relações a seguir (WHITHAM *et al.*, 1971):

$$\text{Clorofila } a = \frac{(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) V}{1000 W} \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b = \frac{(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) V}{1000 W} \quad (2)$$

$$\text{Clorofila total} = \frac{A_{652} \times 1000 \times V / 1000 W}{34,5} \quad (3)$$

onde: A = absorvância no comprimento de onda indicado

V = volume final do extrato de clorofila

W = matéria seca, em gramas, do material vegetal utilizado

2.2.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -2 mercaptoetanol

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e de β -2 mercaptoetanol, foram conduzidos seguindo-se a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação, contendo 3,5% de poliacrilamida, foi preparado com tampão TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1% (p/v). O gel de separação, com gradiente de 5% a 17,5% de poliacrilamida, foi preparado com tampão TRIS-HCl 3,0 M, pH 8,8, contendo SDS a 1% (p/v).

As amostras das farinhas dos nódulos e folhas liofilizadas (aproximadamente 2,5 mg/250 μ L de "tampão de amostra" – (TRIS-HCl pH 6,8 contendo glicerol + SDS + 2-mercaptoetanol + azul de bromofenol) a serem submetidas à eletroforese foram suspensas (misturados com agitação) no tampão TRIS-HCl 0,0625 M, pH 8,3 contendo SDS a 1%. A cada suspensão foi adicionada uma gota de 2 mercaptoetanol (1%) e estas tratadas a 100 °C por 5 minutos e centrifugadas, em centrífuga eppendorff, por 5 minutos. Gotas de azul de bromofenol a 0,02% e cristais de sacarose p.a (Sigma) foram acrescentados aos extratos antes das mesmas serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à amperagem constante (20 mA), com uma duração média de 4 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado para corar durante uma noite com "coomassie brilliant blue R-250" à 0,05%, preparado em metanol: ácido acético : água (5:2:5, v/v/v), sendo o descoramento do gel feito numa mistura de metanol:ácido acético: :água (3:1:6 v/v/v). Albumina sérica bovina (66 KDa); Albumina de ovo (45 KDa); Gliceraldeído-3-P-Dehidrogenase (36 KDa); Anidrase carbônica de Bovino (29 KDa); Tripsinogênio de pâncreas bovino (24 KDa); Inibidor de tripisina de soja (20 KDa) e α -Lactolbumina de leite bovino (14.2 KDa) foram usadas como marcadores de massa molecular (SIGMA).

2.2.12 Determinação da composição de aminoácidos totais em farinhas de nódulos e folhas

As farinhas liofilizadas de folhas e nódulos foram hidrolizadas com HCl 6N, à 110 °C, por aproximadamente 24 horas em ampôlas seladas e a vácuo. Em seguida, o HCl foi removido por evaporação e o resíduo foi analisado em um analisador automático de aminoácidos modelo Bio Chrom 20 (Pharmacia), após diluição prévia. As quantidades de massas de farinhas de folhas e nódulos foram inicialmente testadas para se alcançar a máxima eficiência do equipamento. Juntamente com as amostras, foram introduzidas amostras padrões dos aminoácidos conforme MARQUEZ & MARIA (1996).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação, sob condições climáticas próximas das condições naturais. Durante o período experimental, prevaleceram temperaturas elevadas ao longo do dia (25 - 36 °C) e da noite (25 - 28 °C), com a umidade relativa variando de 39 a 85 %. O estresse hídrico foi imposto às plantas de feijão-de-corda a partir da suspensão da irrigação. Sob essas condições de alta demanda evapotranspiratória e temperaturas elevadas, observou-se, a partir de 24 horas de estresse, murchamento parcial das folhas durante as horas mais quentes do dia. Ao final das tardes e início das manhãs, o turgor era recuperado parcialmente, ocorrendo um intenso movimento nas folhas das plantas estressadas, na orientação contrária à incidência da radiação solar.

A partir do 2º dia de estresse, foi observado um aumento no murchamento e paralisação na expansão dos folíolos e redução do crescimento (altura) das plantas. No último dia de seca (4º dia), houve déficit hídrico intenso, com perda total da turgescência das folhas, ocorrência de abscisão foliar, início de necrose em algumas folhas e tombamento das plantas. Após a reirrigação, foi observada uma rápida resposta em termos de recuperação visual da turgescência das plantas, a qual ocorreu após cerca de uma hora.

Os efeitos mais evidentes do déficit de água ocorreram sobre as taxas de crescimento das plantas (g MS/planta/dia). No intervalo dos 4 dias de estresse, esses valores médios foram 0,13 g MS/planta/dia e 2,37 g MS/planta/dia nos tratamentos com déficit de água e controle, respectivamente (Figura 1 A). Após 24 horas de reidratação, os valores foram de 2,93 g MS/planta/dia e 4,44 g MS/planta/dia, nos dois tratamentos, respectivamente. Esses resultados evidenciam a excelente recuperação nas taxas de fotossíntese apresentadas pelas plantas de feijão-de-corda quando reidratadas. É importante observar que as intensas reduções nas taxas de crescimento foram relacionadas com os decréscimos nas taxas de lançamentos de novos folíolos - indicado pela variação no número de folhas (Figura 4 A) e pelo

pelo decréscimo nas taxas de alongação - mostrado pela variação na altura das plantas (Figura 4 B). Esses resultados foram esperados e já observados para a maioria das plantas sob estresse hídrico severo (SCHULZE, 1986; TAIZ & ZEIGER, 1991; NOBEL, 1992; SALISBURY & ROSSI, 1992).

O déficit de água alterou significativamente a partição de matéria seca das partes vegetativas das plantas. Foi constatada uma alocação preferencial de assimilados para as raízes, indicada pelo decréscimo na relação parte aérea/raiz (Figura 1 B), e variação nas massa seca de raízes (Figura 3 A), massa seca de folhas (Figura 2 A), massa seca de caules (Figura 2 B) e massa seca de nódulos (Figura 3 B). É interessante observar que à exceção das raízes, todas as outras partes das plantas apresentaram reduções nas massas seca acumuladas em relação ao dia inicial do estresse. Esses resultados também estiveram dentro do esperado, conforme já observado por outros autores, particularmente em genótipos mais tolerantes às condições de seca. Inclusive, essa capacidade genético-fisiológica de mostrar maior crescimento relativo nas raízes (menor relação parte aérea/raiz) tem sido utilizada para identificar materiais mais tolerantes à seca (TURNER, 1979; JONES *et al.*, 1981; COSTA *et al.*, 1991). Trabalhos com cultivares de feijão-de-corda mais tolerante à seca têm mostrado existir uma relação positiva entre o crescimento radicular e o grau de tolerância (GUIMARÃES, 1988).

O maior crescimento das raízes das plantas estressadas ocorreu em detrimento, principalmente, da massa de folhas (Figura 2 A) e dos nódulos (Figura 3 B). Resultados semelhantes foram relacionados com aumentos nos níveis de ácido abscísico em plântulas de milho submetidas à desidratação (SAAB *et al.*, 1990). É importante observar que a umidade das folhas praticamente não variou durante o período experimental (Figura 5 A), ratificando que feijão-de-corda apresenta um mecanismo eficiente de manutenção do estado hídrico das folhas principalmente através do controle na resistência estomática e fluxo de água, conseguindo manter o potencial hídrico em níveis satisfatórios durante as fases de estresse (CANCIAN, 1978; SHOUSE, 1979; TURK & HALL, 1980a; TURK & HALL, 1980b; CARVALHO *et*

al., 1998). É interessante observar que o feijão-de-corda apresenta baixa capacidade de ajustamento osmótico, conforme os resultados de Mc CREE & RICHARDSON, (1987), quando comparam essa espécie com a beterraba açucareira.

Além da eficiência no controle dos estômatos, SHACKEL & HALL (1979), observaram que *Vigna unguiculata* apresenta movimentos e orientações nos folíolos capazes de reduzir a quantidade de radiação incidente, estando de acordo com o observado nesse trabalho. Por outro lado, as raízes de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, apresentaram reduções significativas no teor de umidade, variando de 91 a 42% no intervalo de 4 dias de estresse (Figura 6 A). Nos nódulos, a umidade variou de 84 a 77% (Figura 6 B), mostrando que essas partes foram mais sensíveis à desidratação, em termos de perda relativa de água. Trabalhando com *Vicia faba* noduladas e submetidas à seca progressiva, GUERIN *et al.*, (1990) observaram uma correlação positiva entre os potenciais hídricos das folhas e dos nódulos durante a dessecação. É possível que em nosso trabalho possa também ter ocorrido uma relação positiva entre os potenciais de água nas folhas, os potenciais nos nódulos e o teor de umidade nos nódulos (Figura 6 B).

As concentrações de clorofilas a e clorofilas totais mantiveram-se praticamente constantes durante o estresse hídrico e após a rehidratação (Figura 7 A e 7 B). Alguns autores têm utilizado o "índice de estabilidade da clorofila" para identificar cultivares mais tolerantes de feijão-de-corda (YADAVA & PATIL, 1984). Em nosso caso, Vita 7 mostrou alta estabilidade de clorofila. Esses resultados sugerem que o aparelho fotossintético das plantas estressadas foi mantido protegido durante o período de déficit de água. Outra evidência importante foi a intensa recuperação nas taxas de assimilação líquida ($g\ MS/cm^2$ folha/dia) após a rehidratação, evidenciando a retomada nas taxas de fotossíntese (dados não apresentados). Conforme será discutido no Capítulo 2, a recuperação mostrada na atividade de redutase de nitrato nas folhas após a rehidratação (Figura 15 A) também reforça a idéia de que a integridade do sistema fotossintético foi pouco alterado (SINHA & NICHOLAS, 1981).

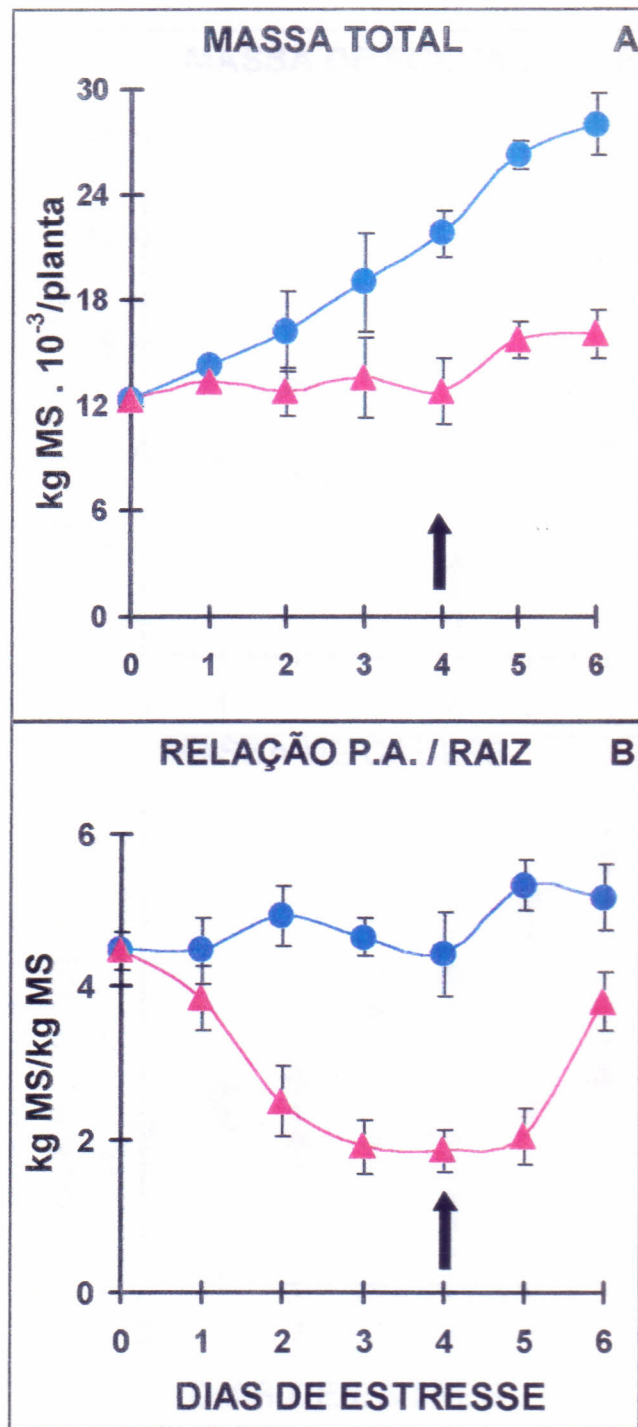


Figura 1. Matéria seca total (A) e Relação parte aérea/raiz (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

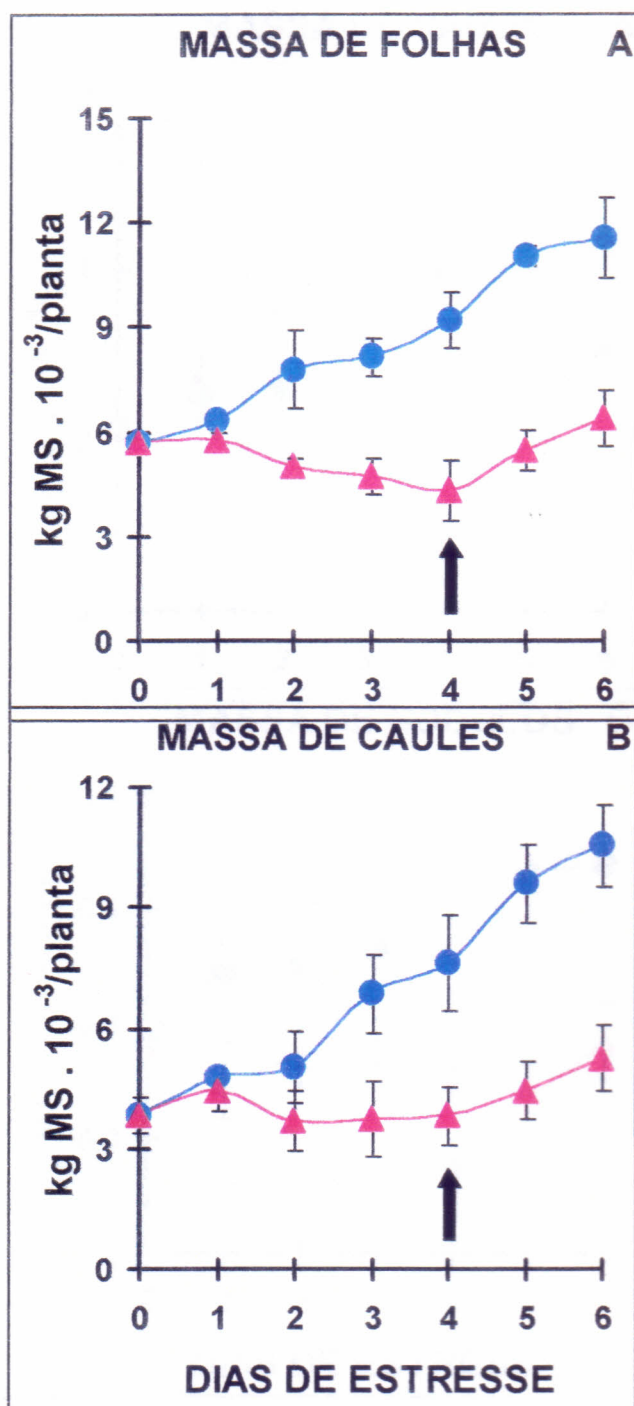


Figura 2. Matéria seca de folhas (A) e matéria seca de caules (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

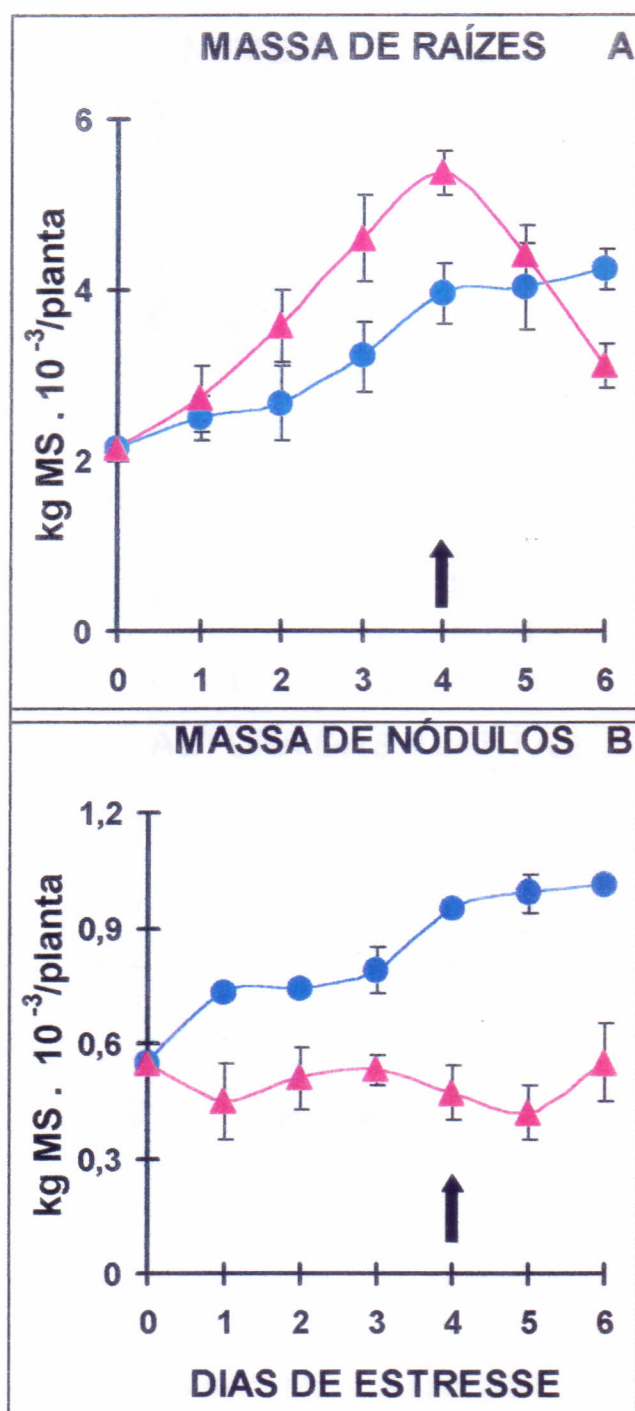


Figura 3. Matéria seca de raízes (A) e matéria seca de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

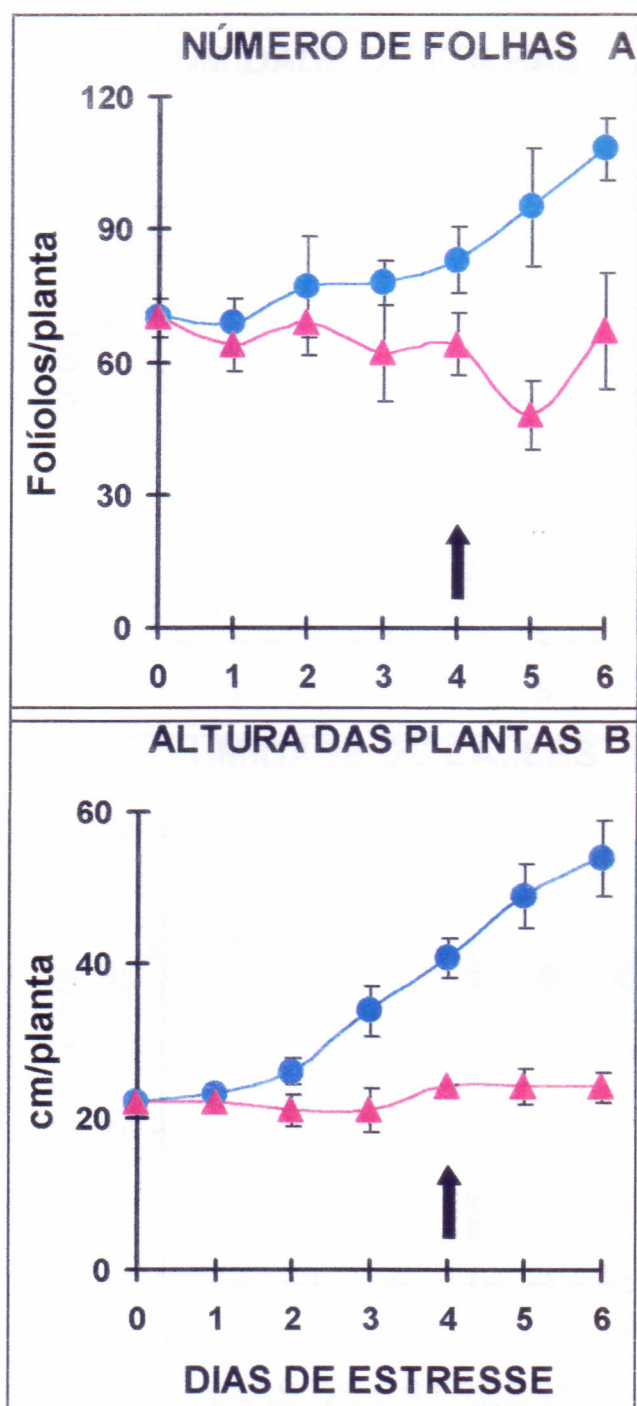


Figura 4. Número de folhas (A) e altura (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

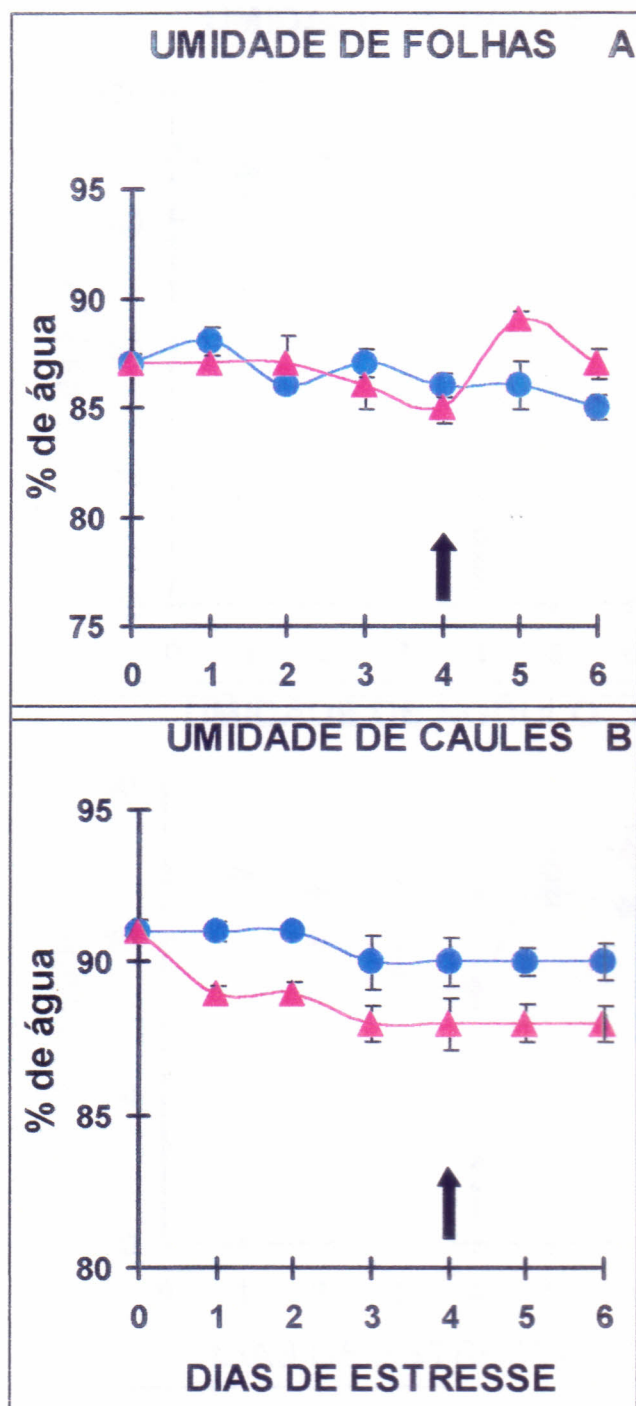


Figura 5. Umidade de folhas (A) e umidade de caules (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

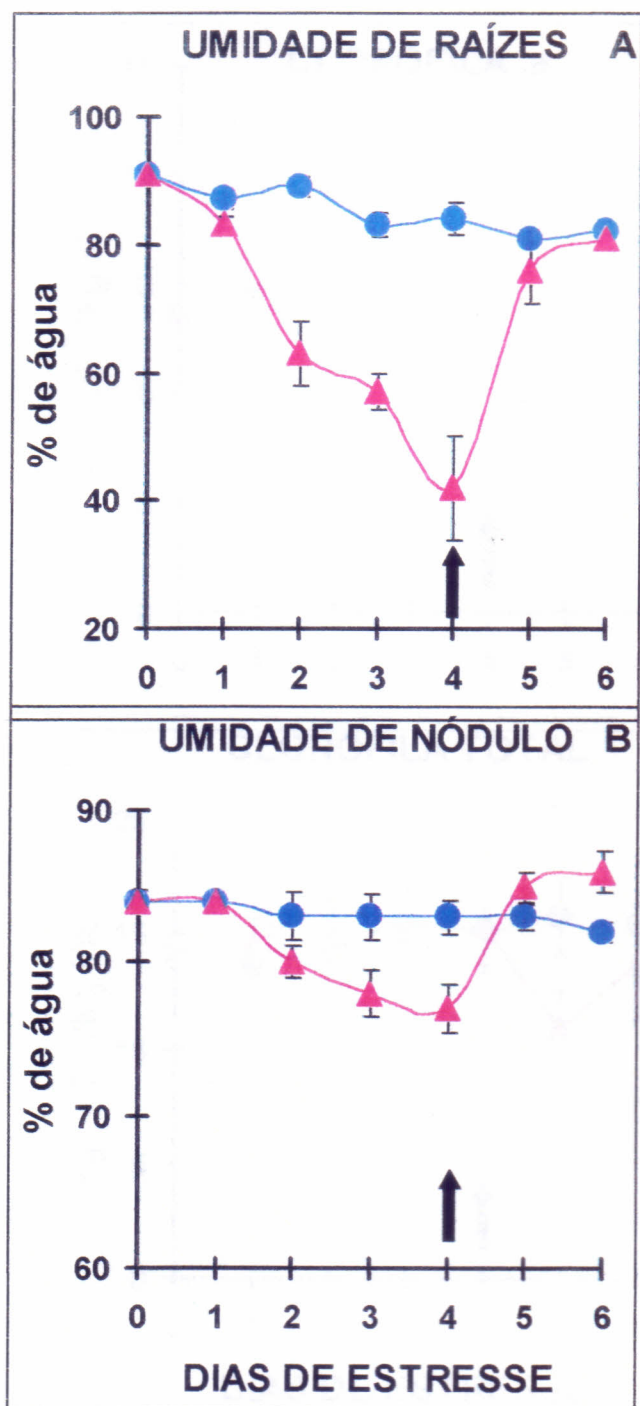


Figura 6. Umidade de raízes (A) e umidade de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

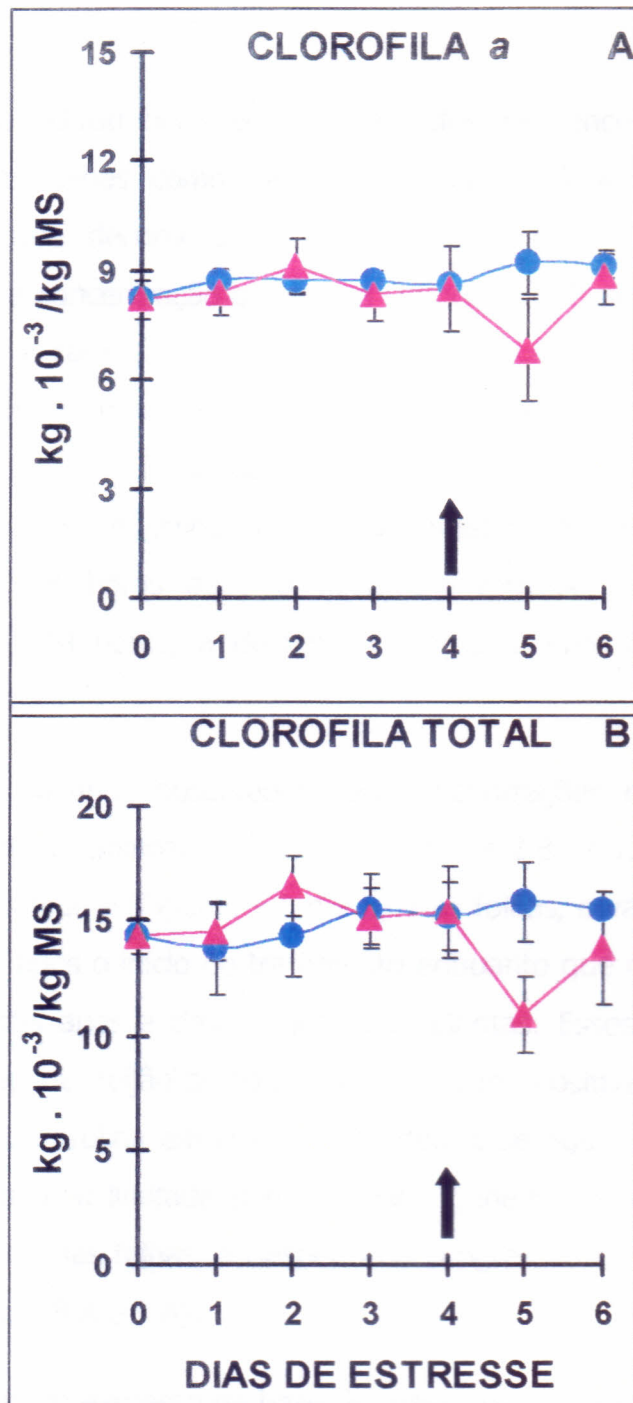


Figura 7. Concentração de clorofila *a* (A) e de clorofilas totais (B) em folhas de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

O déficit de água induziu incrementos acentuados nas concentrações de prolina livre, tanto nas folhas como nas raízes (Figuras 8 A e 8 B). É interessante observar que decorridos apenas 24 horas após o início da suspensão da irrigação a concentração de prolina (mmol/kg MS) aumentou 3,8 e 8,7 vezes nas folhas e raízes, respectivamente. Nesse período, quando os valores foram expressos na base de % de prolina em relação ao total de aminoácidos livres, os aumentos foram de 2,2 e 6,6 vezes para folhas e raízes, respectivamente. Os valores máximos de acúmulo relativo de prolina foram atingidos praticamente 48 horas após o início do estresse, tendendo a estabilizar nas próximas 48 horas, a despeito do agravamento do estresse hídrico (Figuras 9 A e 9 B).

Os incrementos máximos observados nas concentrações relativas de prolina livre (% do total de aminoácidos livres) foram de 2,8 e 12 vezes em folhas e raízes, respectivamente (Figuras 9 A e 9 B). Nas folhas, o valor máximo foi observado 48 horas após o início do tratamento enquanto que nas raízes o máximo ocorreu 72 horas após a desidratação das plantas. Esses resultados indicam que as plantas de feijão-de-corda responderam positivamente em termos de acumulação de prolina em resposta ao déficit de água. Entretanto, essa espécie apresentou uma limitada potencialidade genético-fisiológica para acumular esse aminoácido nas folhas, a despeito da progressão da severidade do déficit de água (Figuras 8 A e 9 A).

Na realidade, quando expresso na base de massa seca, o incremento na concentração de prolina nas folhas foi maior. Entretanto, esses dados devem ser observados com cautela tendo em vista a grande redução no acúmulo de massa seca (cerca 2,1 vezes) e o aumento na concentração dos aminoácidos livres totais (Figura 10 A). Esses resultados estão de acordo com outros relatados para *Vigna unguiculata*, mostrando que a espécie apresenta uma limitação aparente para produzir ajustamento osmótico nas folhas (Mc CREE & RICHARDSON, 1987). Na realidade, o feijão-de-corda mantém o controle do

potencial hídrico das folhas através de redução no fluxo de água a partir das raízes (TURK & HALL, 1980b), aumento da resistência estomática (CARVALHO *et al.*, 1998), além de movimentos orientados dos folíolos para redução na interceptação da radiação solar (SHACKEL & HALL, 1979).

É interessante observar os resultados apresentados pelas raízes quanto ao ajustamento osmótico. Além de mostrar um acúmulo de prolina 4,3 vezes maior do que o das folhas (Figura 9 A e 9 B), deve ser ressaltado que as raízes tiveram o crescimento (incremento de massa seca) aumentado pelo déficit de água (Figura 3 A). Assim, pode-se afirmar que nessa parte das plantas de feijão-de-corda ocorreu um intenso acúmulo real de prolina livre em resposta à desidratação, possivelmente como um mecanismo de ajustamento osmótico. Além de prolina, observou-se também acumulação de aminoácidos livres totais, porém em menor extensão (Figura 10B). Essas observações evidenciam a importância desse órgão como sensor de estresses, particularmente o déficit de água (SALISBURY & ROSSI, 1992). Na realidade, o papel das raízes no ajustamento osmótico ainda é pouco conhecido (JONES *et al.*, 1981; TAIZ & ZEIGER, 1991).

Tendo em vista que o estresse hídrico restringe intensamente a translocação de aminoácidos no floema a partir das folhas para as raízes (HANSON & HITZ, 1982), e que as concentrações de aminoácidos livres totais das folhas aumentaram somente na proporção das reduções de sua massa seca (Figuras 10 A e 2 A, respectivamente), deduz-se que os incrementos nas concentrações de aminoácidos e prolina livre, em particular, são produtos do próprio metabolismo das raízes ou migração de aminoácidos de outras partes da planta. Por outro lado, também deve ser descartada a possibilidade de que os mesmos possam ser produtos da degradação de proteínas, tendo em vista as altas taxas de crescimento apresentadas por esse órgão (Figura 3 A).

É possível que possa ter ocorrido uma migração de aminoácidos a partir dos caules para as raízes, tendo em vista que suas concentrações foram

ligeiramente diminuídas naqueles órgãos nas 48 horas após o início do estresse (Figura 11 A). Os nódulos devem ter contribuído significativamente como fonte de compostos nitrogenados para as raízes. Durante o período de estresse, as concentrações de aminoácidos totais nos nódulos foram reduzidas drasticamente (Figura 12 B), juntamente com a degradação de algumas proteínas indicadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 14) e decréscimo nas concentrações de proteínas solúveis (Figura 20 B- Cap. 2). Além disso, os nódulos das plantas estressadas apresentaram atividade de redutase de nitrato semelhante ao controle, sugerindo que essa parte da planta também pode ter suprido as raízes com aminoácidos provenientes da assimilação do nitrato (Figura 15 B).

A origem metabólica e o possível papel osmorregulador da prolina durante o estresse hídrico ainda são incertos e motivos de especulações (ASPINAL & PALLEG, 1981; STEWART, 1981; MORGAN, 1984; LEA, 1997). A rota metabólica mais provável para a biossíntese de prolina é a partir de glutamato (VIÉGAS *et al*, 1999). As outras vias possíveis são a partir da citrulina, da degradação de proteínas ricas em prolina ou da redução nas taxas de oxidação de prolina (STEWART, 1981). As concentrações relativas de prolina total (% do total de aminoácidos) em folhas e nódulos não foram alteradas pelo estresse hídrico (Tabela 2 e Tabela 3), indicando que a concentração desse aminoácido nas proteínas totais não foi alterada. Na realidade, a composição relativa de todos os aminoácidos totais em folhas e nódulos não foi alterada pelo estresse hídrico (Tabela 2 e Tabela 3), evidenciando que as principais alterações no metabolismo dos aminoácidos, induzidas pelo estresse, devem ter ocorrido na fração "solúvel" (SILVEIRA, 1987).

As variações nas concentrações de aminoácidos livres nos caules, em função do tempo de estresse e da rehidratação, foram diferentes daquelas apresentadas pelas folhas (Figuras 10 A e 11 A). Nos caules não foi observado acúmulo de aminoácidos durante o período de desidratação. Por outro lado, após a reidratação a concentração dos aminoácidos livres foi reduzida

aproximadamente em 50%, em relação às plantas anteriormente estressadas e ao controle. Enquanto isso, foi verificada uma progressiva acumulação de ureídeos nos caules durante o período dos 4 dias de desidratação, atingindo um valor máximo 4,5 vezes superior ao controle (Figura 11 B). Após a reidratação, esse valor foi reduzido em, aproximadamente, 50%. Esses dados sugerem que plantas noduladas de feijão-de-corda sob estresse hídrico podem acumular grandes quantidades dos ureídeos provenientes da fixação simbiótica de N_2 e não degradados pelas alantoinases das folhas (SCHUBERT, 1986). Por outro lado, os caules não acumularam aminoácidos, ao contrário, supriram suas reservas principalmente para o crescimento da parte aérea após a reidratação.

Esses resultados estão de acordo com os apresentados por outros tipos de estresses ambientais em que a composição dos aminoácidos da fração protéica é bastante estável, enquanto a composição da fração "solúvel" é extremamente variável (SILVEIRA & CROCOMO, 1989; RABE, 1993). Assim, é provável que o acúmulo de prolina livre, principalmente nas raízes, deve ter sido produto de sua biossíntese na fração "solúvel" dos compostos nitrogenados, provavelmente a partir de glutamato e citrulina. É interessante observar que as concentrações de prolina livre diminuíram drasticamente, em folhas e raízes, após 24 horas de reidratação (Figuras 8 A , 8 B, 9 A e 9 B). Portanto, a magnitude e a rapidez das oscilações de suas concentrações sugerem um papel efetivo no ajustamento osmótico de feijão-de-corda. Entretanto, a efetividade de sua presença nos tecidos estressadas, assim como sua origem metabólica e os mecanismos de sinalização molecular de percepção do estresse hídrico (BRAY, 1993), fogem dos objetivos deste trabalho.

Folhas e nódulos apresentaram diferentes respostas no perfil da eletroforese das proteínas totais (Figuras 13 e 14). Nas primeiras, o estresse hídrico induziu pequenas variações na intensidade visual das bandas protéicas, enquanto que nos nódulos foram visualizadas reduções em diversas bandas, principalmente naquelas com massas moleculares aparentes de, aproximadamente, 55, 50, 45, 36, 33 e 30 kDa (Figura 14). Esses resultados

foram corroborados pelas variações nas concentrações de aminoácidos totais (Figura 12 B) e de proteínas solúveis (Figura 20 B - Cap. 2). É interessante observar que após 24 horas de reidratação, houve uma redução acentuada na intensidade visual de diversas bandas protéicas de folhas (Figura 13), paralelo às diminuições nas concentrações de proteínas solúveis (Figura 24 A - Cap. 2).

Os resultados anteriores sugerem que as proteínas dos nódulos foram mais sensíveis ao déficit de água, possivelmente pelo aumento na atividade de proteases (SILVEIRA et al., 1999 a). Por outro lado, aparentemente, as proteínas das folhas foram relativamente menos sensíveis à desidratação em termos de degradação. Entretanto, após a reidratação, é provável que várias frações protéicas tenham sido metabolizadas através do aumento no "turnover" das proteínas. Esses resultados são esperados desde que o déficit de água provoca reduções na intensidade de síntese de proteínas (BEWLEY, 1981; TAIZ & ZEIGER, 1991; RABE, 1993) e aumentos na atividade de proteases (SINHA & NICHOLAS, 1981; RABE, 1993). Os dados anteriores também estão de acordo com a intensidade de retomada do crescimento em nódulos (Figura 3 B) e folhas (Figura 2 A) após a reidratação, tendo sido maior nas folhas.

Os resultados evidenciam que, a despeito da severidade do estresse hídrico induzido, as plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, foram capazes de apresentar excelente capacidade de recuperação à reidratação, mostrado pelo aspecto visual na turgescência das folhas e incremento nas taxas de crescimento, principalmente das folhas. Além disso, as concentrações de clorofilas foram mantidas constantes durante o estresse, sugerindo algum mecanismo protetor para o aparato fotossintético. Da mesma maneira, a relação proteínas/massa seca permaneceu praticamente constante nas folhas, indicando uma certa estabilidade no balanço de proteínas/crescimento. Por outro lado, os nódulos, aparentemente, foram mais sensíveis ao estresse, em termos de crescimento e de alterações na integridade de suas proteínas.

Além da excelente capacidade de manutenção do estado hídrico da planta, através do controle da abertura dos estômatos, movimentação das folhas e controle no fluxo de água para a parte aérea, como é conhecido na literatura, as plantas noduladas de feijão-de-corda mostraram uma boa capacidade de ajustamento osmótico nas folhas, possivelmente com a efetiva participação de prolina e possivelmente ureídeos livres. Entretanto, foram as raízes as partes mais ajustadas ao estresse hídrico, mantendo taxas de crescimento superiores às do controle e excelente ajuste osmótico, a partir do acúmulo de prolina e aminoácidos livres.

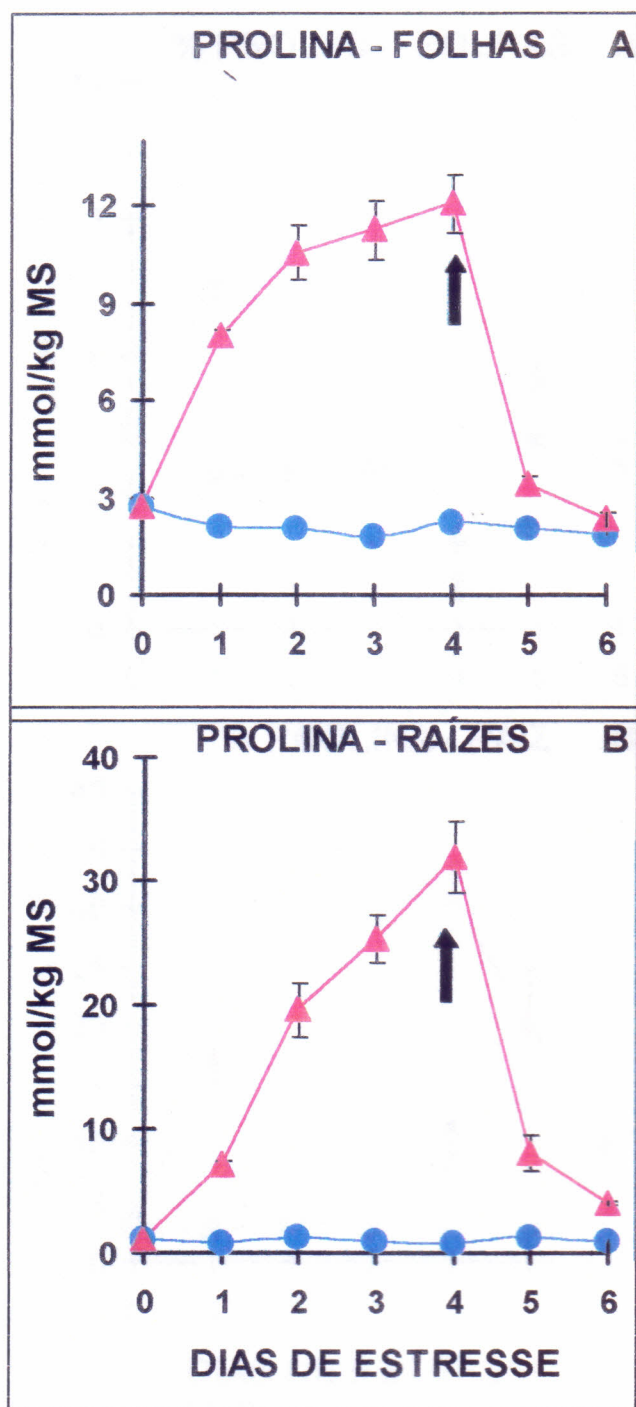


Figura 8. Concentração de prolina nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

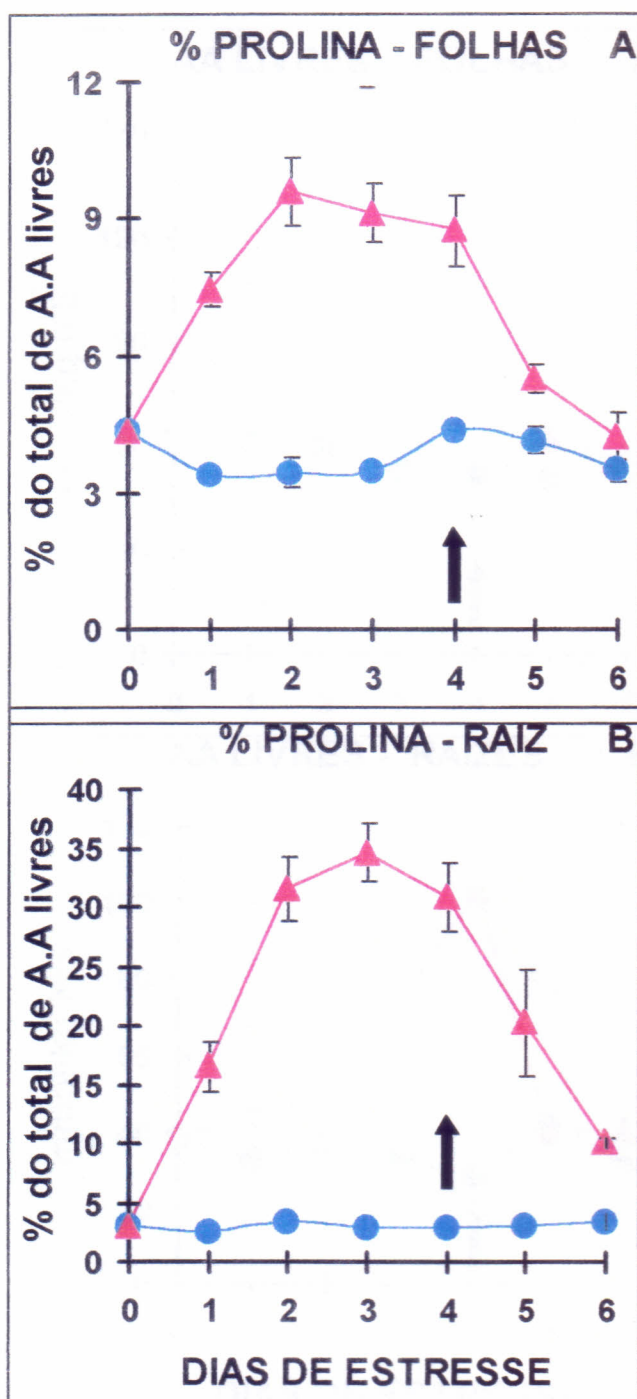


Figura 9. Concentração relativa de prolina (% do total de a.a livres) nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

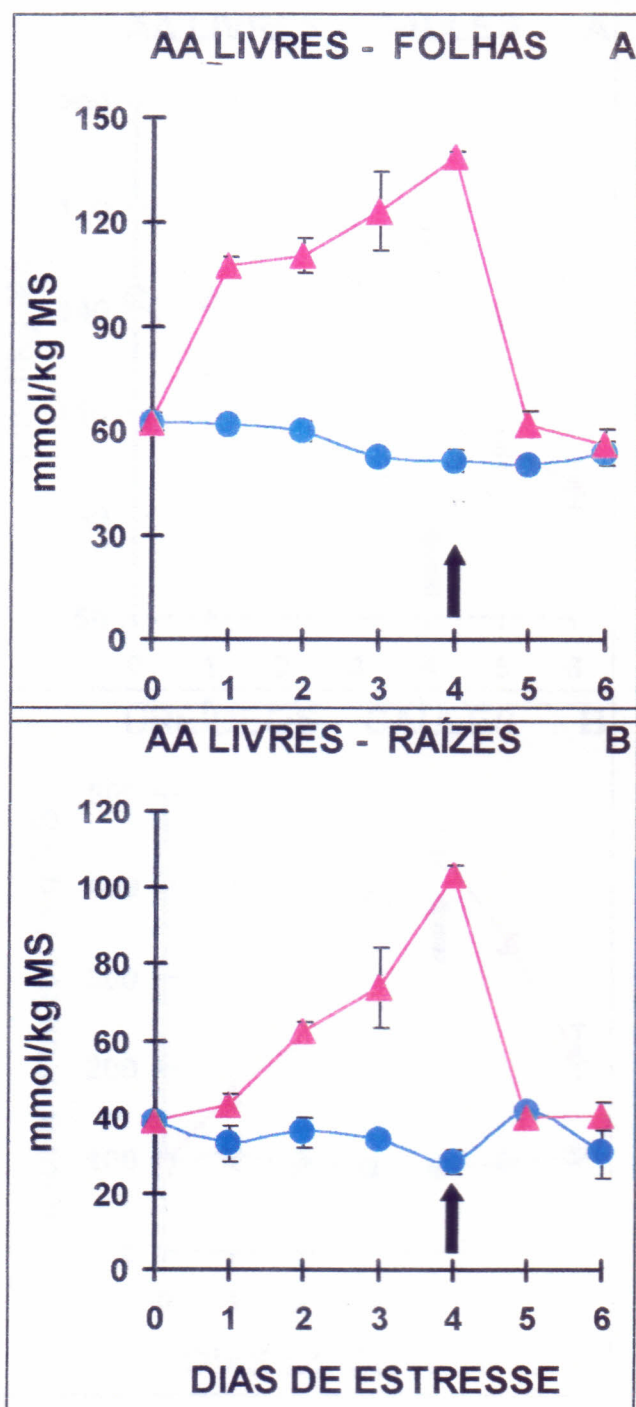


Figura 10. Concentração de aminoácidos livres totais nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

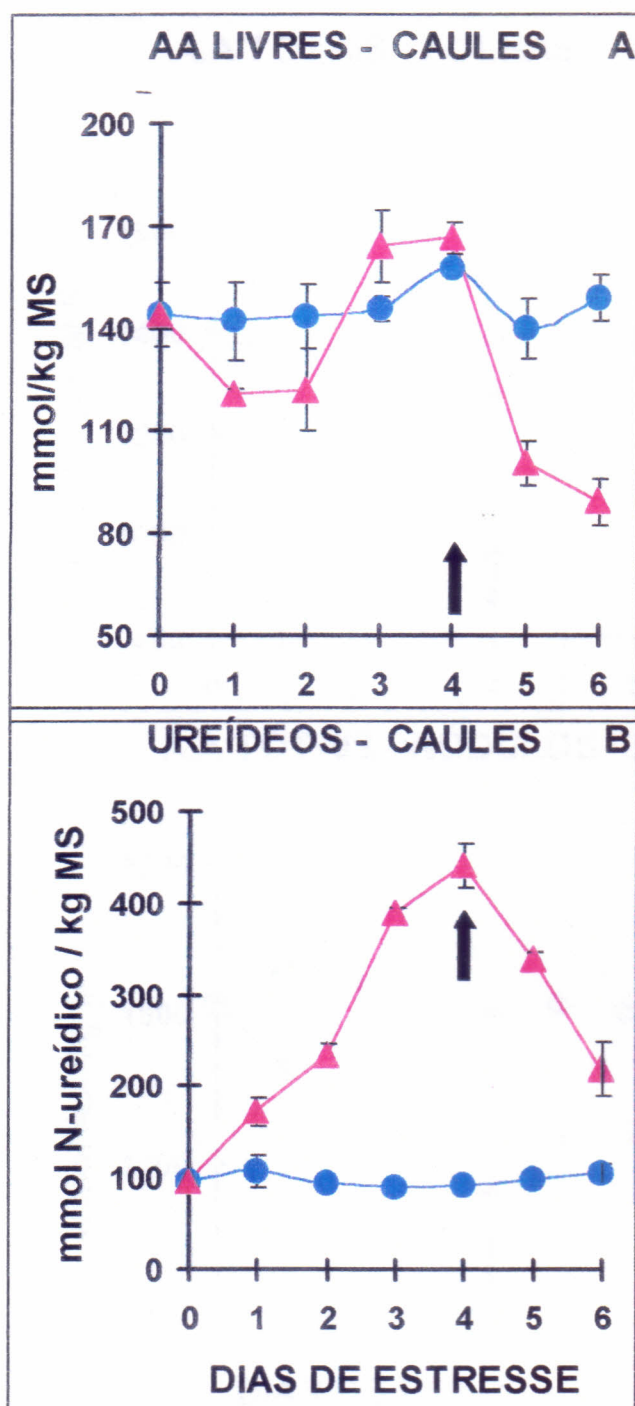


Figura 11. Concentração de aminoácidos livres totais em caules (A) e concentração de ureídeos em caules (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

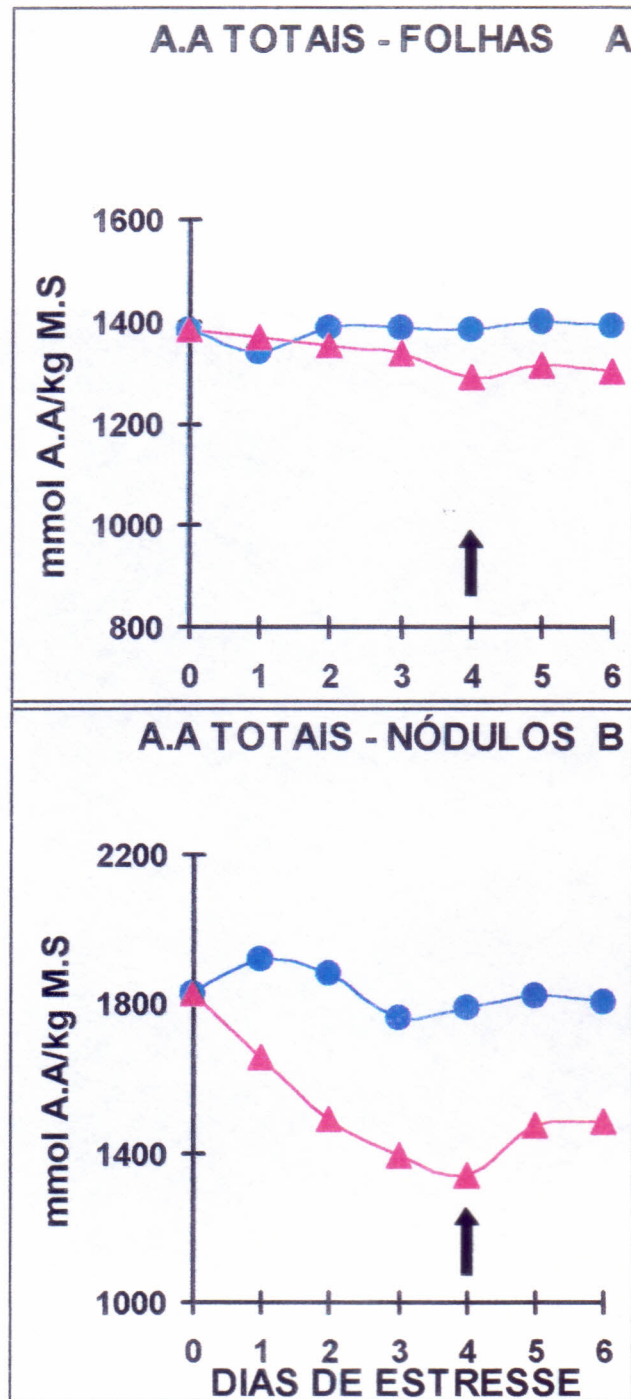


Figura 12. Concentração aminoácidos totais em folhas (A) e nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação das plantas e as barras representam o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

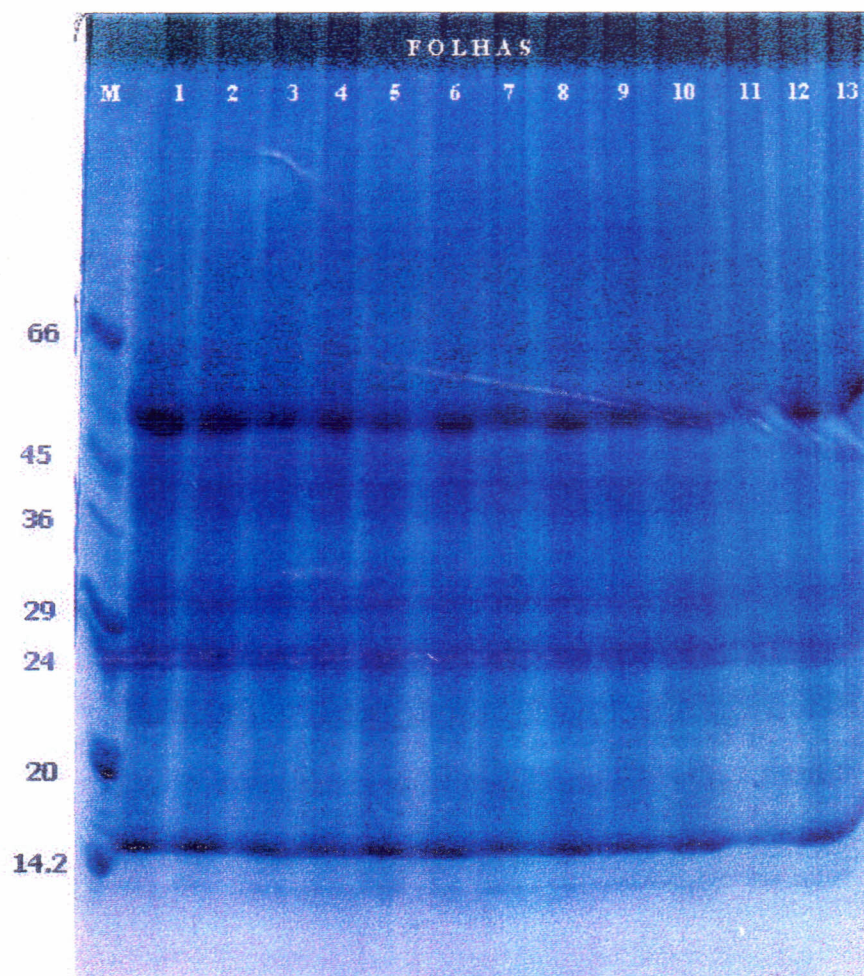


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, da farinha de folhas de feijão-de-corda submetidas à desidratação e reidratação.

M=marcador de massa molecular;

1,2,4,6,8,10 e 12=plantas controle (sem estresse hídrico);

3,5,7 e 9=plantas com 1,2,3 e 4 dias de desidratação, respectivamente;

11 e 13=plantas com 1 e 2 dias após a reidratação, respectivamente.

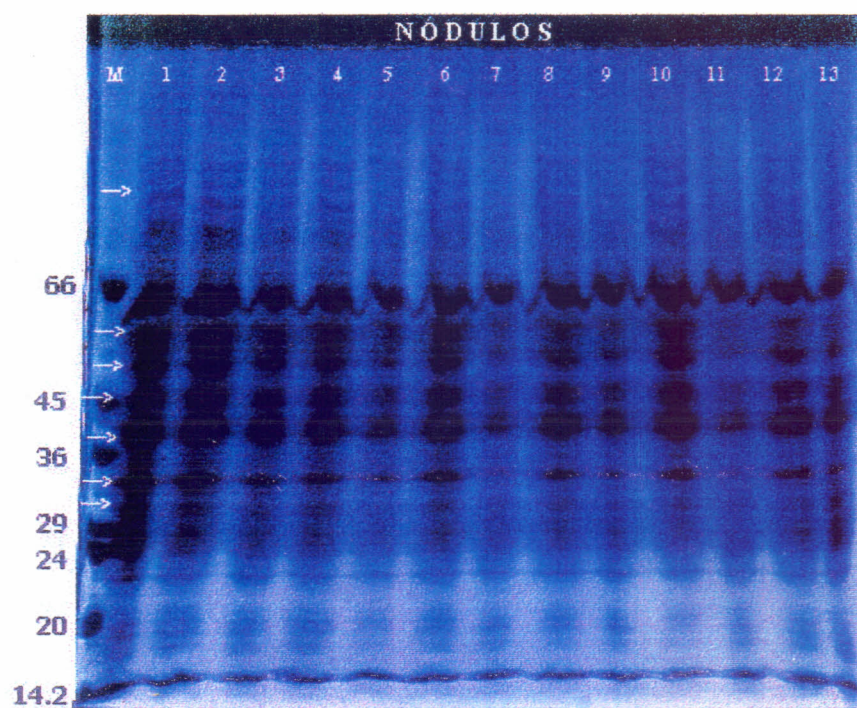


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, da farinha de nódulos de feijão-de-corda submetidas à desidratação e reidratação.

M=marcador de massa molecular;

1,2,4,6,8,10 e 12=plantas controle (sem estresse hídrico);

3,5,7 e 9=plantas com 1,2,3 e 4 dias de desidratação, respectivamente;

11 e 13=plantas com 1 e 2 dias após a reidratação, respectivamente.

Tabela 2 : Porcentagem de aminoácidos totais (% do total de A.A.) de farinha de folhas de plantas de feijão-de-corda, submetidas a 4 dias consecutivos de estresse hídrico e reidratado após esse período (indicado pela seta).

C= controle E= estresse hídrico

	TEMPO ↓													
	0		1		2		3		4		5		6	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
AA														
Asp + Asn	9	9	10	11	11	10	10	10	9	10	10	10	10	11
Thr	6	6	6	6	5	5	6	6	5	5	6	6	6	6
Ser	6	6	6	6	5	5	5	6	5	5	6	6	6	7
Glu + Gln	11	11	12	13	12	12	11	12	11	12	12	13	13	14
Pro	7	7	8	7	10	11	11	11	13	12	9	9	8	9
Gly	11	11	11	11	9	9	10	10	10	10	11	10	11	11
Ala	11	11	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10
Val	11	11	6	7	10	9	11	5	10	10	6	10	6	7
Met	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ile	4	4	4	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4
Leu	9	9	9	9	8	8	9	9	9	8	10	9	10	10
Tyr	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Phe	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	5	4	5	5
His	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lys	5	5	6	6	5	6	5	6	5	5	5	5	6	6

Tabela 3 : Porcentagem de aminoácidos totais (% do total de A.A.) de farinha de nódulos de plantas de feijão-de-corda, submetidas a 4 dias consecutivos de estresse hídrico e reidratado após esse período (indicado pela seta).

C= controle E= estresse hídrico

AA	TEMPO													
	0		1		2		3		4		5		6	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Asp + Asn	10	10	9	11	10	10	10	10	10	12	10	10	11	10
Thr	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ser	5	5	5	6	5	5	5	5	6	6	6	5	6	6
Glu + Gln	11	11	11	12	12	12	13	11	13	13	13	12	13	12
Pro	12	12	15	9	12	11	4	11	10	10	8	13	8	12
Gly	9	9	8	9	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9
Ala	13	13	13	14	13	13	14	15	13	14	13	14	13	13
Val	10	10	10	7	11	7	11	7	6	8	7	6	7	6
Met	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ile	3	3	3	3	3	3	4	4	3	4	4	3	4	3
Leu	7	7	7	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Tyr	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	3	2
Phe	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	3	3
His	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lys	6	6	6	7	6	6	6	6	7	6	6	6	7	6

3. CAPÍTULO 2

"ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] SUBMETIDAS AO DÉFICIT DE ÁGUA E À REIDRATAÇÃO"

3.1 INTRODUÇÃO

As leguminosas, dentre as plantas superiores, são as únicas capazes de usar simultaneamente ou isoladamente as fontes de nitrato do solo ou de fertilizantes e N_2 através da fixação simbiótica em associação com o rhizóbio (VESSEY & WATERER, 1992). O Nitrato é a principal fonte de nitrogênio inorgânico em solos cultivados. Embora o nitrato iniba tanto a nodulação como a fixação de N_2 por meio de mecanismos ainda desconhecidos, é observado que sua presença em baixas concentrações é favorável para o estabelecimento inicial de plantas noduladas (SILVEIRA *et al.*, 1998a). Por outro lado, é também observado que para uma espécie de leguminosa a tolerância ao nitrato para a nodulação depende da interação genética da cultivar e do tipo de estirpe envolvida na simbiose (WU & HARPER, 1990). A questão sobre a melhor fonte de N (NO_3^- ou N_2) para uma leguminosa é ainda uma razão de discussão, desde que vantagens e desvantagens existem para o uso de qualquer uma dessas formas de nitrogênio de maneira isolada (SILVEIRA *et al.*, 1998a). Com relação à *Vigna unguiculata*, tem sido observada uma alta capacidade para nodulação e fixação de N_2 em um largo espectro de estirpes de *Bradirhizobium ssp*, tanto em condições artificiais quanto em condições de campo (ARAÚJO & WATT, 1988).

Apesar de anos de pesquisa sobre o estudo do déficit hídrico em plantas superiores, ainda não está bem compreendido os processos moleculares que mais rapidamente são afetados pelo estresse hídrico, como também os mecanismos

iniciais de resposta molecular (BRAY, 1993). Em geral, é aceito que uma pequena redução no fluxo de água leva a uma redução das taxas de assimilação fotossintética do CO_2 , em resposta ao aumento da resistência estomática (SCHULZE, 1986). A atividade de várias enzimas é reduzida pelo estresse hídrico. Uma das mais sensíveis ao déficit de água é a redutase do nitrato (EC.1.6.6.1), que catalisa a redução do NO_3^- à NO_2^- , e que tem sido considerada como a reação "marca passo" da conversão de N-nitrato para aminoácidos e, também, um passo limitante na síntese de proteína (LEA, 1997). Em razão de ser, principalmente, uma enzima induzida pelo substrato e ser regulada por vários fatores metabólicos, a redutase do nitrato (RN) tem mostrado um mecanismo complexo de regulação pelo estresse hídrico, devido aos efeitos diretos e indiretos envolvidos (FOYER *et al.*, 1998).

O déficit hídrico induz uma abrupta redução nas taxas de absorção e no fluxo de nitrato das raízes para as folhas, fazendo cessar os mecanismos de síntese da proteína RN e sua atividade catalítica (SHANER & BOYER, 1976a e b). De acordo com os estudos de FERRARIO *et al.* (1998), com plantas de tabaco transgênicas, o estresse hídrico, inicialmente, provocou um aumento no "turnover" (degradação) da proteína RN pelo aumento da atividade de proteases e somente 3 dias após a desidratação, a concentração de RNA_m da RN foi rapidamente reduzido. Isto não poderia, contudo, explicar a rápida recuperação da atividade da RN após a reidratação da planta. Os autores também observaram que a expressão da redutase do nitrato do tipo constitutiva, temporariamente, retardou as perdas induzidas pelo estresse hídrico na atividade de RN e mais rapidamente recuperou a atividade da RN após a reidratação. Por outro lado, os nódulos de raiz de plantas leguminosas poderiam exibir significantes níveis de RN do tipo constitutiva, não induzível por nitrato (SILVEIRA *et al.*, 1998a).

A importância e o papel fisiológico para a redução do nitrato em nódulos ativos, ainda são desconhecidas, particularmente sob condições de estresse ambiental (SILVEIRA *et al.*, 1998a). O processo da fixação simbiótica de N_2 é intensamente dependente da energia da fotossíntese (GORGOCENA *et al.*, 1997).

Alguns pesquisadores têm mostrado que a redução na fixação de N_2 é relacionada com a carga energética do nódulo e nas variações no suprimento de fotossintetatos (PETTERSON *et al.*, 1979; FINN & BRUN, 1980). Por outro lado, o déficit de água induz uma grande redução nas taxas de fixação de N_2 por meio de mecanismos ainda não conhecidos (SPRENT, 1981; GUERIN *et al.*, 1990). O declínio nas taxas de fixação de N_2 em nódulos de soja submetidos a um déficit hídrico não foi correlacionado com a disponibilidade de carboidratos dos nódulos (FELLOWS *et al.*, 1987). Além disso, o estresse hídrico induziu uma significativa redução (70%) na atividade da nitrogenase (redução de acetileno) bem mais do que nas taxas de fotossíntese (5%) de plantas de soja (DURAND *et al.*, 1987), sugerindo que outros fatores, além daqueles relacionados com a fotossíntese, deveriam estar envolvidos com a redução na fixação de N_2 . O estresse hídrico também causa aumentos na resistência de difusão de O_2 através das células do córtex do nódulo para o tecido central. Além disso, induz significantes reduções na concentração de leghemoglobina, possivelmente pela atividade de proteases (GUERIN *et al.*, 1990).

Apesar da assimilação de nitrato e da fixação simbiótica do nitrogênio serem processos antagônicos, em termos de consumo de energia e regulação inibitória (VESSEY & WATERER, 1992), é possível que um equilíbrio favorável possa existir entre essas duas fontes de N, principalmente quando na presença de baixos níveis de nitrato e em condições de déficit de água. Nesta situação, a presença do nitrato poderia favorecer o ajustamento osmótico das plantas noduladas sob estresse hídrico. Entretanto, existem poucas informações sobre os efeitos e os mecanismos do déficit de água em relação a atividade de RN e a fixação simbiótica do N_2 em leguminosas noduladas em presença de nitrato. Neste trabalho foram realizados ensaios sobre alguns efeitos do déficit hídrico seguido da reidratação sobre alguns parâmetros relacionados com a assimilação do nitrogênio ($NO_3^- + N_2$) em plantas noduladas de *Vigna unguiculata* crescidas na presença de nitrato.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Condições do Experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-Ce, no período de outubro a dezembro de 1995. As temperaturas e umidades médias mínimas (noite) e máximas (dia), de dentro da casa de vegetação, variaram de 25 °C a 36 °C e 39% a 85%, respectivamente, durante o período experimental. O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de sílica : vermiculita na proporção de 1:2 (v:v), sendo a mesma lavada com água destilada por 5 vezes e, posteriormente, autoclavada por 20 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Utilizou-se vasos de Leonard modificados produzidos a partir de frascos de vidro de reagentes de 1 L, cortados nas duas extremidades opostas (em cima e em baixo) e ajustados um sobre o outro em sentido contrário, sendo a parte externa pintada com tinta cor prata.

As partes dos vasos apresentaram 20 cm de altura e 9 cm de diâmetro, perfazendo um volume de aproximadamente 800 cm³ em cada parte. Os vasos foram lavados internamente com hipoclorito de sódio comercial 20% (v:v). Cada vaso foi irrigado com solução de CaSO₄ 0,1 mM, até a saturação do substrato sólido da parte superior, para favorecer as condições de pH e suprimento de Ca⁺² para germinação e nodulação. Foi fornecida solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada no Laboratório de Metabolismo e Fixação de Nitrogênio da UFC (LABFIX), conforme a tabela 1, capítulo 1.

3.2.2 Material vegetal e estirpe utilizada

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], cultivar vita 7 foram procedentes do Centro Nacional de Pesquisa do Meio Norte/EMBRAPA, Teresina, Piauí. Conforme descrito por FREIRE FILHO *et al.* (1983), essa cultivar de

feijão-de-corda é recomendada para cultivo tanto em condições de baixa disponibilidade hídrica (sequeiro), como em condições de irrigação. Alguns trabalhos têm sugerido que a cultivar vita 3 apresenta características de tolerância ao déficit hídrico em relação às cultivares vita 5 e vita 7 (GOMES FILHO *et al.* 1996). A estirpe de *Rhizobium* spp. utilizada foi a Br 3256 fornecida pela Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia/EMBRAPA/ Rio de Janeiro, cuja planta hospedeira é *Vigna unguiculata*, de origem africana (Zimbabue) a qual apresenta também a designação de CB-756.

A estirpe foi crescida em meio YMB (DALTON, 1980) que foi utilizado como inoculante líquido, tendo sido feita contagem de células conforme SOMASEGARAN & HOBEN (1985) e padronização de 10^9 células/mL. Foram feitas 3 inoculações (1 mL/planta) :

1ª inoculação : 2 dias após o plantio

2ª inoculação : 3 dias após o plantio

3ª inoculação : 4 dias após o plantio

3.2.3 Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial tipo $2 \times 7 \times 1$ (condições hídricas x tempo x cultivar), com 3 repetições. Foi utilizado um tratamento controle (plantas somente inoculadas e sem a presença de nitrato). A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média ao longo do tempo.

3.2.4 Condução das plantas

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) 10 % (v/v), por 20 minutos sob aeração forçada, sendo imediatamente lavadas em água destilada por 3 vezes para retirar o excesso do NaClO. Em seguida, as sementes foram mergulhadas em água destilada, com aeração forçada, por um período de 20 minutos e lavadas por 5 vezes em água destilada para embebição. As sementes foram colocadas para germinar no próprio substrato, saturado no dia anterior com CaSO_4 0,1 mM, sendo plantadas 6 sementes / vaso. Após a emergência, foram mantidas e inoculadas 2 plantas/vaso conforme descrito no item 2.2.

As plantas receberam nutrientes minerais na forma de solução nutritiva (Tabela 1), através de sub-irrigação por capilaridade a partir da parte inferior dos vasos de Leonard, sendo que na 1ª semana a solução foi diluída 1/10, na 2ª semana a solução foi diluída 1/5 e nas semanas seguintes a solução foi empregada sem diluição e contendo 5 mM de NO_3^- . A solução nutritiva foi trocada a cada 2 dias, sendo que na 1ª semana foi fornecido apenas 1 mM de NO_3^- (exceto no controle com plantas somente inoculadas). Foi anotado diariamente o valor de pH da solução descartada.

Todos os dias foi feita adição de água destilada através da parte superior até completar o volume da solução contida na parte inferior. As temperaturas máximas e mínimas registradas no interior da casa-de-vegetação durante o período experimental são apresentadas no apêndice 2. Semanalmente, houve rodízio, ao acaso, dos vasos sobre as bancadas. Para tratamento fitossanitário, inseticida e fungicida foram utilizados quando necessário, conforme recomendação do Setor de Fitossanidade do Centro de Ciências Agrárias da UFC.

No vigésimo oitavo dia após a emergência das plantas (28º DAE) as plantas do tratamento "estresse hídrico" foram submetidas à retirada da água (solução) da parte inferior dos vasos, permanecendo apenas com a água retida na fase sólida da parte

superior durante 4 dias consecutivos e, após esse período, reidratadas diariamente durante 2 dias (reidratação), enquanto que as plantas controle foram mantidas diariamente na presença de solução nutritiva.

3.2.5 Coleta das plantas e determinação da massa seca

Foram feitas 7 coletas destrutivas, sendo que as plantas foram coletadas às 9:00 horas e separadas em raiz, caule com pecíolos, folhas e nódulos. Em seguida, as partes foram pesadas separadamente para determinação da massa fresca. Tomou-se uma amostragem de cada parte para determinar a porcentagem de umidade através da determinação da massa seca em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C, com exceção dos nódulos, cuja massa seca foi determinada após liofilização. Determinou-se também a altura das plantas, com o auxílio de uma fita métrica, e contou-se o número de folhas. Imediatamente após a coleta, as partes foram congeladas com N₂ líquido e mantidas em freezer (-20 °C) até a liofilização para preparo da farinha das partes.

3.2.6 Determinação da Atividade da Redutase do Nitrato em Folhas e Nódulos

Foi empregado o método *in vivo* de HAGEMAN & HUCKLESBY (1971), modificado. Foram pesados, aproximadamente, 200 mg de discos foliares de 0,5 cm de diâmetro e, aproximadamente, 200 mg de nódulos frescos em fatias finas. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio do tipo "vacutainer", contendo 5 mL do tampão de reação (tampão fosfato 0,1 M, pH=7,5; contendo isopropanol 1% (v/v), KNO₃ 50 mM e cloranfenicol 15 mg/L) e estes cobertos com papel alumínio (tratamento escuro). Em seguida, os tubos foram evacuados com o auxílio de uma bomba de vácuo, durante 2 minutos. Após, os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C, por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em tubos de ensaio tipo pirex, foram adicionados alíquotas de 1 mL de

tampão fosfato + 2 mL do extrato diluído + 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 2,4 M + 1 mL de N-1-naftiletilenodiamina dicloridrato (NNEDA) 0,02 % , totalizando um volume final de 5 mL. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm , usando-se água "milli-Q + reagentes como branco. A atividade da redutase do nitrato foi estimada através da produção de NO_2^- no meio de reação, sendo expressa em mmoles de NO_2^- /kg MF/ h, a partir de uma curva padrão obtida com KNO_2 p.a (Sigma).

3.2.7 Determinação da atividade de glutamina sintetase (GS) em nódulos e folhas

Nódulos liofilizados foram triturados em almofariz, em banho de gelo, na presença de nitrogênio líquido. A 0,1 g de nódulo, 5 mL(2+2+1mL) de tampão HEPES 0,1 M pH=8,0, contendo MgCl 10 mM + ditioneitol 5 mM + EDTA-Na 0,2 M foram adicionados. Após maceração por 5 minutos, a suspensão foi filtrada em pano fino de seda e centrifugada a $30.000 \times g$, a $0^\circ\text{--}4^\circ\text{C}$, por 30 minutos. O sobrenadante (citossol livre de células) foi congelado para posterior determinação da atividade.

As folhas foram trituradas em almofariz, banho de gelo, com nitrogênio líquido. A 0,2 g de folhas secas liofilizadas 5 mL (2mL + 2 mL + 1mL/ 2 minutos cada) de tampão de extração TRIS-HCl 25 mM, pH=7,6, contendo 10 mM de MgCl_2 + 10 mM de β -2-mercaptoetanol + PVP 5% (p/v) + 5 mM de EDTA-Na foram adicionados. Após maceração por 5 minutos, a suspensão foi filtrada em pano fino de seda e centrifugada a $30.000 g$ (21.000 rpm), a $0 - 4^\circ\text{C}$, por 30 minutos. O sobrenadante foi congelado para posterior determinação da atividade de GS.

A atividade de GS nos nódulos e nas folhas foi determinada pelo método biossintético do hidroxamato descrito em SILVEIRA *et al.* (1998). A reação foi preparada, em tubo de ensaio, com 600 μL de tampão de reação TRIS-HCl 0,25 M, pH=7,0 + 200 μL de glutamato de sódio 0,3 M, pH=7,0 + 200 μL de ATP 30 mM,

pH=7,0 + 200 μ L de $Mg\ SO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,5 M + 500 μ L de extrato de nódulos ou folhas + 200 μ L de solução de hidroxilamina ($NH_2\ OH$ 1,0 M + NaOH 1,0 M, na proporção 1:1 v/v). Após agitação vigorosa, em agitador de tubos tipo vortex e incubação em banho-maria, a 30 °C, por 30 minutos, 500 μ L de solução férrica [$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ 10 % (p/v) em HCl 0,2 M + ácido tricloroacético 24 % (p/v) + HCl 50 % (v/v), na proporção 1:1:1] foram adicionados e a suspensão centrifugada a 7.000x *g* por 10 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, usando-se água "milli-Q" (em substituição ao extrato enzimático) + reagentes, como branco. A atividade da glutamina sintetase (GS), foi determinada a partir da curva padrão de γ -glutamil-hidroximato e os resultados foram expressos em mmoles de γ -glutamil-hidroximato / kg MS de tecido / hora e mmoles de γ -glutamil-hidroximato / kg de proteínas solúveis 10^{-3} / hora.

3.2.8 Determinação da concentração de proteínas solúveis totais

As concentrações das proteínas solúveis totais de nódulos e folhas foram determinadas pelo método colorimétrico de BRADFORD (1976). Os nódulos liofilizados foram triturados em almofariz em banho de gelo e na presença de nitrogênio líquido (-196° C). A 0,1 g de nódulos secos alíquotas de 2 + 2 + 1 mL de tampão HEPES 0,1 M pH=8 , contendo KOH 0,1M + ditiotretitol 5 mM + EDTA-Na 0,2 M foram adicionadas. Após macerados durante 5 minutos, foram filtrados em pano fino de sêda e centrifugados a 30.000x*g*, a 0°-4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante (citosol livre de células) foi congelado (-20 °C) para posterior determinação de proteínas solúveis e atividade de glutamina sintetase. As folhas recém-colhidas e congeladas foram trituradas em almofariz em banho de gelo e na presença de nitrogênio líquido (-196° C). A 1 g de folha fresca foi adicionado (2 + 2 + 1 mL) tampão Tris-HCl 25 mM, pH=7,6, contendo $MgCl_2$ 10 mM + β -2-mercaptoetanol 10mM + EDTA-Na 5 mM + PVP insolúvel 5% (p/v). Após triturado durante 5 minutos, o macerado foi filtrado em pano fino de sêda e centrifugados a 30.000x *g*, a 0°-4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi

congelado para posterior análise. A reação foi preparada em tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,1 mL de extrato (diluiu-se quando necessário) + 2,5 mL do reagente de Bradford. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm, mantendo-se a faixa de 0,3 à 0,5 unidades de absorbância, usando-se água "milli-Q" + reagente como branco. A concentração de proteínas solúveis totais foi estimada a partir da curva padrão construída com soro albumina bovina p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em kg de proteína /kg MS. 10^{-3} de tecido.

3.2.9 Determinação de NO_3^- em raízes, caules e folhas

Foram adicionados 100 mg de tecido vegetal liofilizado a tubos de ensaio com rolha de borracha contendo 5 mL de água "milli-Q" e colocados para ferver em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram deixados a temperatura ambiente por alguns minutos e, posteriormente, centrifugados, a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e o precipitado foi ressuspenso com outros 5 mL de água "milli-Q", sendo repetido o procedimento da extração anterior. Em seguida, os extratos foram coletados em um tubo de ensaio graduado e o volume foi completado com água "milli-Q" até atingir 10 mL. Os extratos obtidos foram congelados para posterior análise.

O método utilizado foi o de CATALDO *et al* (1975), sendo os valores das alíquotas reduzidos para $\frac{1}{4}$ dos mencionados por esses autores. A reação foi preparada em tubo de ensaio, contendo 100 μL do extrato + 200 μL de solução de ácido salicílico 5 % (p/v), marca Sigma, em ácido sulfúrico concentrado p.a. (Merck). Após agitação vigorosa, em agitador de tubos tipo vortex os tubos foram deixados a temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, lentamente, 4700 μL de NaOH 2 M foram adicionados sob agitação para atingir pH acima de 12. Após repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos, as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 410 nm,

usando-se água "milli-Q" + reagentes, como branco. A concentração de NO_3^- foi determinada a partir da curva padrão com KNO_3 p.a (Sigma) e os resultados foram expressos em mmoles de NO_3^- / kg MS de tecido.

3.2.10 Determinação da concentração de leghemoglobina em nódulos

O método colorimétrico da cianometahemoglobina de WILSON & REISENAUER (1963) e DAKORA (1995), com algumas modificações, foi empregado. 0,2 g de nódulos secos liofilizados foi macerado juntamente com 10 mL de solução de DRABKIN [KCN 0,8 mM + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,6 mM + NaHCO_3 12 mM] por 3 vezes consecutivas (3 mL + 3 mL + 4 mL, durante 2 minutos em cada porção) . Após centrifugação a $500\times g$ por 15 minutos, o volume foi completado com solução de Drabkin para 10 mL, e novamente centrifugado a $30.000\times g$, a $0^\circ\text{-}4^\circ\text{C}$, por 30 minutos. A leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, usando-se a solução de Drabkin como branco. A concentração de leghemoglobina foi determinada a partir da curva padrão de hemoglobina e os resultados expressos em kg de leghemoglobina /kg MS 10^{-3} de nódulo.

3.2.11 Determinação de ureídeos na seiva do xilema

A análise foi feita pelo método colorimétrico de VOGELS & VAN DER DRIFT (1970), baseado na hidrólise da alantoína até glioxilato. Para a coleta da seiva do xilema, as plantas foram transferidas para o laboratório, às 9:00 hs da manhã. Todos os vasos foram colocados em presença de água destilada durante 30 minutos com finalidade de induzir a pressão radicular. Após isso, as plantas foram cortadas com uma lâmina na altura do nó cotiledonar, procedendo-se a lavagem e secagem do local do corte com papel de filtro. A seiva exsudada foi coletada com o auxílio de seringas

hipodérmicas de 1,0 mL, durante o tempo de 60 minutos, sendo desprezada a seiva inicial. O volume da seiva foi aferido e, em seguida, mantido em frasco de vidro, em freezer à aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da análise.

Para a análise, a 5 μL de seiva do xilema + 745 μL de água "milli-Q" foram adicionados 250 μL de NaOH 0,5 M . Após, agitação em um agitador de tubos tipo vortex e aquecimento, em banho-maria a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 8 minutos e resfriamento em banho de gelo foram adicionados 250 μL de HCl 0,65 M. Após agitação e novo aquecimento em banho-maria a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 minutos e resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 250 μL de tampão fosfato 0,4 M pH=7 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O} + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + 250 μL de fenilhidrazina (0,066 g/20 mL de H_2O) . Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e, então, colocados em água gelada. A seguir, 1250 μL de HCl concentrado p.a, pré-gelado + 250 μL de ferricianeto de potássio (0,417 g / 25 mL de H_2O) foram adicionados. Os tubos foram retirados da água gelada e agitados em agitador de tubos tipo vortex e deixados à temperatura ambiente por 15 minutos, até desenvolverem cor rósea ou vermelha. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 535 nm, usando-se água "milli-Q" + reagentes, como branco. A concentração de N-ureídeo foi determinada a partir de uma curva padrão com alantoína p.a.(Sigma). Os resultados foram expressos em mmoles de N-ureídeo / L de seiva.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento, foram avaliados os impactos relativos da seca (desidratação) progressiva e da reidratação sobre a assimilação do nitrogênio oriundo tanto da redução assimilatória do NO_3^- como da redução assimilatória do N_2 (fixação simbiótica de N_2), quando plantas noduladas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, foram supridas, simultaneamente, com essas duas fontes de N inorgânico. Assim, procurou-se comparar a sensibilidade e a capacidade de recuperação de cada um desses processos diante de uma situação de seca/reidratação em curto período de tempo.

A redução assimilatória do nitrato, estimada através da atividade da redutase de nitrato - aRN ("in vivo"), em folhas e nódulos e pelas variações nas concentrações de nitrato em raízes, caules e folhas, mostrou respostas bastante diferentes em relação à seca/reidratação. Nas folhas, aRN foi extremamente sensível ao déficit de água, caindo para valores de 20% do controle após 24 horas de estresse, sendo, em seguida, praticamente reduzida a zero. Entretanto, a atividade da enzima mostrou uma excelente recuperação à reidratação, alcançando 75% da atividade do controle, após 24 horas de reidratação (Figura 15 A). Esses resultados foram semelhante a outros relatados na literatura para várias espécies vegetais, mostrando que aRN é extremamente sensível à desidratação (SINHA & NICHOLAS, 1981; SALISBURY & ROSSI, 1992; RABE, 1993; FERRARIO *et al.*, 1998; FOYER *et al.*, 1998).

Durante o período de déficit hídrico as concentrações de proteínas solúveis nas folhas não foram reduzidas (Figura 20 A), assim como as concentrações de aminoácidos totais (Figura 12 A- Cap. 1) e intensidade das bandas da eletroforese das proteínas totais (Figura 13 - Cap. 1). Assim, é provável que o intenso decréscimo na aRN das folhas provocados pelo déficit de água tenha sido induzido, principalmente, pelas reduções no fluxo de NO_3^- a partir das raízes, em função da diminuição nas taxas de transpiração (SHANER & BOYER, 1976a; SHANER & BOYER,

1976 b; SILVEIRA *et al.*, 1998 a; SILVEIRA *et al.*, 1999 b). É possível que aumentos na atividade de proteases de RN aumentem o "turnover" da enzima (FERRARIO *et al.*, 1998) ou o aumento na concentração de proteínas inibidoras de RN também possam ter contribuído para o decréscimo da aRN (SINHA & NICHOLAS, 1981; ABROL, 1990; FOYER *et al.*, 1998). Outra possibilidade seria redução na síntese da proteína RN e de seu RNA_m provocadas pelo decréscimo no fluxo de nitrato (FERRARIO *et al.*, 1998).

A questão da regulação da aRN sob condições de déficit de água é muito ampla e complexa. Além da disponibilidade de NADH e NO₃⁻ (WALLACE, 1987), diversos outros fatores como concentração de hexoses-fosfato e glutamina (LEA, 1997), taxas de fixação fotossintética de CO₂ (FOYER *et al.*, 1998) e intensidade de radiação (ABROL, 1990) podem afetar à síntese, concentração, estado de ativação ou degradação da enzima (LEA, 1997), alterando, por conseguinte, sua atividade. Evidências experimentais têm mostrado que aRN é coordenada com o metabolismo do carbono, através da atividade de sacarose fosfo-sintetase, durante o déficit de água (FOYER *et al.*, 1998). Entretanto, nessas condições de estresse, o decréscimo abrupto no fluxo de NO₃⁻ e a intensa atividade de proteases sobre RN, devem ter atuado como os fatores mais importantes na diminuição da aRN das folhas (FERRARIO *et al.*, 1998)

Neste trabalho, a intensa redução na aRN nas folhas (Figura 15 A) foi acompanhada de intensa acumulação de NO₃⁻ nas raízes (Figura 16 B) e de pequenas variações nas concentrações em folhas (Figura 16 A) e nos caules (Figura 17 A), corroborando a hipótese de que as reduções no fluxo transpiratório do nitrato são as principais causas para os decréscimos iniciais na aRN induzida pelo déficit de água (VIÉGAS *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 1999 b). É interessante observar que a partir das 24 horas iniciais do déficit de água as concentrações de NO₃⁻ nas raízes permaneceram praticamente constantes (Figura 16 B), enquanto que nas folhas (Figura 16 A) e nos caules (Figura 17 A) as concentrações aumentaram progressivamente. Esses resultados sugerem que durante os 4 dias de estresse

houve transporte de nitrato das raízes para a parte aérea, sem, contudo, induzir variações na aRN das folhas (Figura 15 A). É provável que esse fluxo de NO_3^- tenha ocorrido nas horas de baixa insolação. Neste caso, RN não seria induzida, possivelmente, por limitação de outros fatores tais como luz, disponibilidade de fotoassimilados ou inativação da enzima.

A RN apresentou rápida e intensa recuperação de sua atividade após a reidratação (Figura 15 A). Entretanto, entre 24 e 48 horas após a reirrigação, não foram observadas diferenças na aRN, cuja atividade se estabeleceu em torno de 75% do controle. Paralelamente, ocorreu intensa redução nas concentrações de nitrato em folhas (Figura 16 A) e nos caules (Figura 17 A) nas primeiras 24 horas. Esses dados evidenciam que o feijão-de-corda apresentou excelente capacidade de remobilização do nitrato armazenado nos vacúolos. Por outro lado, a aparente estabilização da aRN em 75% sugere uma possível limitação no sistema de assimilação de nitrato em paralelo com as taxas de assimilação de CO_2 (FOYER *et al.*, 1998). Esses resultados estão de acordo com a ausência de variações nas concentrações de aminoácidos totais nas folhas (Figura 12 A - Cap. 1), evidenciando que o feijão-de-corda apresenta um equilíbrio entre as taxas de assimilação de N e as taxas de fotossíntese (SILVEIRA *et al.*, 1989).

A atividade de RN nos nódulos foi ligeiramente estimulada pelo déficit de água, sendo também levemente reduzida após a reidratação (Figura 15 B). Dessa maneira, a manutenção de RN ativa nos nódulos durante o período de seca pode ter sido importante no suprimento de N reduzido para o crescimento das raízes, as quais mostraram incremento de massa seca (Figura 3 A - Cap. 1). Comparando a aRN dos nódulos com as de folhas, foi visto que os valores para folhas foram cerca de 2 vezes maiores, além da massa dos nódulos representar apenas 10% em relação à massa total das folhas (Figuras 2 A e 3 B Cap. 1). Portanto, na base de massa, a aRN dos nódulos representou somente cerca de 5% da aRN máxima das folhas. É possível que a RN presentes nos nódulos de feijão-de-corda seja do tipo constitutiva (não induzível por NO_3^-), conforme já observado para outras leguminosas (SILVEIRA *et al.*, 1998 a). Dessa maneira, a aRN seria menos afetada pelo déficit de água do que

a de folhas, que possui RN predominantemente do tipo induzível pelo substrato (SILVEIRA *et al.*, 1998 a).

A assimilação de amônia nas folhas, estimada através da atividade de glutamina sintetase (aGS), mostrou resultados diferentes daqueles da aRN. Após 24 horas de estresse, foram observados aumentos na aGS e ligeiras reduções após a reidratação (Figura 18 A). Por outro lado, as concentrações de proteínas solúveis nas folhas decresceram somente após 72 horas de estresse, não havendo recuperação após a reidratação (Figura 20 A). Esses resultados evidenciam que aGS deve ter exercido um papel importante na reassimilação de amônia proveniente do aumento no "turnover" de proteínas e catabolismo de aminoácidos (LEA, 1993; LEA, 1997) induzidos pelo estresse hídrico nas folhas. É interessante observar que, após 24 horas de reidratação, as concentrações de proteínas solúveis das folhas decresceram abruptamente (Figura 20 A) sendo o mesmo observado no perfil da eletroforese das proteínas totais (Figura 13 - Cap.1). Isso corrobora com a idéia anterior de ter ocorrido um intenso "turnover" das proteínas durante o déficit de água e logo após a reidratação.

É possível que nas condições de déficit de água e de temperaturas elevadas a fotorrespiração possa ter sido estimulada, em relação à fotossíntese, devido reduções na atividade carboxilase de RUBISCO, induzindo aumentos nas concentrações de amônia proveniente da oxidação de glicina. Dessa maneira, os aumentos na aGS poderiam estar relacionados com os prováveis incrementos nas concentrações de glutamato e amônia da fração "solúvel". Como consequência do estímulo da via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase), poderia ocorrer aumentos na biossíntese de prolina, a partir de glutamato (LEA, 1993; LEA 1997). Trabalhos recentes com plantas jovens de cajueiro submetidas à salinidade com NaCl têm mostrado resultados semelhantes (VIÉGAS & SILVEIRA, 1999), os quais reforçam a hipótese de que a fotorrespiração pode contribuir com precursores para a biossíntese de prolina em condições de déficit de água.

A assimilação do N proveniente da fixação simbiótica de N_2 foi estimado a partir das variações nas concentrações de ureídeos do xilema das raízes. Esse parâmetro tem apresentado ótimas correlações com as taxas de fixação de N_2 em diversas leguminosas (PEOPLES *et al.*, 1989; DAKORA, 1995). Nas leguminosas tropicais, como soja e feijão-de-corda, a concentração de ureídeos tem apresentado também ótimas correlações com a fixação de N_2 (NEVES & HUNGRIA, 1987; HUNGRIA *et al.*, 1994). Outros parâmetros relacionados com as taxas de fixação simbiótica também foram avaliados, como atividade de glutamina sintetase nos nódulos (SILVEIRA *et al.*, 1998 *b*; SILVEIRA *et al.*, 1999 *a*) e concentração de leghemoglobina (HUNGRIA *et al.*, 1994; DAKORA, 1995; RODRIGUES *et al.*, 1998). Na realidade, existe muito poucos relatos na literatura sobre a variação desses parâmetros em relação à fixação de N_2 sob condições de estresses ambientais (SPRENT, 1981; PEOPLES *et al.*, 1989).

O estresse hídrico provocou intensas reduções nas concentrações de ureídeos na seiva do xilema e de leghemoglobina nos nódulos (Figuras 21 A e 22 A). As concentrações de ureídeos, contudo, foram mais afetadas pelo déficit de água. Após 24 horas, essa concentração foi reduzida 2,4 vezes. No 4º dia de estresse, a concentração de ureídeos representava somente 20% do controle, enquanto que a de leghemoglobina representava 51% do controle. É interessante observar que após 24 horas de reidratação, as concentrações de ureídeos e leghemoglobina representavam 33% e 76%, do controle, respectivamente. Portanto, a concentração de leghemoglobina mostrou maior recuperação diante da reidratação, principalmente quando expressa em relação a proteínas solúveis (Figura 22 B), em relação à concentração de ureídeos (Figura 21 B).

Por outro lado, a massa seca dos nódulos mostrou apenas uma discreta recuperação após a reidratação (Figura 3B - Cap. 1). Desse modo, é provável que as concentrações de ureídeos nas plantas estressadas reflitam mais fielmente as variações nas taxas de fixação de N_2 do que as de leghemoglobina. Neste caso, os processos de fixação simbiótica de N_2 , assimilação da amônia e conversão até ureídeos foram, aparentemente, afetados mais lentamente pelo estresse hídrico

progressivo, quando comparado com a assimilação do NO_3^- nas folhas (Figura 15 A). Entretanto, é possível que a recuperação no sistema de fixação de N_2 e exportação de ureídeos em nódulos de feijão-de-corda tenha sido mais lenta que a correspondente recuperação na atividade de redutase de nitrato e mobilização de nitrato a partir da absorção pelas raízes e remobilização daquele armazenado nos vacúolos das partes vegetativas.

A hipótese levantada anteriormente é reforçada pelos resultados de proteínas totais em folhas e nódulos apresentados no Capítulo 1. As proteínas dos nódulos foram mais intensamente degradadas durante o déficit de água (Figuras 12 B e 14 – Cap. 1). As concentrações de proteínas solúveis, inclusive a atividade de GS dos nódulos, caem bruscamente a partir de 48 horas de estresse hídrico sem mostrar nenhuma tendência de recuperação após a rehidratação (Figuras 20 B e 19 A e B). Esse quadro sugere que o balanço de proteínas dos nódulos é mais intensamente alterado do que o de folhas. Dessa maneira, poderia ser explicado, de um lado, a maior sensibilidade de RN às pequenas variações no estado hídrico da planta, de outro lado, a menor recuperação na fixação de N_2 após a reidratação. Na realidade, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho comparando esses dois processos diante do déficit de água e reidratação.

Trabalhos utilizando plantas de soja noduladas e submetidas ao déficit de água têm mostrado que as taxas de fotossíntese foram muito menos sensíveis à desidratação do que a atividade de nitrogenase (redução de acetileno) (DURAND *et al.*, 1987). Por outro lado, a diminuição na atividade dos nódulos não foi relacionada com a disponibilidade de fotoassimilados provenientes da fotossíntese (FINN & BRUN, 1980; FELLOWS, *et al.*, 1987). Esses resultados sugerem que o déficit de água deve alterar outros processos diretamente relacionados com a fixação de N_2 . Em *Vicia faba* submetida à déficit de água progressivo ocorreu diminuição proporcional nas concentrações de proteínas solúveis e leghemoglobina nos nódulos, acompanhando as variações na atividade de nitrogenase (GUERIN *et al.*, 1990). Os autores sugerem que o suprimento de O_2 para a respiração dos bacteróides pode ter

sido limitado pelo aumento na resistência à difusão de O₂ nas células do córtex e diminuição na concentração de leghemoglobina.

Apesar da concentração de leghemoglobina ter diminuído progressivamente em função do agravamento do déficit de água (Figura 22 A e 22 B), houve uma intensa recuperação dos níveis após a reidratação. Após 24 horas da reirrigação, as concentrações de leghemoglobina nas plantas estressadas representavam 76 % e 124%, em relação ao controle, quando expressas em relação à massa seca e proteínas solúveis totais, respectivamente. Esses resultados evidenciam que a síntese "de novo" de leghemoglobina recebeu uma certa preferência na hierarquia de recuperação na recomposição das proteínas dos nódulos. Infelizmente, essas observações não foram ratificadas pelo perfil da eletroforese, obtido devido à baixa resolução das bandas correspondentes à leghemoglobina - massa molecular aparente próximo de 16 kDa (Figura 14 – Cap. 1).

Leghemoglobina de nódulos de mucuna preta (*Stylobium aterrimum*), separada por DEAE-celulose e visualizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, apresentou 5 isoformas de mesma massa molecular, aproximadamente 16 kDa, sendo que a banda correspondente à leghemoglobina total exibiu a mesma massa molecular (BARBOSA & MEIRELLES, 1994). Essas isoformas expressam-se na maioria das leguminosas, sendo a concentração de cada uma delas dependente do estágio de desenvolvimento da planta nodulada (APPLEBY, 1984). Alguns trabalhos têm demonstrado que as isoformas apresentam afinidades diferentes pelo O₂ (APPLEBY, 1984; MARTIN et al., 1990). Por outro lado, na literatura consultada não foi encontrado nenhum trabalho relacionado a dinâmica da síntese/degradação de leghemoglobina diante do estresse hídrico. Entretanto, trabalhos futuros sobre esses aspectos e outros relacionados com o estresse salino estão sendo desenvolvidos no Laboratório de Fixação e Metabolismo do N (LABFIX) da UFC.

A aGS nos nódulos decresceu progressivamente, em função dos dias de estresse, principalmente quando expressa em relação à massa seca (Figuras 19 A e

19 B). No 4º dia de estresse hídrico, aGS representava 75% daquela do controle. É interessante observar que aGS continuou a cair após a reidratação. Após 48 de reidratação, aGS representou apenas 56% do controle. Quando a aGS foi expressa em relação a proteínas solúveis, os decréscimos foram menos acentuados, evidenciando que a diminuição em sua atividade pode ter sido relacionado com a degradação da proteína GS e outras proteínas solúveis, provavelmente pelo aumento na atividade de proteases. Nódulos que apresentam aumentos na atividade de proteases ácidas induzidos por senescência precoce mostraram decréscimos nas concentrações de leghemoglobina e glutamina sintetase (PLADYS & VANCE, 1993).

A variação na aGS nos nódulos foi diferente daquela apresentada pela concentração de ureídeos na seiva do xilema (Figuras 19 A e 21 A). Enquanto a primeira mostrou uma tendência de diminuição lenta e progressiva, inclusive após a reidratação, os ureídeos mostraram um decréscimo mais rápido e mais acentuado, com uma ligeira tendência de recuperação após a reidratação. Apesar da aGS nos nódulos estar positivamente relacionada com as taxas de fixação de N_2 em caupi, soja e feijão (SILVEIRA *et al.*, 1998 *b*; RODRIGUES *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 1999 *a*) e em outras leguminosas (HUNGRIA *et al.*, 1994) sob condições normais. Nas condições de estresse hídrico, entretanto, essa relação pode não ter ocorrido, tendo em vista que a desidratação pode ter afetado diferentemente a atividade de nitrogenase e da aGS.

Apesar dos ureídeos da seiva do xilema serem originados da glutamina oriunda da aGS nos nódulos, a partir de algumas reações parciais (SCHUBERT, 1986), é provável, nesse trabalho, que sua concentração esteve mais diretamente relacionada com a atividade de nitrogenase e as taxas de fixação de N_2 do que a aGS, conforme foi observado em leguminosas tropicais, inclusive *Vigna unguiculata*, cultivadas em condições normais (NEVES & HUNGRIA, 1987; HUNGRIA *et al.*, 1994; DAKORA, 1995). As concentrações ou os fluxos de ureídeos mensurados na seiva do xilema (mmol de ureídeos/mL de seiva/hora) incorporam as quantidades de ureídeos armazenados no xilema das raízes, oriundos da fixação de N_2 . Esse parâmetro tem

apresentado ótimas correlações com a fixação de N_2 , utilizando-se o $^{15}N_2$ como marcador (PEOPLES *et al.*, 1989).

As concentrações de proteínas solúveis nos nódulos apresentaram grandes decréscimos após 72 horas de seca (Figura 20 B), semelhante ao observado para as concentrações de aminoácidos totais (Figura 12 B - Cap 1) e perfil da eletroforese das proteínas totais (Figura 14 - Cap. 1) durante o período de desidratação. Após a reidratação, ocorreu uma ligeira recuperação nas concentrações de aminoácidos totais e na intensidade das bandas protéicas da eletroforese. Esses resultados evidenciam que durante o estresse hídrico ocorreu um intenso processo de degradação de proteínas e, possivelmente mobilização de aminoácidos dos nódulos para o crescimento das raízes (Figura 3 A - Cap. 1). Dessa maneira, é provável que as concentrações de ureídeos na seiva das plantas estressadas podem ter refletido, pelo menos em parte, as taxas de fixação de N_2 .

A despeito de não ter sido possível mensurar diretamente ("in situ") as taxas de redução e assimilação de NO_3^- e de N_2 , as variações nos parâmetros analisados sugerem que as duas fontes e vias de utilização de N inorgânico foram bastantes sensíveis ao déficit de água em feijão-de-corda. Aparentemente, a redução e assimilação do nitrato nas folhas foi mais sensível, porém, mostrou uma recuperação mais rápida após a reidratação. A redução e assimilação do N_2 nos nódulos pareceu decrescer mais lentamente, mas sua recuperação, por sua vez, aparentemente foi mais lenta. A redução do nitrato nos nódulos, possivelmente por RN do tipo constitutiva, pode ter sido uma fonte alternativa de N reduzido para o crescimento das raízes sob condições de estresse hídrico.

A maior sensibilidade da assimilação do nitrato nas folhas deve ter sido relacionado com a intensa dependência da aRN quanto ao fluxo de NO_3^- das raízes para as folhas, e em menor extensão, pela provável degradação da enzima pela ação de proteases. Por outro lado, a intensa recuperação na aRN deve ter sido devido ao rápido restabelecimento do fluxo de NO_3^- , associado com a recuperação da turgescência, transpiração e fotossíntese, e rápida recuperação na síntese da

proteína RN. Por sua vez, o provável aumento da atividade de proteases nos nódulos, induzido pelo estresse hídrico, deve ter sido relativamente mais lento, porém provocando reduções gradativas nas concentrações de importantes nodulinas, tais como leghemoglobina e glutamina sintetase. Assim, a recuperação da atividade do nódulo foi mais lenta, possivelmente, por envolver a síntese "de novo" de diversas proteínas.

Figura 1. Atividade da enzima RNase em nódulos de feijão (cv. Brasília) submetidos a estresse hídrico por 10 dias. Os nódulos foram coletados e a atividade da enzima medida em unidades de atividade por grama de nódulo por hora. Os dados são a média de três repetições com erro padrão da amostragem.

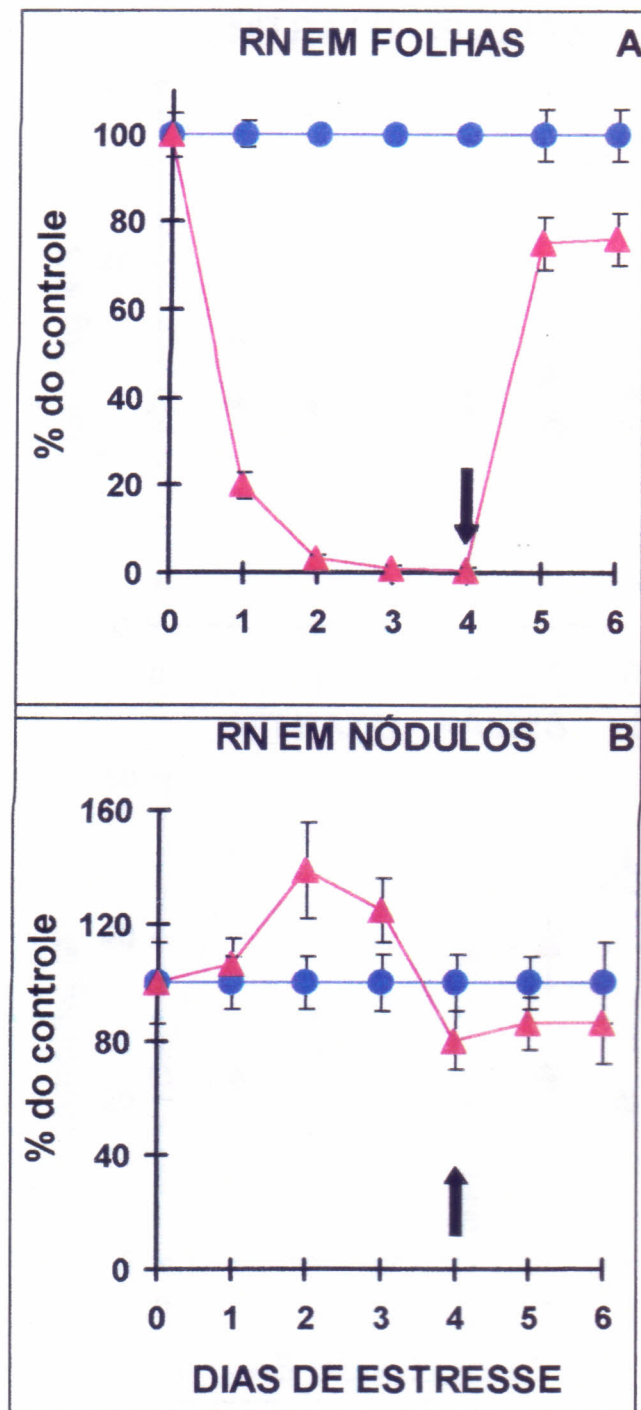


Figura 15. Atividade *in vivo* de redutase de nitrato em discos de folhas (A) e em fatias de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle. Os valores correspondentes a 100% de atividade do controle foram de 1,80 e 0,98 mmoles de NO_2^- / kg MF / hora, para folhas e nódulos, respectivamente.

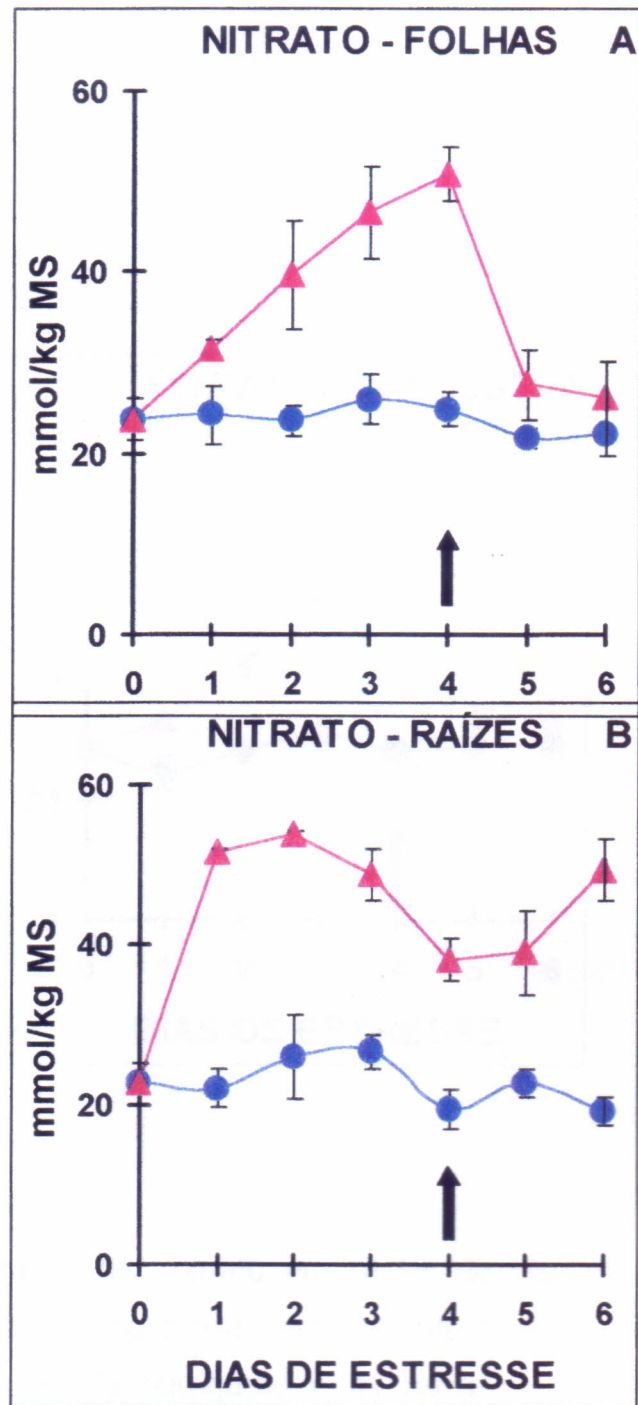


Figura 16. Concentração de nitrato em folhas (A) e raízes (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

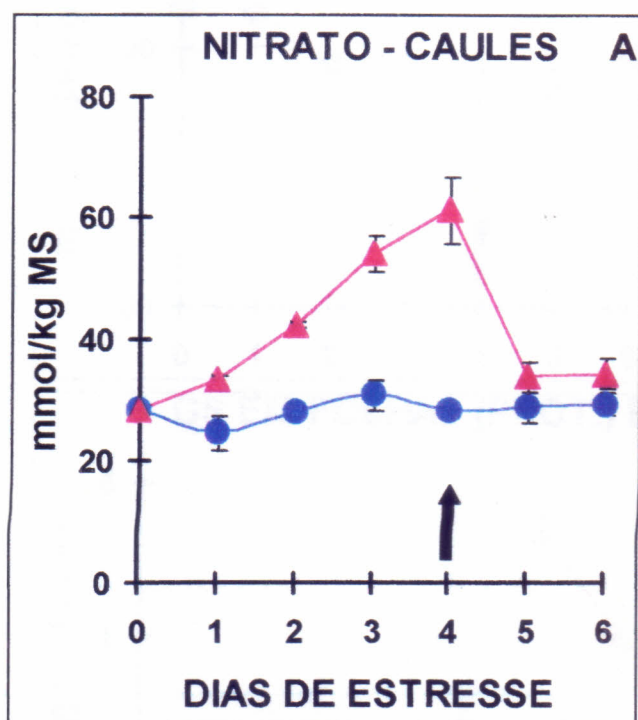


Figura 17. Concentração de nitrato em caules de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

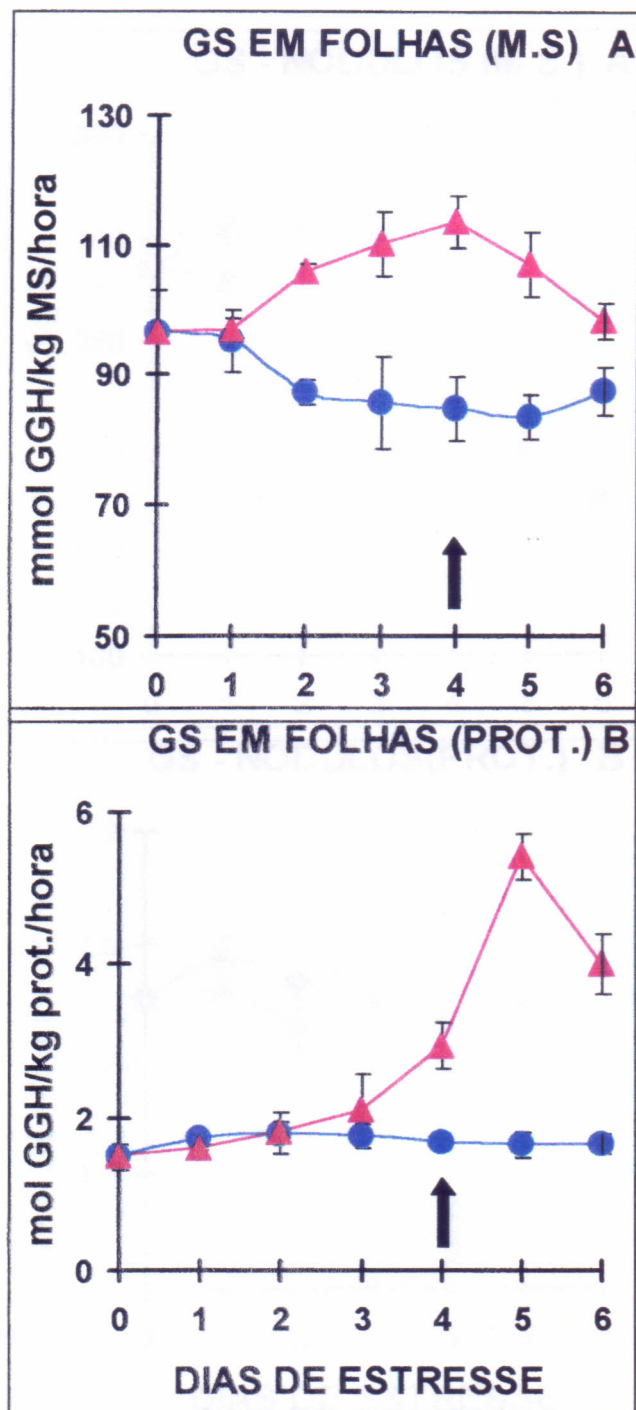


Figura 18. Atividade de glutamina sintetase em folhas, em relação à massa seca (A) e em relação à proteínas solúveis totais (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

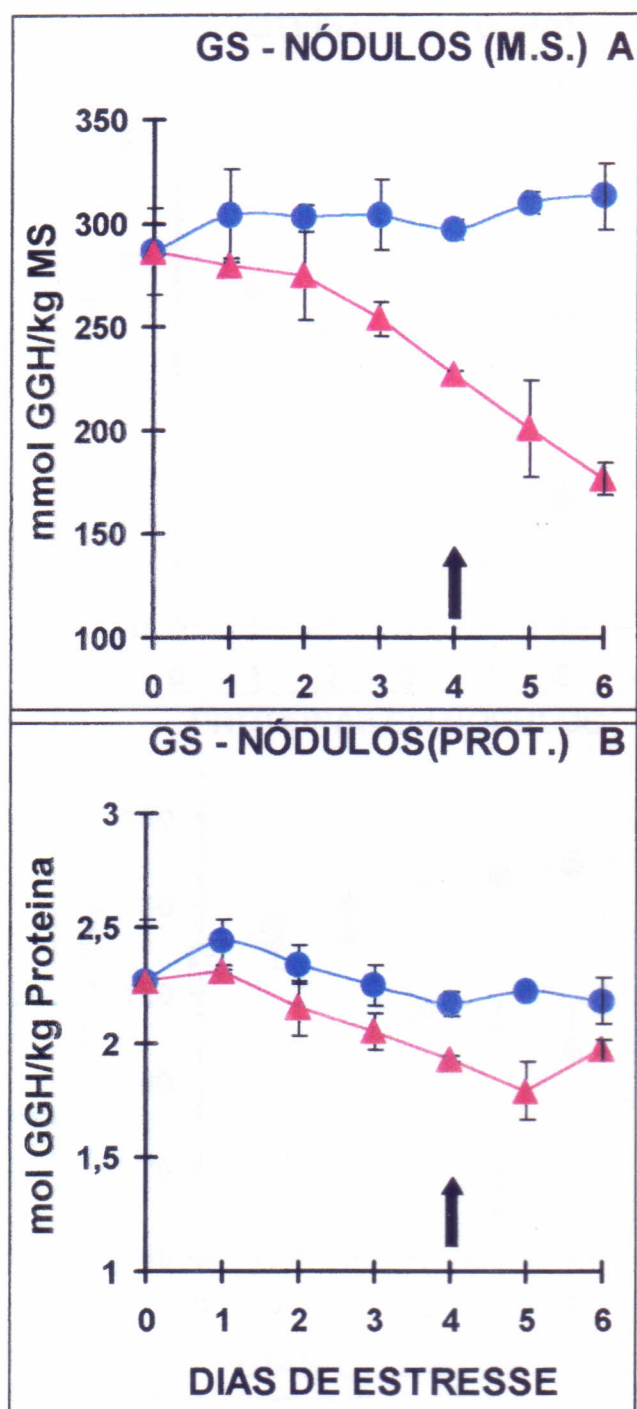


Figura 19. Atividade de glutamina sintetase em nódulos, em relação à massa seca (A) e em relação à proteínas solúveis totais (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

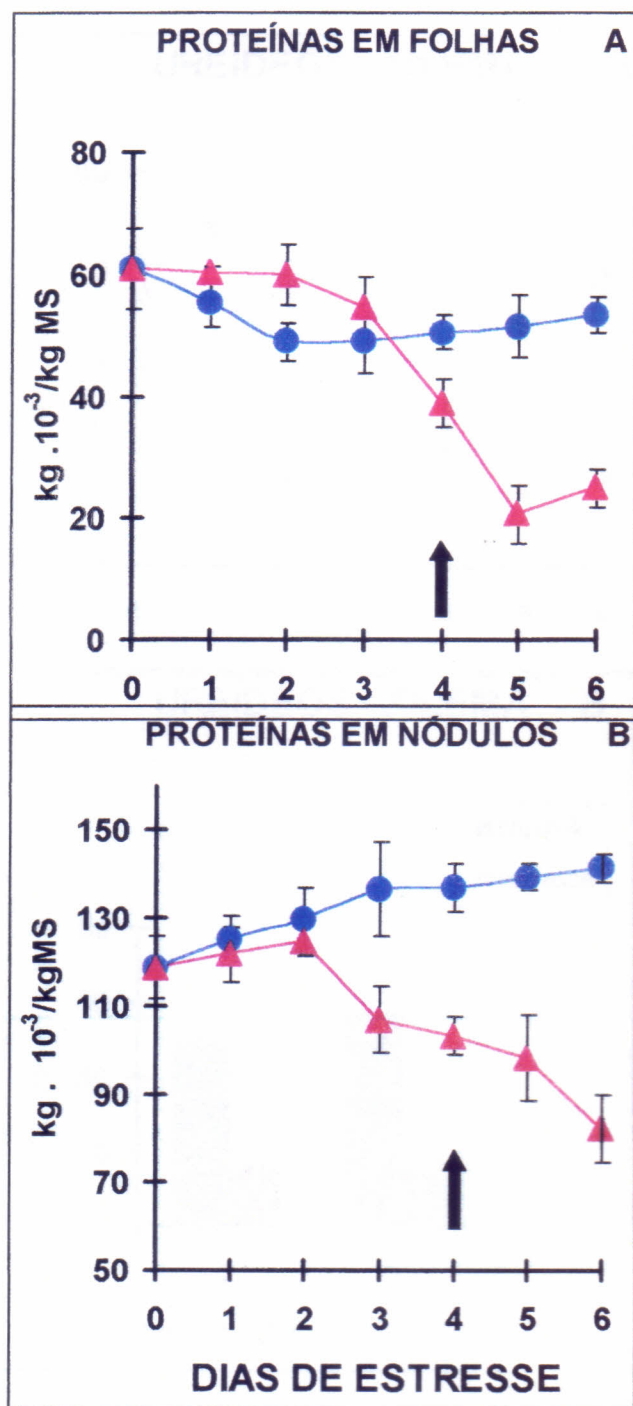


Figura 20. Concentração de proteínas solúveis totais em folhas (A) e nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

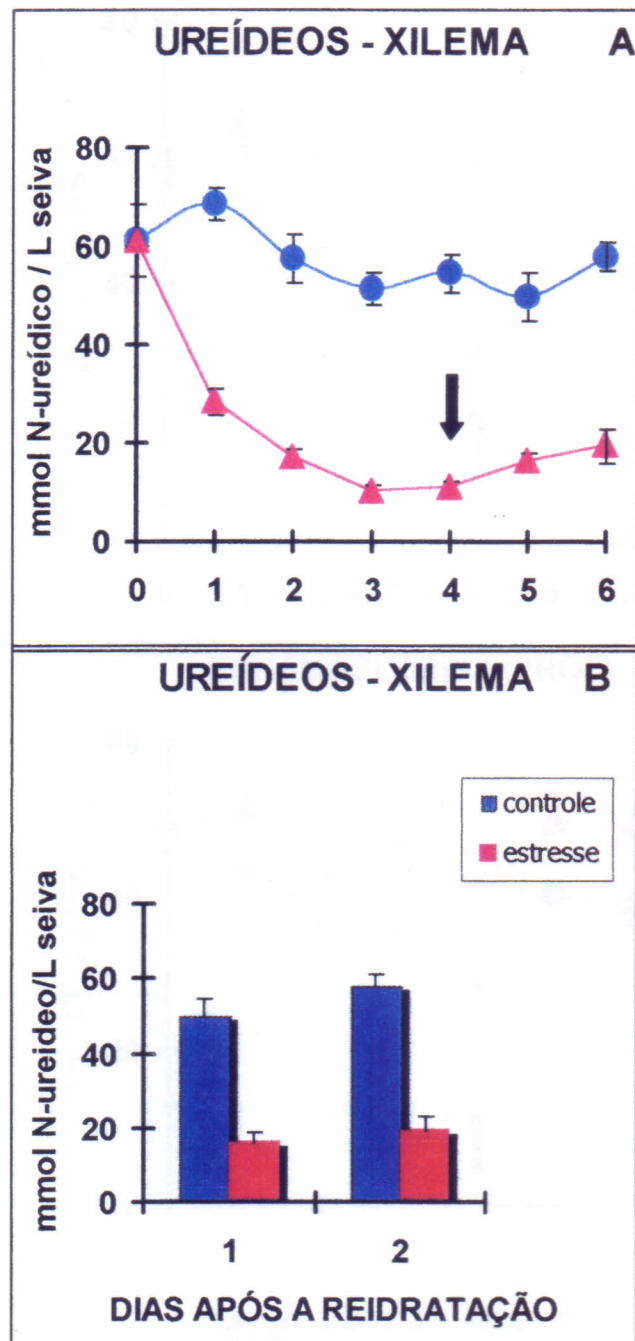


Figura 21. Concentração de ureídeos da seiva do xilema (A) e de ureídeos da seiva do xilema após a reidratação (B) de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4º dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

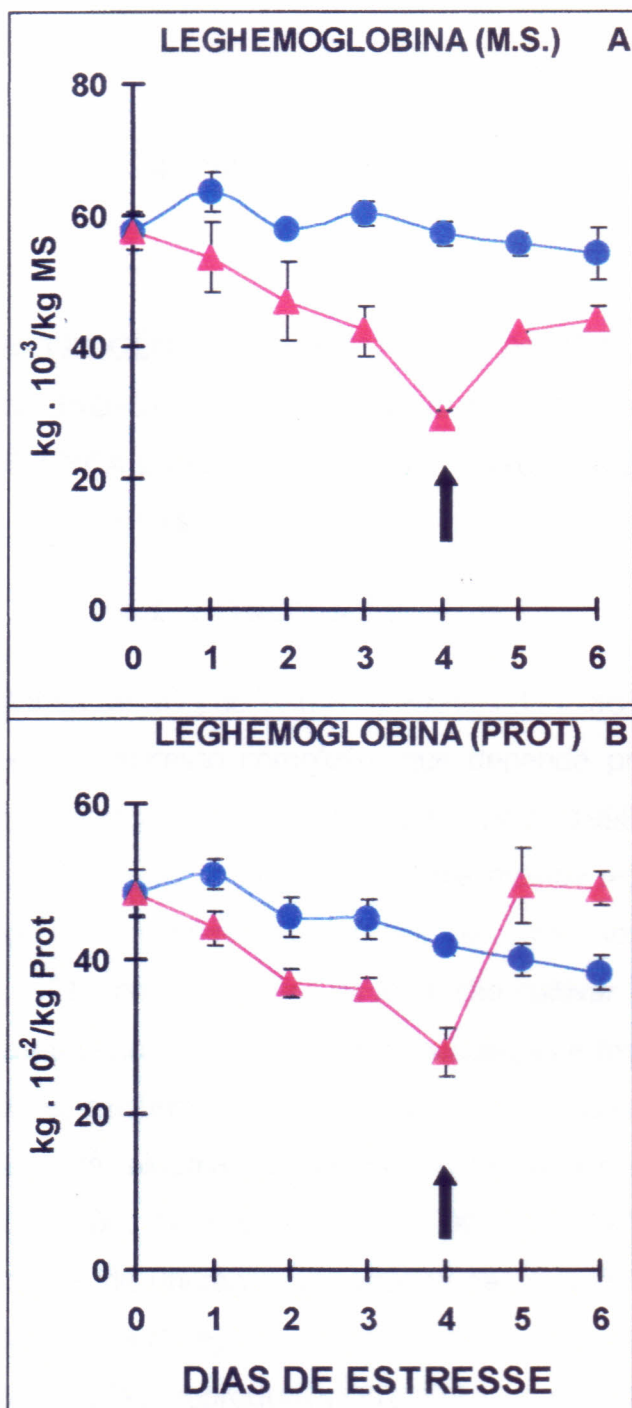


Figura 22. Concentração de leghemoglobina dos nódulos, em relação à massa seca (A) e em relação a proteínas solúveis totais (B), de plantas de feijão-de-corda submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 4 dias e reidratação após o 4^o dia. A seta indica o dia da reirrigação e as barras o desvio padrão. (▲—▲) representa o tratamento sob estresse hídrico e (●—●) corresponde ao controle.

4. CAPÍTULO 3

"ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E AJUSTAMENTO OSMÓTICO EM DUAS CULTIVARES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp)] NODULADAS, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITRATO E SUBMETIDAS AO DÉFICIT DE ÁGUA"

4.1. INTRODUÇÃO

A utilização simultânea de NO_3^- do solo e N_2 através da fixação simbiótica por leguminosas noduladas é um processo complexo, que depende principalmente da interação genética entre os pares simbiontes (SILVEIRA *et al.*, 1998 b). Existe uma grande variabilidade entre genótipos (cultivares) de uma mesma leguminosa (CABA *et al.*, 1994), assim como entre diferentes estirpes de uma mesma espécie de rhizóbio (HERVAS *et al.*, 1991), como também da interação cultivar X estirpe (WU & HARPER, 1990). O grau de tolerância ao nitrato para nodulação e fixação de N_2 varia amplamente entre genótipos, existindo desde daqueles pares sensíveis a baixíssimas concentrações de nitrato até algumas espécies de leguminosas ou mutantes resistentes a altas concentrações (WU & HARPER, 1990; SILVEIRA *et al.*, 1998 b; DAKORA, 1998). A capacidade de utilização simultânea das duas fontes de N ($\text{NO}_3^- + \text{N}_2$) pode ser uma característica desejável, particularmente nos estádios iniciais do estabelecimento da planta e na fase reprodutiva (SILVEIRA *et al.*, 1998 b).

Os principais produtos da assimilação do nitrogênio, quando a fonte é o nitrato, são o glutamato e glutamina. Entretanto, em leguminosas tropicais, quando a fonte principal é N_2 , a glutamina formada nos nódulos, através da atividade da glutamina sintetase, é convertida nos ureídeos ácido alantóico e alantoína através de uma sequência de reações nos nódulos (SCHUBERT, 1986). Desse modo, os ureídeos representam as principais formas de N que são transportados na seiva do xilema das raízes para a parte aérea quando a redução N_2 e a assimilação da NH_3 representam a principal via para a assimilação de N inorgânico (ROBERTSON & FARNDEN, 1980).

Devido a isso, as concentrações de ureídeos na seiva do xilema têm apresentado excelente correlação com as taxas de fixação simbiótica de N_2 (NEVES & HUNGRIA, 1987; PEOPLES *et al.*, 1989; HUNGRIA *et al.*, 1994; DAKORA, 1995).

As proporções entre as concentrações de nitrato e de ureídeos na seiva do xilema de leguminosas tropicais oferece uma boa estimativa da eficiência de fixação de N_2 na presença de absorção de NO_3^- (PEOPLES *et al.*, 1989). Em *Vigna unguiculata*, o nitrato é reduzido e assimilado preferencialmente nas folhas (NEVES, 1989). Quando essas plantas são noduladas na ausência de NO_3^- mais de 90% do N-total da seiva do xilema é representado pelo N-ureídico. Essa proporção diminui à medida que aumenta a concentração de nitrato no substrato nutritivo (PEOPLES *et al.*, 1989). Os ureídeos sintetizados nos nódulos são translocados para caules e folhas, sendo degradados até glioxalato e uréia por ação de alantoinases. A uréia é hidrolisada até amônia e CO_2 por ureases. A NH_3 é assimilada até glutamina, asparagina e outros aminoácidos, principalmente através de GS, GOGAT e AS (SCHUBERT, 1986).

Na fase reprodutiva, glutamina e asparagina representam as principais formas de N translocadas das partes vegetativas para as vagens (NEVES, 1989). O transporte preferencial de N na forma de ureídeos nas leguminosas tropicais é atribuído à baixa relação C:N e solubilidade desses solutos nessas plantas (PEOPLES *et al.*, 1989). De qualquer maneira, a composição de solutos nitrogenados livres nas folhas é influenciada de maneira marcante pela fonte de N (NO_3^- ou N_2) mais intensamente utilizada pela leguminosa nodulada (SCHUBERT & BOLAND, 1990). Portanto, é possível que a capacidade de ajustamento osmótico, a partir de solutos nitrogenados, por leguminosas tropicais, seja diferente em função da via preferencial de uso de NO_3^- ou N_2 . A literatura consultada não registra nenhum trabalho relacionado com a maior ou menor tolerância ao déficit hídrico mostrado por leguminosas noduladas na presença ou ausência de nitrato

A leghemoglobina é a mais abundante proteína encontrada nos nódulos das leguminosas (~ 20 % das proteínas totais), apresenta massa molecular de

aproximadamente 16 KDa (BECANA & KLUCAS 1992; BARBOSA & MEIRELLES, 1994), está localizada no citoplasma da célula da planta infectada e controla o fluxo de oxigênio no citoplasma da planta para dentro do bacterióide (SANGWAN & O'BRIAN, 1991). A síntese da leghemoglobina nos nódulos é condição necessária para que se estabeleça a fixação do N_2 pelo bacterióide. Sua síntese é desencadeada quando grupos hemes sintetizados pelo bacterióide são transportados para o citoplasma da célula do hospedeiro (KEITHLEY & NADLER, 1983; SANGWAN & O'BRIAN, 1991), onde se unem à globina que é codificada pelo genoma do hospedeiro (APPLEBY, 1984; SANGWAN & O'BRIAN, 1991).

A função fisiológica dos diferentes tipos de leghemoglobina tem sido estudada pela determinação da afinidade dos seus componentes por diferentes ligantes, principalmente o O_2 (MARTIN *et al.*, 1990). Dessa maneira, a concentração de leghemoglobina frequentemente é associada com a eficiência de fixação de N_2 dos nódulos (HUNGRIA *et al.*, 1994). Apesar de diversos trabalhos mostrarem relações positivas entre as concentrações de leghemoglobina e a atividade de nitrogenase (HUNGRIA *et al.*, 1994; DAKORA, 1995), outros relatos tem mostrado resultados contraditórios (RODRIGUES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 1999). Por outro lado, quando plantas noduladas de *Vicia faba* foram submetidas ao déficit de água progressivo, observou-se decréscimos proporcionais nas concentrações de leghemoglobina e de proteínas solúveis nos nódulos (GUERIN *et al.*, 1990).

Infelizmente, no caso de *Vigna unguiculata* e de outras leguminosas comerciais, praticamente não existem estudos sobre a utilização simultânea de N_2 e NO_3^- sob condições de déficit de água. A despeito da excelente capacidade de nodulação e fixação de N_2 dessa leguminosa, com um largo espectro de estirpes nativas do solo, inclusive sob condições de baixa disponibilidade hídrica (STAMFORD *et al.*, 1988), pouco se sabe sobre a tolerância de cultivares de feijão-de-corda ao nitrato do solo, para a nodulação, assim como respostas em termos de crescimento, assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico. Neste trabalho, foram utilizadas duas cultivares, Vita 3 e Vita 7, noduladas em presença e ausência de nitrato e

submetidas a um déficit de água moderado, na fase de crescimento vegetativo, visando-se comparar respostas diferenciais, ao nível metabólico, nos aspectos citados anteriormente.

4.2.1 Caracterização da matéria

Os materiais utilizados foram: matéria vegetal (matéria seca) proveniente de uma planta de milho (variedade 1000) e matéria animal (matéria seca) proveniente de um tipo de carne (carne de vaca). A matéria vegetal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%), sendo que a matéria animal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%). A matéria vegetal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%), sendo que a matéria animal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%).

A matéria vegetal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%), sendo que a matéria animal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%). A matéria vegetal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%), sendo que a matéria animal foi submetida a um período de crescimento de 120 dias, sob condições de crescimento de 1:2 (100%).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Condições do Experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-Ce, no período de setembro a outubro de 1997. As temperaturas e umidades médias mínimas (noite) e máximas (dia), na casa de vegetação, variaram de 25 °C a 36 °C e 39% a 85%, respectivamente, durante o período experimental. O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de sílica : vermiculita na proporção de 1:2 (v:v), sendo a mesma lavada com água destilada por 5 vezes e posteriormente autoclavada por 20 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Foram utilizados vasos de Leonard modificados produzidos a partir de frascos de vidro de reagentes de 1 L, cortados nas duas extremidades opostas (em cima e em baixo) e ajustados um sobre o outro em sentido contrário, sendo a parte externa pintada com tinta cor prata.

As partes dos vasos apresentaram 20 cm de altura e 9 cm de diâmetro, perfazendo um volume de aproximadamente 800 cm³ em cada parte. Os vasos foram lavados internamente com hipoclorito de sódio comercial 20% (v:v). Cada vaso foi irrigado com solução de CaSO₄ 0,1 mM, até a saturação do substrato sólido da parte superior, para favorecer as condições de pH e suprimento de Ca⁺² para germinação e nodulação. Foi fornecida solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada no Laboratório de Metabolismo e Fixação de Nitrogênio da UFC (LABFIX), conforme tabela 1 – Capítulo 1, com exceção do tratamento sem nitrato, onde excluiu-se o fornecimento de nitrato a 5 mM.

4.2.2 Material vegetal e estirpe utilizada

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cultivares vita 3 e vita 7, foram fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa do Meio Norte/EMBRAPA, Teresina, Piauí. Conforme descrito por FREIRE FILHO *et al.* (1983), essas cultivares de feijão-de-corda são recomendadas para cultivo tanto em condições de baixa disponibilidade hídrica (sequeiro), como em condições de irrigação. Alguns trabalhos tem sugerido que a cultivar vita 3 apresenta características de tolerância ao déficit hídrico em relação às cultivares vita 5 e vita 7 na fase de plântula (GOMES FILHO *et al.* 1996). A estirpe de *Rhizobium* spp. utilizada foi a Br 3256 fornecida pela Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia/EMBRAPA/Rio de Janeiro, cuja planta hospedeira é *Vigna unguiculata*, de origem africana (Zimbabwe) a qual apresenta também a designação de CB-756.

A estirpe foi crescida em meio YMB (DALTON, 1980) que foi utilizado como inoculante líquido, tendo sido feita contagem de células conforme SOMASEGARAN & HOBEN (1985) e padronização de 10^9 células/mL. Foram feitas 3 inoculações (1 mL/planta) :

1ª inoculação : 2 dias após o plantio

2ª inoculação : 3 dias após o plantio

3ª inoculação : 4 dias após o plantio

As principais características agrícolas das cultivares Vita 3 e Vita 7, são (FREIRE FILHO *et al.*, 1997):

Vita-7:

a) Porte : Tipo 2 - Moita

b) Ciclo de Vida : 60-70 dias

c) Hábito de crescimento : indeterminado

- d) Tipo de folha : lanceolada
- e) Cor da semente : bege ou esverdeada
- f) Floração inicial (dias) : 38 - 40
- g) Cor da flor : violeta
- h) Comprimento da vegem (cm) : 15 cm
- i) Número de grãos por vagem : 14
- j) Peso de 100 sementes(g) : 15 g
- k) Produtividade média (Kg/ha) :
 - e.1) Sequeiro : 843
 - e.2) Irrigado : 1214
- l) Espaçamento :
 - I.1 – Plantio Manual : 0,70 m x 0,40 m com duas plantas/cova
 - I.2 – Plantio Mecanizado : 0,70 m entre fileiras com cinco plantas/metro linear

Vita-3:

- a) Porte : Tipo 3 – Semi-enramador
- b) Ciclo de Vida : 78 - 80 dias
- c) Hábito de crescimento : indeterminado
- d) Tipo de folha : globosa
- e) Cor da semente : vermelha

- f) Floração inicial (dias) : 42 – 45 dias
- g) Cor da flor : violeta
- h) Comprimento da vagem (cm) : 20
- i) Número de grãos por vagem : 16
- j) Peso de 100 sementes(g) : 21 g
- k) Produtividade média (Kg/ha) :
 - e.1) Sequeiro : 593
 - e.2) Irrigado : 1470

l) Espaçamento :

l.1 – Plantio Manual : 0,80 m x 0,40 m com duas plantas/cova

l.2 – Plantio Mecanizado : 0,80 m entre fileiras com quatro plantas/metro linear

4.2.3 Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial tipo $2 \times 2 \times 1$ (duas condições hídricas x duas cultivares x uma época), com 4 repetições. A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média.

4.2.4 Condução das plantas

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO) 10 % (v/v), por 20 minutos sob aeração forçada, sendo imediatamente

lavadas em água destilada por 3 vezes para retirar o excesso do NaClO. Em seguida, as sementes foram mergulhadas em água destilada, com aeração forçada, por período de 20 minutos e lavadas por 5 vezes em água destilada para embebição. As sementes foram colocadas para germinar no próprio substrato, saturado no dia anterior com CaSO_4 0,1 mM, sendo plantadas 6 sementes / vaso. Após a emergência, foram mantidas e inoculadas 2 plantas/vaso conforme descrito no item 2.2.2-Cap.1.

As plantas receberam nutrientes minerais na forma de solução nutritiva (Tabela 1- Cap.1), através de sub-irrigação por capilaridade a partir da parte inferior dos vasos de Leonard, sendo que na 1ª semana a solução foi diluída 1/10, na 2ª semana a solução foi diluída 1/5 e nas semanas seguintes a solução foi empregada sem diluição e contendo 5 mM de NO_3^- . A solução nutritiva foi trocada a cada 2 dias, sendo que na 1ª semana foi fornecido apenas 1 mM de NO_3^- . Foi anotado diariamente o valor do pH da solução descartada.

Todos os dias foi feita adição de água destilada através da parte superior até completar o volume da solução contida na parte inferior. As temperaturas máximas e mínimas registradas no interior da casa de vegetação durante o período experimental são apresentadas no apêndice 2. Semanalmente, houve rodízio, ao acaso, dos vasos sobre as bancadas. Para tratamento fitossanitário, inseticida e fungicida foram utilizados quando necessário, conforme recomendação do setor de fitossanidade do Centro de Ciências Agrárias da UFC.

No vigésimo oitavo dia após a emergência das plantas (28º DAE) as plantas do tratamento "estresse hídrico" foram submetidas à retirada da água (solução) da parte inferior dos vasos, permanecendo apenas com a água retida na fase sólida da parte superior durante 3 dias consecutivos, enquanto que as plantas controle foram mantidas diariamente na presença de solução nutritiva.

4.2.5 Coleta das plantas e determinação da massa seca

Foi feita uma coleta destrutiva, sendo que as plantas foram coletadas às 9:00 horas e separadas em raiz, caule com pecíolos, folhas e nódulos. Em seguida, as partes foram pesadas separadamente para determinação da massa fresca. Amostras de cada parte da planta foram separadas para determinar a porcentagem de umidade através da determinação da massa seca em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C, com exceção dos nódulos, cuja massa seca foi determinada após liofilização. A altura das plantas foi determinada, com o auxílio de uma fita métrica e o número de folhas registrado. Imediatamente após a coleta, as partes foram congeladas com N₂ líquido e mantidas em freezer (-20 °C) até a liofilização para preparo da farinha das partes das plantas.

4.2.6 Determinação da umidade nos tecidos

A umidade nos tecidos de cada parte da planta foi determinada segundo SLAVIK (1974), utilizando-se a seguinte relação:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = \frac{\text{M F} - \text{M S}}{\text{M F}} \times 100 \text{ (kg H}_2\text{O/100kg de MF)}$$

onde : M F = massa fresca de cada uma das partes da planta

M S = massa seca de cada uma das partes da planta

4.2.7 Determinação do conteúdo relativo de água (C.R.A)

O conteúdo relativo de água (C.R.A), das duas variedades, foi determinado segundo SLAVIK (1974). Às 6:00 horas da manhã, foram retirados 10 discos foliares de 1 cm de diâmetro, de cada planta, ao acaso, e determinação imediata da massa

dos mesmo imediatamente (MF_1), em balança analítica. Os discos foram transferidos para uma placa de petri, contendo água destilada e colocados sobre a mesa do laboratório (25 °C), por um período de 7 horas e em constante iluminação (densidade de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de aproximadamente 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Após esse período, os discos foliares foram removidos da placa de petri, colocados entre folhas de papel de filtro e submetidos a uma prensagem (pressão) com o auxílio de dois livros, por 2 minutos, visando eliminar o excesso de água. Em seguida, os discos foram pesados em balança analítica e esta massa chamada massa de tecido túrgido ou massa de tecido saturado (MF_2). Em seguida, os discos foram colocados em uma placa de petri seca e levados a uma estufa de ventilação forçada de ar, a 75 °C, por um período de 48 horas, para se determinar a massa seca do tecido (MS). Os cálculos do CRA foram determinados usando-se a relação descrita por IRIGOYEN *et al*, 1992:

$$\text{CRA} = \frac{MF_1 - MS}{MF_2 - MS} \times 100 \%$$

onde: CRA = conteúdo relativo de água, em porcentagem

MF_1 = peso da massa fresca inicial

MF_2 = peso túrgido ou saturado

MS = peso da massa seca

4.2.8 Determinação de prolina livre em tecidos de folhas e raízes

O método utilizado foi o de BATES (1973). 20 mg de tecido vegetal liofilizado foram pesados e, em seguida, triturados em almofariz, por 2 minutos, em presença de 3 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v). O macerado foi transferido para tubos

"eppendorf" de 1,5 mL com o auxílio de uma seringa descartável de 3 mL e, posteriormente, centrifugado a 12.000 rpm em uma centrífuga "eppendorf" de mesa, refrigerada. O sobrenadante foi coletado em tubos de ensaio comum e o resíduo descartado. A reação foi preparada, em tubo de ensaio com rolha, com 1 mL do extrato + 1 mL de ninhidrina ácida (1 g de ninhidrina + 24 mL de ácido acético glacial + 16 mL de ácido fosfórico 6 M) + 1 mL de ácido acético glacial. Os tubos foram herméticamente fechados e agitados em agitador de tubos, tipo vortex. Após, os tubos foram colocados em banho - maria a 100 °C, por 1 hora. Em seguida, a reação foi imediatamente interrompida em banho de gelo por alguns minutos até atingir a temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 2 mL de tolueno puro seguido de agitação vigorosa, em agitador de tubos tipo vortex, por 20 segundos. Após atingida a temperatura ambiente, a fase aquosa avermelhada (cromóforo + tolueno = parte superior) foi aspirada e a leitura feita em espectrofotômetro a 520 nm, usando-se tolueno como branco. A concentração de prolina foi determinada a partir da curva padrão com L-prolina p.a (Sigma) e os resultados foram expressos em mmoles de prolina /kg MS de tecido.

4.2.9 Determinação de aminoácidos livres totais (N- α -amino livre) em tecidos de raiz, caule e folhas

O método utilizado foi o de PEOPLES *et al.* (1989). 100 mg de tecido vegetal liofilizado foram colocados em tubos de ensaio com rolha de borracha. Foram adicionados 5 mL de água "milli-Q" e a suspensão foi colocada para ferver em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por alguns minutos e, posteriormente, centrifugados em centrífuga de mesa, a 3.000 rpm por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e o resíduo i ressuspendido com outros 5 mL de água "milli-Q", repetindo-se o procedimento de extração anterior. Em seguida, os extratos foram coletados em tubo de ensaio graduado e o volume completado com água "milli-Q" até atingir 10

mL. Em seguida, os extratos foram congelados para posterior determinação de N- α -amino.

A reação foi preparada em tubo de ensaio, com rolha, adicionando-se 0,1 mL de extrato + 0,4 mL de água "milli-Q" + 1 mL de tampão citrato 0,2 M pH=5 + 1 mL do reagente de ninhidrina (10 mL de KCN 0,01 M + 590 mL de metil cellosolve 100% + 5 g de ninhidrina). A mistura foi homogeneizada através de agitação dos tubos e colocada em banho-maria a 100 °C, por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram removidos do banho-maria e colocados em banho de gelo, por alguns minutos, para interromper a reação. Após atingida a temperatura ambiente, as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 570 nm, usando-se água "milli-Q" (em substituição ao extrato) + reagentes como branco. A concentração de aminoácidos livres totais foi determinada a partir da curva padrão através de uma mistura-padrão de L-asparagina + L-glutamina (Sigma) e os resultados expressos em mmoles de N- α -amino / kg MS de tecido.

4.2.10 Determinação de ureídeos em tecidos de caules

O método utilizado foi o de PEOPLES *et al.* (1989). 100 mg de tecido vegetal liofilizado foram colocados em tubos de ensaio com rolha de borracha. Foram adicionados 5 mL de Água "milli-Q" e a suspensão colocada para ferver em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Após isso, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por alguns minutos e, posteriormente, centrifugados em centrífuga de mesa, a 3.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e o resíduo ressuspensionado com outros 5 mL de água "milli-Q", repetindo-se o procedimento de extração anterior. Os extratos foram coletados em tubo de ensaio graduado e o volume completado com água "milli-Q" até atingir 10 mL. Após, os extratos foram congelados para posterior determinação de N-ureídico.

A reação foi preparada em tubos de ensaio, com rolhas, onde foram adicionados 0,1 mL de extrato + 1,15 mL de água "milli-Q". Em seguida, foi

adicionado 0,25 mL de NaOH 0,5 M em cada tubo e a mistura agitada em agitador de tubos tipo vortex e aquecida em banho-maria, a 100 °C, durante 15 minutos. Os tubos foram removidos do banho-maria e resfriados, imediatamente, em banho de gelo e deixados à temperatura ambiente por alguns minutos. Após, 0,25 mL de HCl 0,65 M foi adicionado, misturado e aquecido novamente, em banho-maria a 100 °C, por 4 minutos. Após resfriamento imediato em banho de gelo, durante 15 minutos, foi adicionado 0,25 mL de tampão fosfato 0,4 M pH=7 + 0,25 mL de fenilhidrazina. Após agitação mecânica dos tubos, 1,25 mL de HCl concentrado e pré-resfriado + 0,25 mL de ferricianeto de potássio 0,05 M foram adicionados, misturados e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da cor rósea foi feita em espectrofotômetro a 535 nm, usando-se água "milli-Q" + reagentes como branco. A concentração de ureídeos foi determinada a partir da curva padrão obtida com alantoína p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em mmoles de N-ureídeo / kg MS de tecido.

4.2.11 Determinação do teor de clorofilas *a*, *b* e totais

A extração da clorofila foi feita pelo método descrito por ENGUEL & POGGIANI (1991), com base no clássico de ARNON (1949). 7 mg de folhas secas liofilizadas foram maceradas em almofariz com acetona 80% (v/v) durante 5 minutos. Após centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos, os teores de clorofilas foram medidos através de leituras do sobrenadante em espectrofotômetro a 645, 652 e 663 nm. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais foram determinadas conforme as relações a seguir (WHITHAM *et al.*, 1971):

$$\text{Clorofila } a = \frac{(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) V}{1000 W} \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } \underline{b} = \frac{(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) V}{1000 W} \quad (2)$$

$$\text{Clorofila total} = \frac{A_{652} \times 1000 \times V / 1000 W}{34,5} \quad (3)$$

onde: A = absorvância no comprimento de onda indicado

V = volume final do extrato de clorofila

W = matéria seca, em gramas, do material vegetal utilizado

4.2.12 Determinação da atividade da redutase do nitrato em folhas

Foi empregado o método *in vivo* de HAGEMAN & HUCKLESBY (1971), modificado. Foram pesados, aproximadamente, 200 mg de discos foliares de 0,5 cm de diâmetro. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio do tipo "vacutainer", contendo 5 mL do tampão de reação (tampão fosfato 0,1 M, pH=7,5; contendo isopropanol 1% (v/v), KNO₃ 50 mM e cloranfenicol 15 mg/L) e estes cobertos com papel alumínio (tratamento escuro). Em seguida, os tubos foram evacuados com o auxílio de uma bomba de vácuo, durante 2 minutos. Após, os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C, por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em tubos de ensaio tipo pirex, foram adicionados alíquotas de 1 mL de tampão fosfato + 2 mL do extrato diluído + 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 2,4 M + 1 mL de N-1-naftiletlenodiamina dicloridrato (NNEDA) 0,02 % , totalizando um volume final de 5 mL. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm , usando-se água "milli-Q + reagentes como branco. A atividade da redutase do nitrato foi estimada através da produção de NO₂⁻ no meio de reação, sendo expressa em mmoles de NO₂⁻ /kg MF/ h, a partir de uma curva padrão obtida com KNO₂ p.a (Sigma).

4.2.13 Determinação da atividade de glutamina sintetase (GS) em nódulos e folhas

Nódulos liofilizados foram triturados em almofariz, em banho de gelo, na presença de nitrogênio líquido. A 0,1 g de nódulo, 5 mL (2+2+1 mL) de tampão HEPES 0,1 M pH=8,0, contendo MgCl 10 mM + ditioneitol 5 mM + EDTA-Na 0,2 M foram adicionados. Após maceração por 5 minutos, a suspensão foi filtrada em pano fino de sêda e centrifugada a 30.000 x *g*, a 0°-4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante (citossol livre de células) foi congelado para posterior determinação da atividade.

As folhas foram trituradas em almofariz, banho de gelo, com nitrogênio líquido. A 0,2 g de folhas secas liofilizadas 5 mL (2 mL + 2 mL + 1 mL/ 2 minutos cada) de tampão de extração TRIS-HCl 25 mM, pH=7,6, contendo 10 mM de MgCl₂ + 10 mM de β-2-mercaptoetanol + PVP 5% (p/v) + 5 mM de EDTA-Na foram adicionados. Após maceração por 5 minutos, a suspensão foi filtrada em pano fino de sêda e centrifugada a 30.000 *g* (21.000 rpm), a 0 – 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi congelado para posterior determinação da atividade de GS.

A atividade de GS nos nódulos e nas folhas foi determinada pelo método biossintético do hidroxamato descrito em SILVEIRA *et al.* (1998). A reação foi preparada, em tubo de ensaio, com 600 μL de tampão de reação TRIS-HCl 0,25 M, pH=7,0 + 200 μL de glutamato de sódio 0,3 M, pH=7,0 + 200 μL de ATP 30 mM, pH=7,0 + 200 μL de Mg SO₄ . 7 H₂O 0,5 M + 500 μL de extrato de nódulos ou folhas + 200 μL de solução de hidroxilamina (NH₂ OH 1,0 M + NaOH 1,0 M, na proporção 1:1 v/v). Após agitação vigorosa, em agitador de tubos tipo vortex e incubação em banho-maria, a 30 °C, por 30 minutos, 500 μL de solução férrica [FeCl₃.6 H₂O 10 % (p/v) em HCl 0,2 M + ácido tricloroacético 24 % (p/v) + HCl 50 % (v/v), na proporção 1:1:1] foram adicionados e a suspensão centrifugada a 7.000x *g* por 10 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, usando-se água "milli-Q" (em substituição ao extrato enzimático) + reagentes, como branco. A atividade da glutamina sintetase (GS), foi determinada a partir da curva padrão de γ-glutamil-hidroximato e os resultados foram expressos em mmoles de γ-

glutamil-hidroximato / kg MS de tecido / hora e mmoles de γ -glutamil-hidroximato / kg de proteínas solúveis 10^{-3} / hora.

4.2.14 Determinação da concentração de proteínas solúveis totais

As concentrações das proteínas solúveis totais de nódulos e folhas foram determinadas pelo método colorimétrico de BRADFORD (1976). Os nódulos liofilizados foram triturados em almofariz em banho de gelo e na presença de nitrogênio líquido (-196°C). A 0,1 g de nódulos secos alíquotas de 2 + 2 + 1 mL de tampão HEPES 0,1 M pH=8, contendo KOH 0,1M + ditioneitol 5 mM + EDTA-Na 0,2 M foram adicionadas. Após macerados durante 5 minutos, foram filtrados em pano fino de sêda e centrifugados a $30.000\times g$, a $0^{\circ}\text{--}4^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos. O sobrenadante (citosol livre de células) foi congelado (-20°C) para posterior determinação de proteínas solúveis e atividade de glutamina sintetase. As folhas recém-colhidas e congeladas foram trituradas em almofariz em banho de gelo e na presença de nitrogênio líquido (-196°C). A 1 g de folha fresca foi adicionado (2 + 2 + 1 mL) tampão Tris-HCl 25 mM, pH=7,6, contendo MgCl_2 10 mM + β -2-mercaptoetanol 10mM + EDTA-Na 5 mM + PVP insolúvel 5% (p/v). Após triturado durante 5 minutos, o macerado foi filtrado em pano fino de sêda e centrifugados a $30.000\times g$, a $0^{\circ}\text{--}4^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. O sobrenadante foi congelado para posterior análise. A reação foi preparada em tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,1 mL de extrato (diluiu-se quando necessário) + 2,5 mL do reagente de Bradford. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm, mantendo-se a faixa de 0,3 à 0,5 unidades de absorbância, usando-se água "milli-Q" + reagente como branco. A concentração de proteínas solúveis totais foi estimada a partir da curva padrão construída com soro albumina bovina p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em kg de proteína /kg MS. 10^{-3} de tecido.

4.2.15 Determinação de NO_3^- em raízes, caules e folhas

Foram adicionados 100 mg de tecido vegetal liofilizado a tubos de ensaio com rolha de borracha contendo 5 mL de água "milli-Q" e colocados para ferver em banho-maria a 100 °C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram deixados a temperatura ambiente por alguns minutos e, posteriormente, centrifugados, a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio e o precipitado foi ressuspenso com outros 5 mL de água "milli-Q", sendo repetido o procedimento da extração anterior. Em seguida, os extratos foram coletados em um tubo de ensaio graduado e o volume foi completado com água "milli-Q" até atingir 10 mL. Os extratos obtidos foram congelados para posterior análise.

O método utilizado foi o de CATALDO *et al* (1975), sendo os valores das alíquotas reduzidos para $\frac{1}{4}$ dos mencionados por esses autores. A reação foi preparada em tubo de ensaio, contendo 100 μL do extrato + 200 μL de solução de ácido salicílico 5 % (p/v), marca Sigma, em ácido sulfúrico concentrado p.a. (Merck). Após agitação vigorosa, em agitador de tubos tipo vortex os tubos foram deixados a temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, lentamente, 4700 μL de NaOH 2 M foram adicionados sob agitação para atingir pH acima de 12. Após repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos, as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 410 nm, usando-se água "milli-Q" + reagentes, como branco. A concentração de NO_3^- foi determinada a partir da curva padrão com KNO_3 p.a (Sigma) e os resultados foram expressos em mmoles de NO_3^- / kg MS de tecido.

4.2.16 Determinação da concentração de leghemoglobina em nódulos

O método colorimétrico da cianometahemoglobina de WILSON & REISENAUER (1963) e DAKORA (1995), com algumas modificações, foi empregado. 0,2 g de nódulos secos liofilizados foi macerado juntamente com 10 mL de solução de DRABKIN [KCN 0,8 mM + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,6 mM + NaHCO_3 12 mM] por 3 vezes consecutivas (3 mL + 3 mL + 4 mL, durante 2 minutos em cada porção) . Após

centrifugação a $500\times g$ por 15 minutos, o volume foi completado com solução de Drabkin para 10 mL, e novamente centrifugado a $30.000\times g$, a $0^{\circ}\text{--}4^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos. A leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, usando-se a solução de Drabkin como branco. A concentração de leghemoglobina foi determinada a partir da curva padrão de hemoglobina e os resultados expressos em kg de leghemoglobina /kg MS 10^{-3} de nódulo.

4.2.17 Determinação de ureídeos na seiva do xilema

A análise foi feita pelo método colorimétrico de VOGELS & VAN DER DRIFT (1970), baseado na hidrólise da alantoína até glioxilato. Para a coleta da seiva do xilema, as plantas foram transferidas para o laboratório, às 9:00 hs da manhã. Todos os vasos foram colocados em presença de água destilada durante 30 minutos com finalidade de induzir a pressão radicular. Após isso, as plantas foram cortadas com uma lâmina na altura do nó cotiledonar, procedendo-se a lavagem e secagem do local do corte com papel de filtro. A seiva exsudada foi coletada com o auxílio de seringas hipodérmicas de 1,0 mL, durante o tempo de 60 minutos, sendo desprezada a seiva inicial. O volume da seiva foi aferido e, em seguida, mantido em frasco de vidro, em freezer à aproximadamente -20°C , até o momento da análise.

Para a análise, a $5\ \mu\text{L}$ de seiva do xilema + $745\ \mu\text{L}$ de água "milli-Q" foram adicionados $250\ \mu\text{L}$ de NaOH 0,5 M. Após, agitação em um agitador de tubos tipo vortex e aquecimento, em banho-maria a 100°C , por 8 minutos e resfriamento em banho de gelo foram adicionados $250\ \mu\text{L}$ de HCl 0,65 M. Após agitação e novo aquecimento em banho-maria a 100°C durante 4 minutos e resfriamento em banho de gelo, foram adicionados $250\ \mu\text{L}$ de tampão fosfato 0,4 M pH=7 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\ \text{H}_2\text{O}$ + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) + $250\ \mu\text{L}$ de fenilhidrazina (0,066 g/20 mL de H_2O). Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e, então, colocados em água gelada. A seguir, $1250\ \mu\text{L}$ de HCl concentrado p.a, pré-gelado + $250\ \mu\text{L}$ de ferricianeto de potássio (0,417 g / 25 mL de H_2O) foram adicionados. Os tubos foram retirados da água gelada e agitados em agitador de tubos tipo vortex e deixados à

temperatura ambiente por 15 minutos, até desenvolverem cor rósea ou vermelha. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 535 nm, usando-se água "milli-Q" + reagentes, como branco. A concentração de N-ureídeo foi determinada a partir de uma curva padrão com alantoína p.a.(Sigma). Os resultados foram expressos em mmoles de N-ureídeo / L de seiva.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta parte da pesquisa, as duas cultivares de feijão-de-corda, Vita 3 e Vita 7, foram cultivadas, tanto na presença de 5 mM de NO_3^- como na ausência de nitrato e, em seguida, submetidas a um estresse hídrico moderado, imposto pela suspensão da irrigação durante 3 dias consecutivos. Pelo aspecto visual das plantas, o estresse hídrico provocou os mesmos sintomas descritos no Capítulo 1 para a cultivar Vita-7. Entretanto, a cultivar Vita 3, quando nodulada na ausência de nitrato, mostrou maior sensibilidade ao estresse, indicada pela intensa senescência, seguida de abscisão foliar. Além disso, essa cultivar mostrou um aumento intenso no tamanho de cada um dos folíolos, quando comparado com plantas noduladas na presença de nitrato.

A cultivar Vita 7, quando na presença de NO_3^- , apresentou uma produção de massa seca total ligeiramente superior que Vita 3. Ao contrário, na ausência de nitrato, Vita 3 mostrou uma massa total de mais que duas vezes a de Vita 7. Entretanto, o estresse hídrico reduziu em 46% a massa total de Vita 3 nodulada na ausência de nitrato, contra 32% de redução em Vita 7. Na presença de nitrato, as reduções nas massas secas, provocada pelo estresse, foram de 29% e 20%, respectivamente, para Vita 3 e Vita 7 (Figura 23 A). Portanto, Vita 3 mostrou maior crescimento quando nodulada na ausência de nitrato, enquanto que Vita 7, ao contrário, apresentou maior crescimento na presença de nitrato. Por outro lado, Vita 3 e Vita 7 mostraram-se mais sensíveis ao estresse quando crescidas na ausência de nitrato. O maior crescimento de Vita 3 na ausência de nitrato foi relacionado com a maior nodulação, em relação à Vita 7 (Figura 25 B).

As relações parte aérea/raiz das duas cultivares foram reduzidas pelo estresse hídrico, tanto na presença, como na ausência de nitrato (Figura 23 B). Essas reduções foram relacionadas com maiores reduções no crescimento de caules e folhas em relação aos de raízes. Na realidade, Vita 7 mostrou maiores reduções nas

relações parte aérea/raiz do que Vita 3 devido apresentar um ligeiro aumento na massa das raízes enquanto que essa última cultivar apresentou reduções na massa das raízes, principalmente quando noduladas na ausência de nitrato (Figuras 23 B, 24 A, 24 B, 25 A e 25 B). Esses resultados evidenciam que Vita 3 mostrou-se menos tolerante ao déficit hídrico, principalmente quando nodulada na ausência de nitrato.

A maior sensibilidade da cultivar Vita 3 foi inferida a partir da menor relação parte aérea/raiz, maior decréscimo na área foliar (massa das folhas) e maior tamanho de folíolos, características associadas com a tolerância ao déficit hídrico em cultivares de feijão-de-corda (GUIMARÃES, 1988) e em outras espécies cultivadas (JONES *et al.*, 1981; PASSIOURA, 1981; TAIZ & ZEIGER, 1991). É interessante observar que Vita 3 apresentou profundas alterações na morfologia dos folíolos (tamanho) quando crescida na presença ou ausência de nitrato. O tamanho dos folíolos, quando expresso em termos de massa/folíolo, aumentou 240% nas plantas cultivadas na ausência de nitrato, em relação àquelas cultivadas na presença de nitrato (Figura 27 A). Portanto, as plantas noduladas na ausência de nitrato apresentaram uma morfologia foliar adversa às estratégias para tolerância ao déficit de água: folhas maiores e em menor número (TAIZ & ZEIGER, 1991).

É possível que as duas fontes de N ($N_2 + NO_3^-$ versus somente N_2) utilizadas por Vita 3 possam ter induzido diferentes relações de citocininas e giberelinas na parte aérea das plantas. A biossíntese desses hormônios está relacionada com o metabolismo do nitrogênio. Maiores concentrações de N induzem maiores concentrações de citocininas e maiores taxas de divisão celular na parte aérea. Quando compara-se NO_3^- com NH_4^+ , como fontes de N, observa-se que essa última fonte provoca maiores incrementos nas concentrações de citocininas. Por sua vez, aumentos no suprimento de citocininas está relacionado com indução de síntese de ácido giberélico. Nessas condições, o crescimento da parte aérea, assim como a taxa de expansão foliar, são estimulados (MARSCHNER, 1986). Portanto, o suprimento de N reduzido, principalmente na forma de ureídeos nas plantas noduladas na ausência

de nitrato, deve ter induzido alterações nas concentrações desses dois hormônios, refletindo em modificações na morfologia das folhas.

A cultivar Vita 3 apresentou um aumento de 5,5 vezes na massa de nódulos quando cultivada na ausência de nitrato, em relação à massa de nódulos na presença de nitrato. Por outro lado, Vita 7 mostrou um aumento de apenas 2,5 vezes. A massa dos nódulos de Vita 3 foi cerca de 2 vezes superior à de Vita 7, quando ambos foram nodulados na ausência de nitrato, enquanto que na presença de nitrato as massas foram praticamente iguais nas duas cultivares (Figura 25 B). O estresse hídrico provocou reduções significativas nas massas dos nódulos, principalmente em Vita 3 cultivado na ausência de nitrato. Portanto, as duas cultivares apresentaram semelhanças quanto a tolerância ao nitrato (5 mM), apesar de Vita 3 apresentar maior capacidade de nodulação quando as duas cultivares foram inoculadas com a estirpe CB-756 na ausência de nitrato.

A estirpe CB-756 foi comparada, em termos de nodulação e atividade de nitrogenase, com 17 estirpes nativas do Nordeste adaptadas à temperaturas elevadas. Neste estudo, essa estirpe mostrou uma eficiência comparável às demais estirpes nativas. Por outro lado, quando Vita 7 foi comparada com a cultivar "seridó", ambas inoculadas com 3 diferentes estirpes de rhizóbio, mostrou maior nodulação do que "seridó" (STANFORD *et al.*, 1988). Esses dados evidenciam que estirpe CB-756 pode ser utilizada como modelo experimental em condições de temperaturas elevadas e que a performance apresentada por Vita 3 sugere que a cultivar deve apresentar um bom potencial para nodulação com estirpes de rhizóbio. A interação entre estirpes de rhizóbio e cultivares de leguminosas apresenta uma grande variabilidade genética na expressão de caracteres para a nodulação (NEVES & HUNGRIA, 1987).

Os valores de umidade de folhas e caules, nas duas cultivares, foram semelhantes e não apresentaram modificações em função do estresse hídrico (Figura 28 A e 28 B). Nas raízes, ocorreu uma ligeira tendência de decréscimo da umidade por efeito do déficit hídrico, nas duas cultivares, e nos níveis de nitrato. Nos nódulos,

a umidade apresentou também pouca variação, exceção para a cultivar Vita 7 que mostrou um decréscimo mais acentuado, quando nodulada na ausência de nitrato (Figura 29 A e 29 B). Esses resultados evidenciam que o estresse hídrico imposto às duas cultivares foi moderado em relação àqueles observados nos Capítulos 1 e 2. As concentrações de clorofilas a e totais foram semelhantes entre as duas cultivares e nos dois tratamentos de nitrato. O estresse hídrico praticamente não afetou as concentrações de clorofilas nas duas cultivares (Figura 30 A e 30 B).

As concentrações de prolina livre em folhas e raízes apresentaram o mesmo padrão de variação, quer sejam expressas em relação à massa seca (mmol/kg massa seca), ou como % do total de aminoácidos livres (Figuras 31 A, 31 B e 32 A, 32 B). As duas cultivares apresentaram grandes incrementos nas concentrações de prolina por efeito do estresse hídrico, sendo o acúmulo mais acentuado nas raízes de Vita 7. Nas folhas, Vita 3 exibiu maior acúmulo (cerca de 3 vezes) do que Vita 7 (duas vezes), na presença de nitrato (Figura 32 A). Na ausência de nitrato, as duas cultivares exibiram a mesma resposta, mostrando um acúmulo de prolina cerca de 2 vezes nas folhas, enquanto que nas raízes o incremento foi de aproximadamente 15 vezes. Na presença de nitrato, as raízes de Vita 7 mostraram um aumento de aproximadamente 21 vezes, enquanto que Vita 3 apresentou um acréscimo de 6 vezes, em relação ao controle (Figura 32 B).

A possível menor sensibilidade exibida por Vita 7 ao estresse, na presença de nitrato, pode estar associado ao maior crescimento radicular (Figura 25 A) e ao maior acúmulo de prolina nas raízes (Figura 31 B). Entretanto, é importante observar que nas raízes Vita 3 apresentou maior acúmulo de aminoácidos livres do que a cultivar Vita 7 (Figura 33 B). Desse modo, é possível que um outro tipo de aminoácido ou derivado nitrogenado possa ter contribuído mais efetivamente para o ajustamento osmótico de Vita 3, em relação à Vita 7.

O maior acúmulo de prolina nas raízes, em resposta ao déficit de água, sugere que esse órgão de feijão-de-corda pode participar no metabolismo desse aminoácido e no ajustamento osmótico dessas plantas. Entretanto, os dados não são conclusivos para evidenciar uma efetiva participação na retenção de água nos tecidos. Essa matéria ainda é controvertida na literatura. Alguns trabalhos tem sugerido que *Vigna unguiculata* apresenta baixa capacidade de ajustamento osmótico em relação ao estresse hídrico (Mc CREE & RICHARDSON, 1987). Entretanto, em função dos grandes incrementos na acumulação líquida de prolina, particularmente nas raízes, observados nas duas cultivares, é muito provável que esse aminoácido esteja envolvido com o ajustamento osmótico do feijão-de-corda.

É possível que o ajustamento osmótico não seja a estratégia mais importante utilizada por feijão-de-corda para adaptar-se e sobreviver às condições de déficit hídrico, comparada com outras como controles no fluxo de absorção de água (TURK & HALL, 1980b) e da resistência estomática (CANCIAN, 1978; TURK & HALL, 1980b; CARVALHO *et al.*, 1998), além da capacidade de manter altos potenciais hídricos internos (SHOUSE, 1979). Apesar da quantidade enorme de trabalhos sobre a acumulação de prolina em plantas submetidas aos estresses hídrico e salino, pouco se conhece sobre o papel efetivo desse aminoácido assim como o próprio processo de ajustamento osmótico "in situ" (JONES *et al.*, 1981; ASPINALL & PALEG, 1981; KISHOR *et al.*, 1995; INGRAM & BARTELS, 1996; PETRUSA & WINICOV, 1997; BRAY, 1997; SHINOZAKI & YAMAGUSHI-SHINOZAKI, 1997; WINICOV, 1998).

A concentrações de aminoácidos livres totais em raízes, caules e folhas, nas duas cultivares, foram sensivelmente aumentadas pelo estresse hídrico (Figuras 33 B, 34 A e 33 A). As raízes das duas cultivares apresentaram maiores concentrações de aminoácidos livres quando cultivadas na presença de nitrato (Figura 33 B). Por outro lado, os caules das duas cultivares noduladas na ausência de nitrato apresentaram incrementos de cerca de 7 vezes nas concentrações de ureídeos, em

relação às plantas noduladas na ausência de nitrato (Figura 34 B). O estresse hídrico induziu aumentos de aproximadamente 2 vezes nas concentrações de ureídeos nos caules das duas cultivares. Essas variações foram proporcionais àquelas observadas nas concentrações de ureídeos na seiva do xilema (Figura 40 B). Esses resultados evidenciam que os ureídeos exportados pelos nódulos foram acumulados nos caules em resposta às diminuições nas taxas de transpiração e redução na síntese de proteínas das folhas devido ao déficit de água.

A aRN foi semelhante nas folhas das duas cultivares noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- (Figura 35 A). O estresse hídrico reduziu drasticamente a atividade nas duas cultivares, com diminuições de 63% e 78% para Vita 3 e Vita 7, respectivamente. Essas reduções foram relacionadas com incrementos nas concentrações de nitrato nas folhas de 41% e 53% para as duas cultivares, respectivamente (Figura 35 B). De maneira semelhante, ocorreram pronunciados aumentos nas concentrações de nitrato em caules e raízes das duas cultivares (Figura 36 A e 36 B). A cultivar Vita 3 apresentou maior acumulação de nitrato em relação à Vita 7, tanto no controle, como nas plantas estressadas (Figuras 35 B e 36 A, 36 B). O estresse hídrico provocou reduções acentuadas nas concentrações de proteínas solúveis totais nas folhas das duas cultivares, na presença dos dois níveis de nitrato (Figura 37 A).

Quando as cultivares Vita 3 e Vita 7 foram noduladas na presença de 5 mM de nitrato apresentaram produção de massa total semelhante (Figura 23 A). Nestas condições, as duas cultivares exibiram a mesma intensidade de nodulação (Figura 25 B), iguais concentrações de leghemoglobina (Figura 40 A), ureídeos no xilema (Figura 40 B) e iguais atividades de GS nos nódulos (Figura 39 A). Associado a isso, mostraram semelhantes aRN nas folhas (Figura 35 A), evidenciando que essas duas cultivares não exibiram contrastes evidentes no processo global de assimilação do nitrogênio inorgânico ($\text{N}_2 + \text{NO}_3^-$). Por outro lado, nessas condições, as duas cultivares também não mostraram diferenças de tolerância ao estresse hídrico imposto, sugerindo que a assimilação de N pode estar envolvida com a tolerância ao déficit de água em plantas de feijão-de-corda.

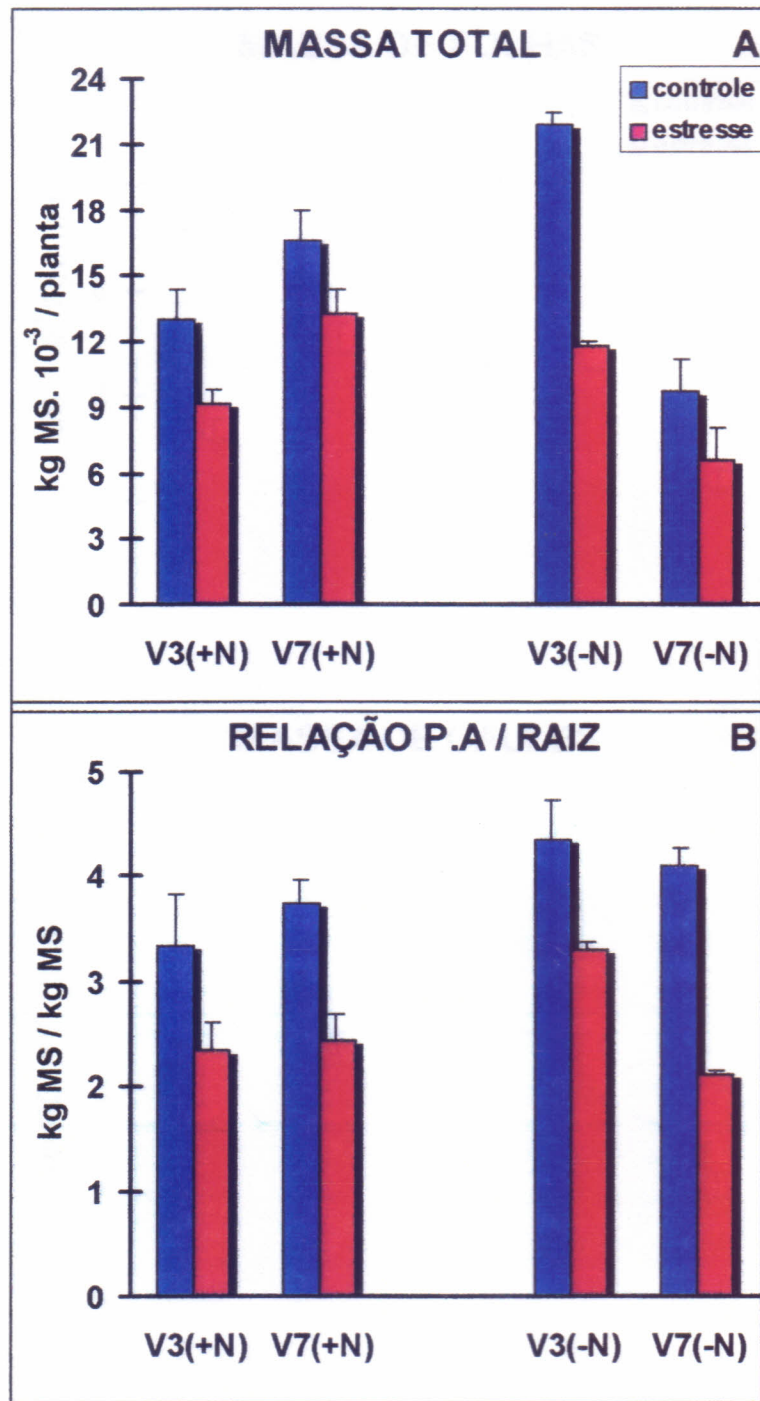


Figura 23. Matéria seca total (A) e Relação parte aérea/raiz (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

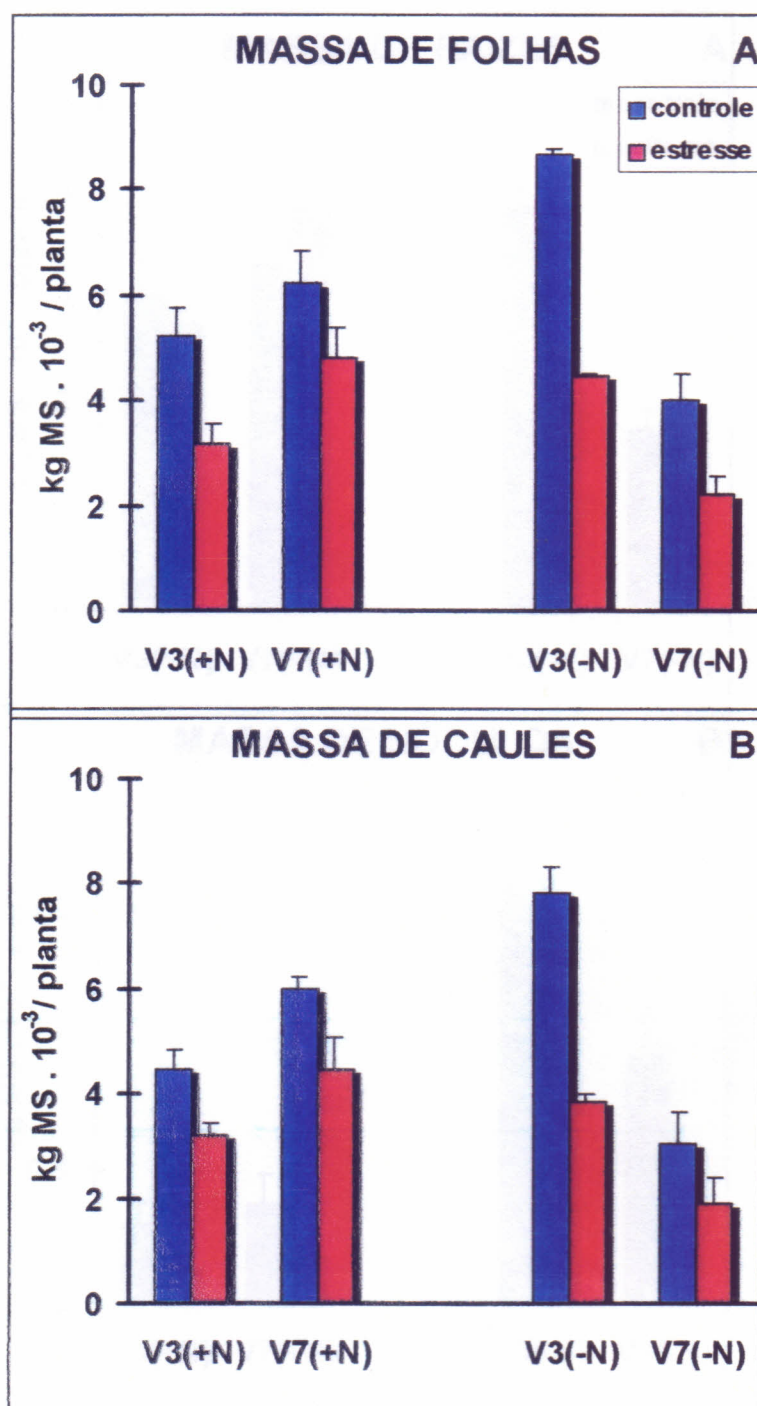


Figura 24. Matéria seca de folhas (A) e de caules (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

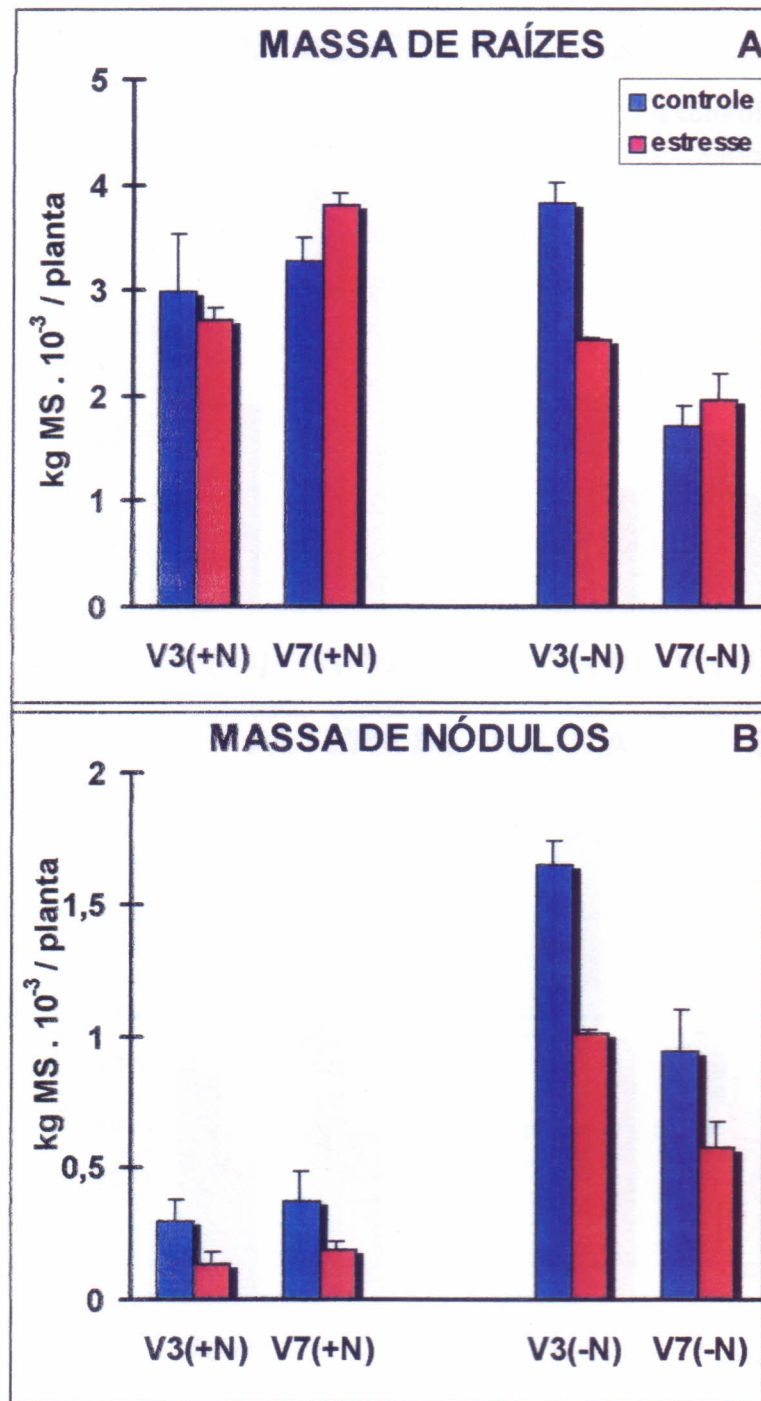


Figura 25. Matéria seca de raízes (A) e de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

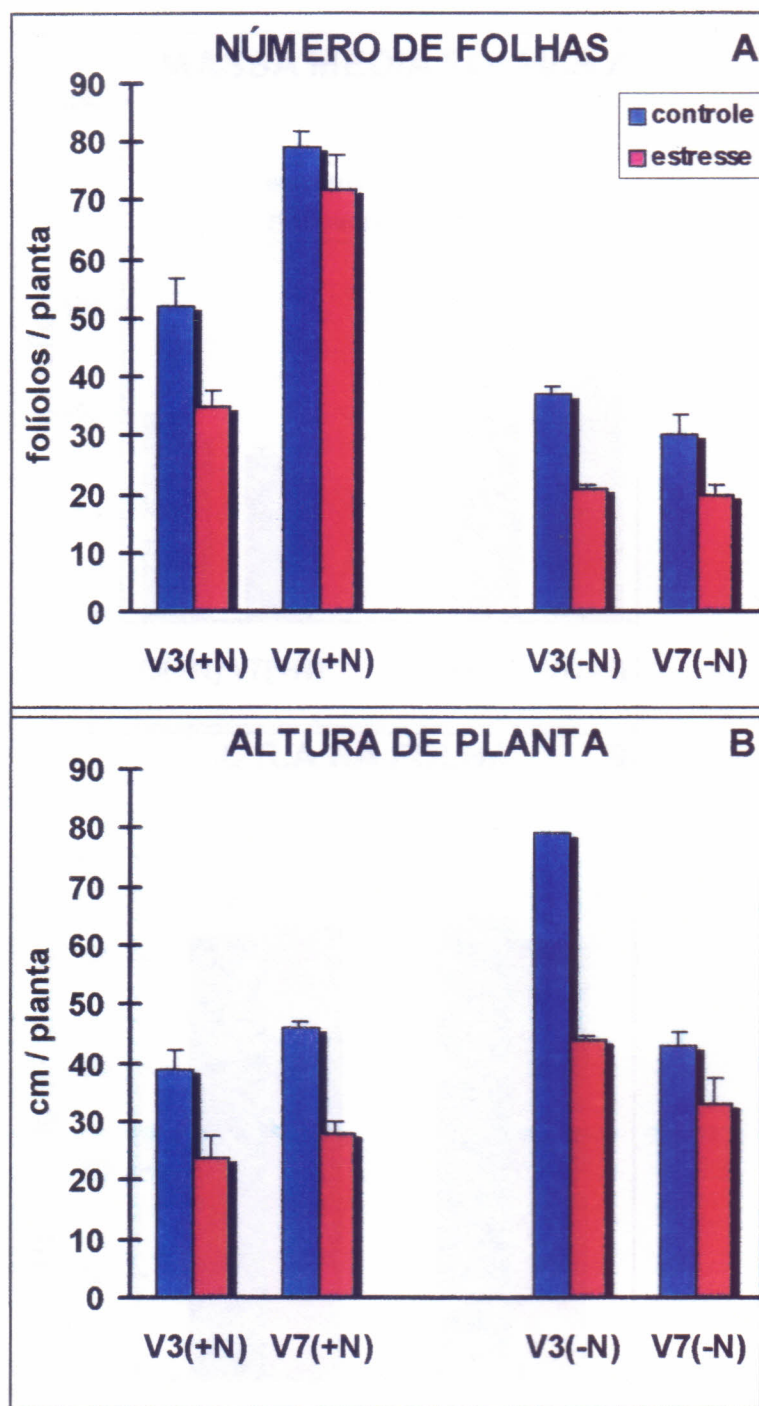


Figura 26. Número de folhas (A) e altura das plantas (B) de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

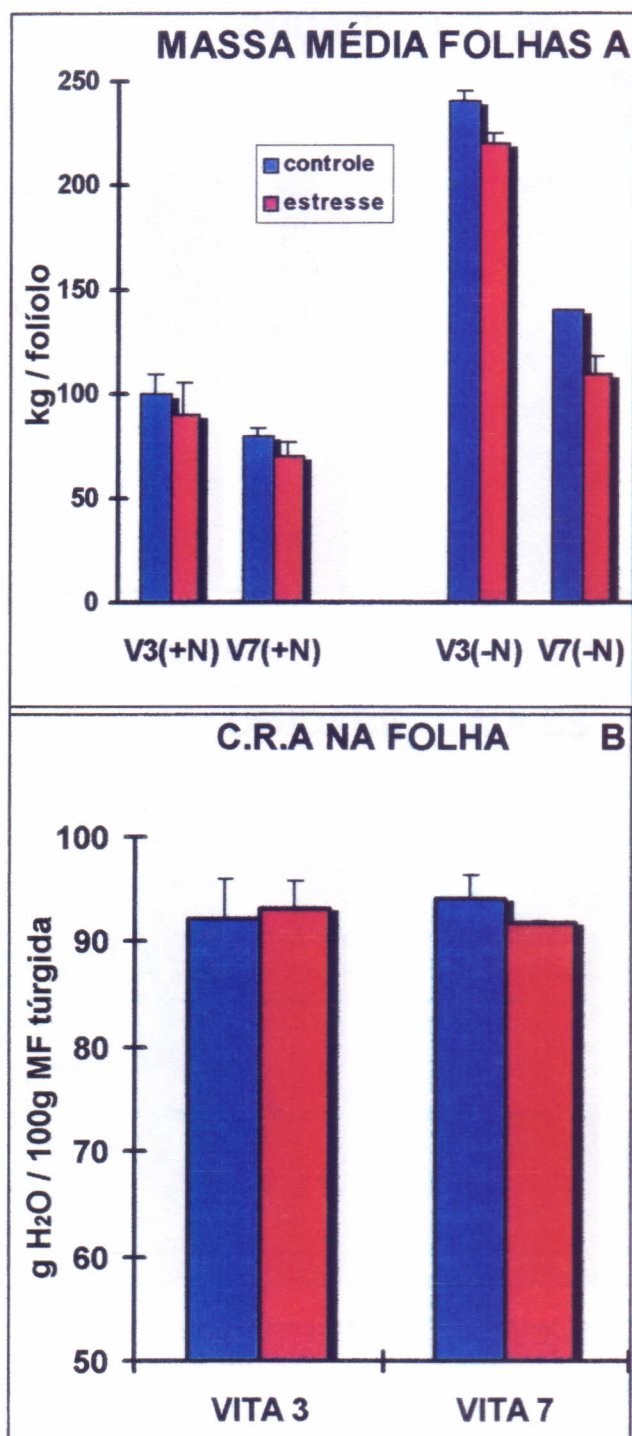


Figura 27. Massa média de folhas (A) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7(V7), noduladas na presença (+N) e na ausência de NO_3^- (-N) e conteúdo relativo de água, em discos foliares, de plantas noduladas, na presença de 5 mM de NO_3^- (B), submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

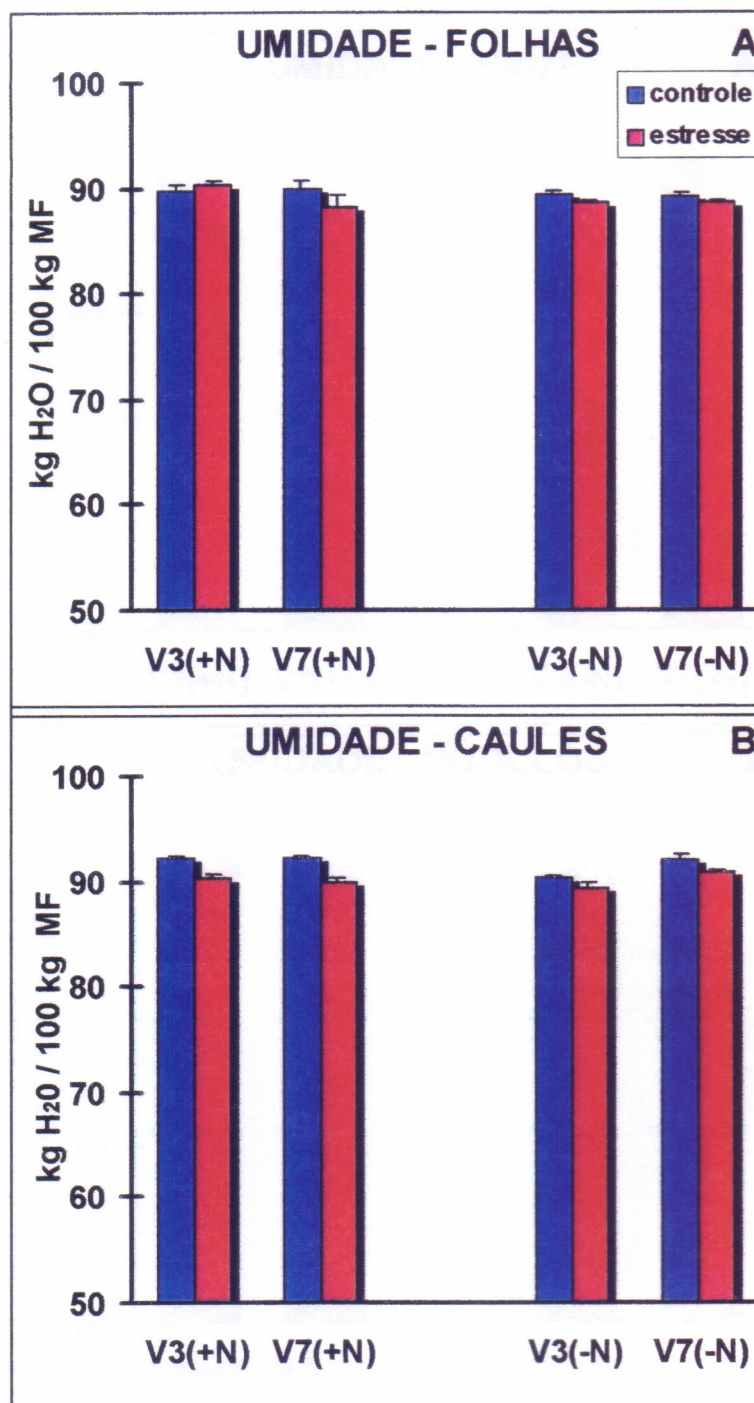


Figura 28. Umidade de folhas (A) e umidade de caules (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO₃⁻, submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

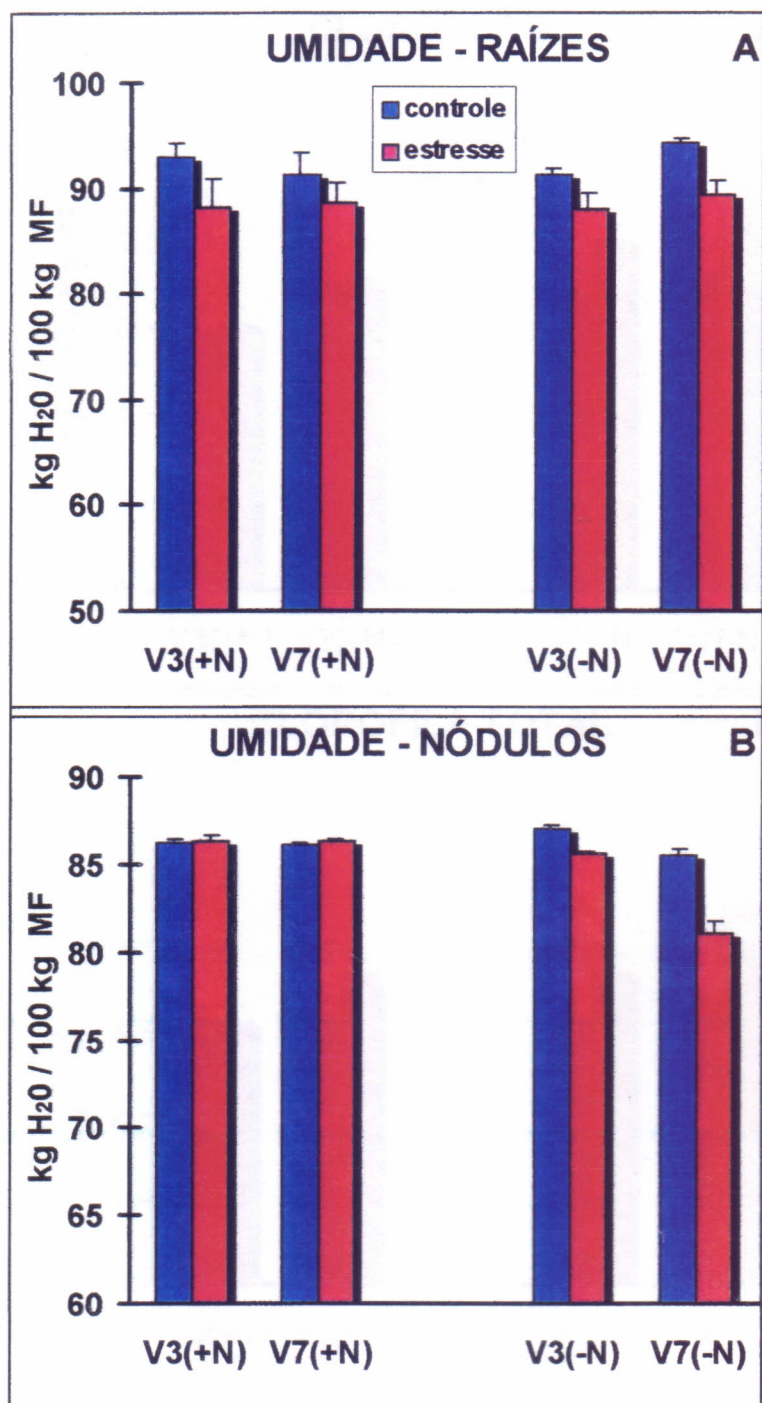


Figura 29. Umidade de raízes (A) e umidade de nódulos (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

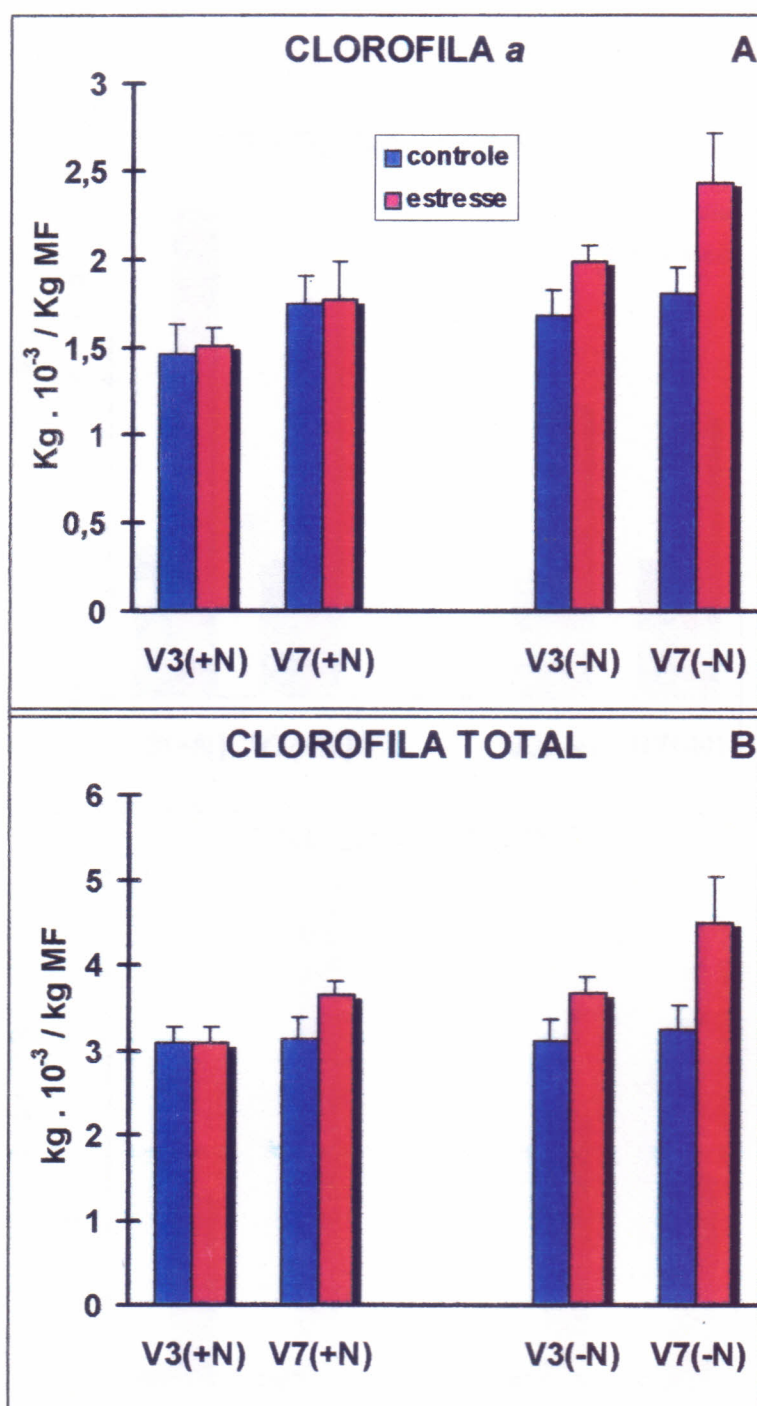


Figura 30. Concentração de clorofila *a* (A) e clorofilas totais (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO₃⁻, submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

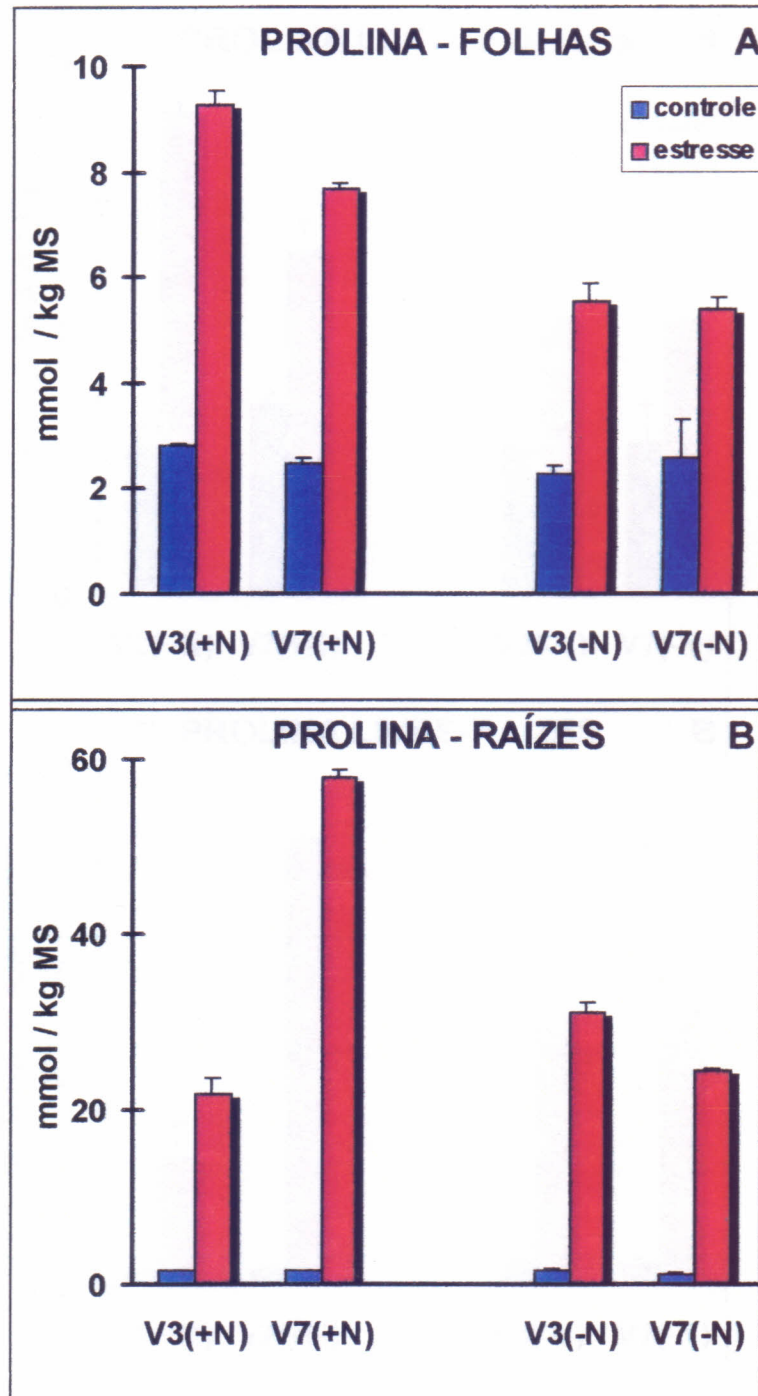


Figura 31. Concentração de prolina nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

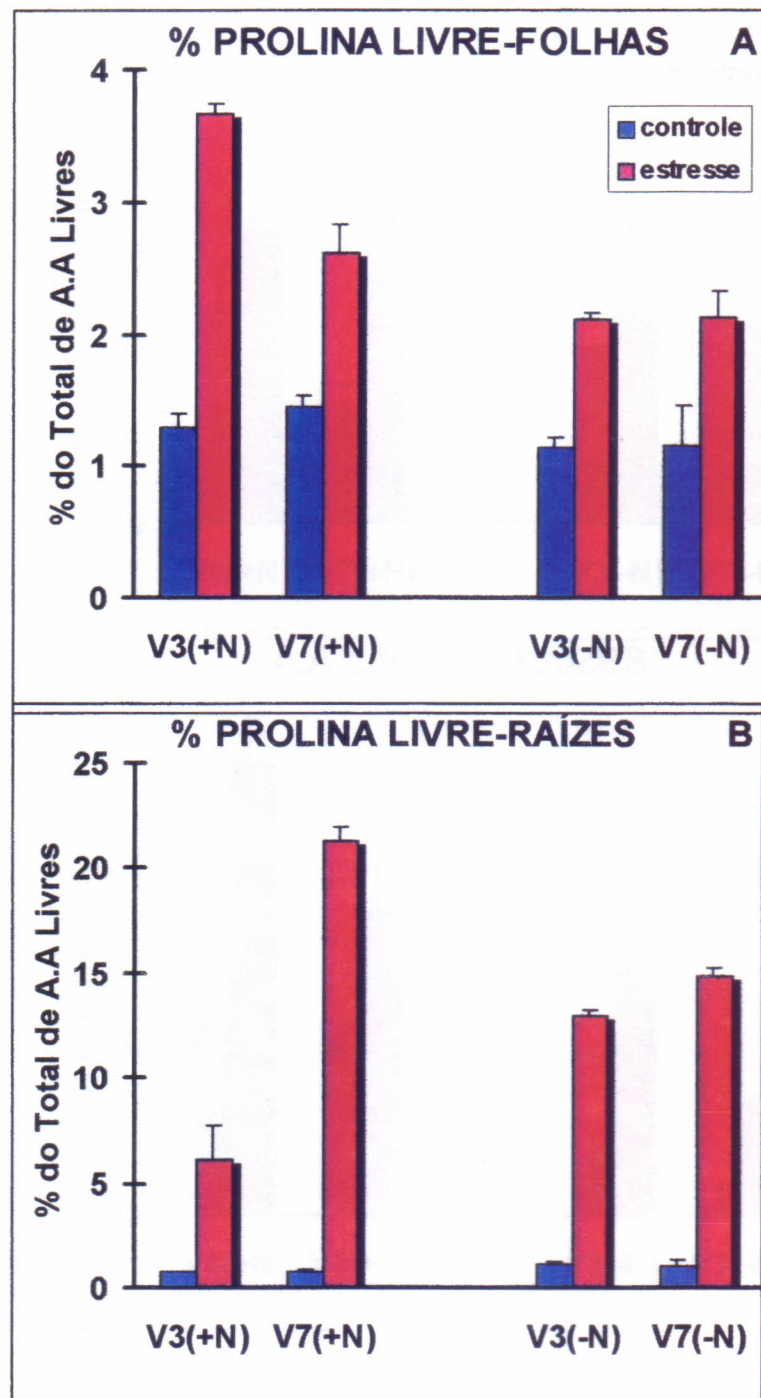


Figura 32. Concentração relativa de prolina (% do total de a.a. livres) nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

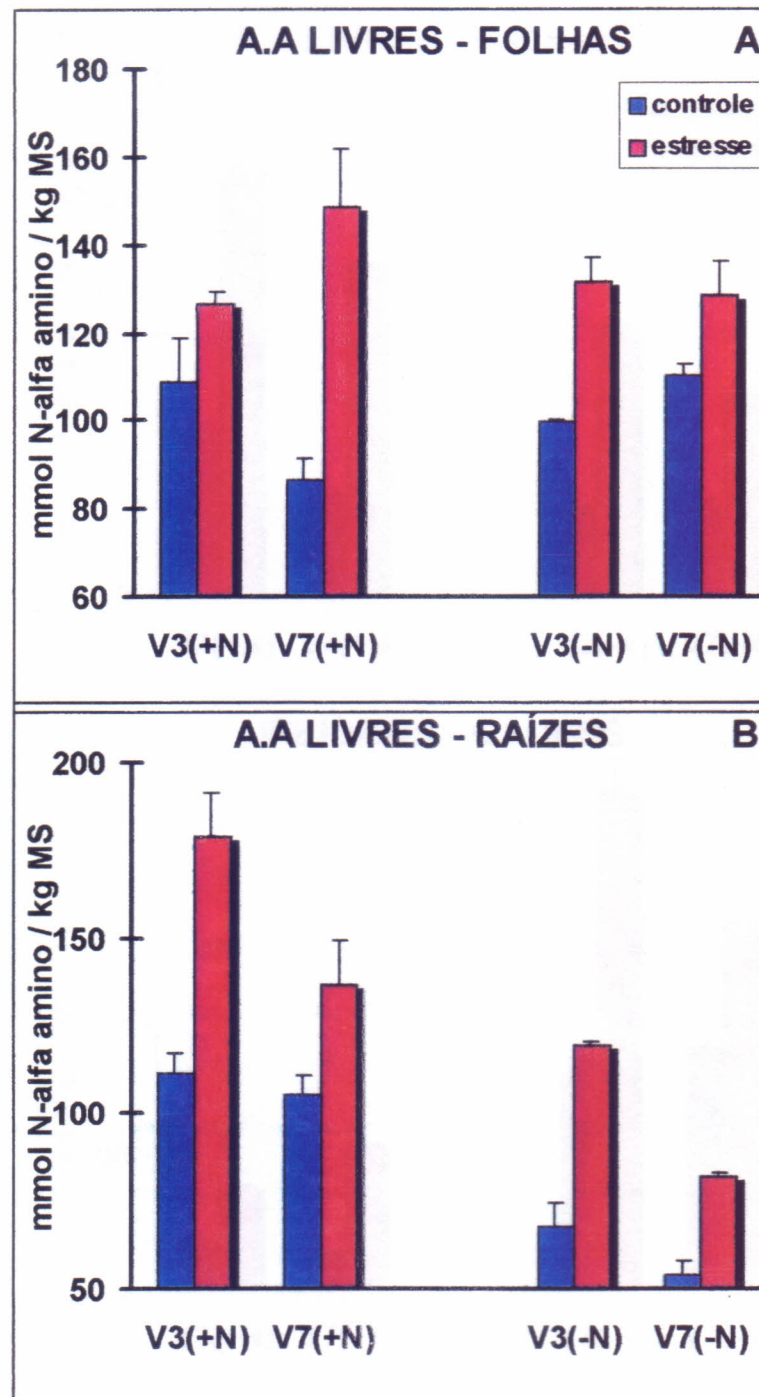


Figura 33. Concentração aminoácidos livres totais nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

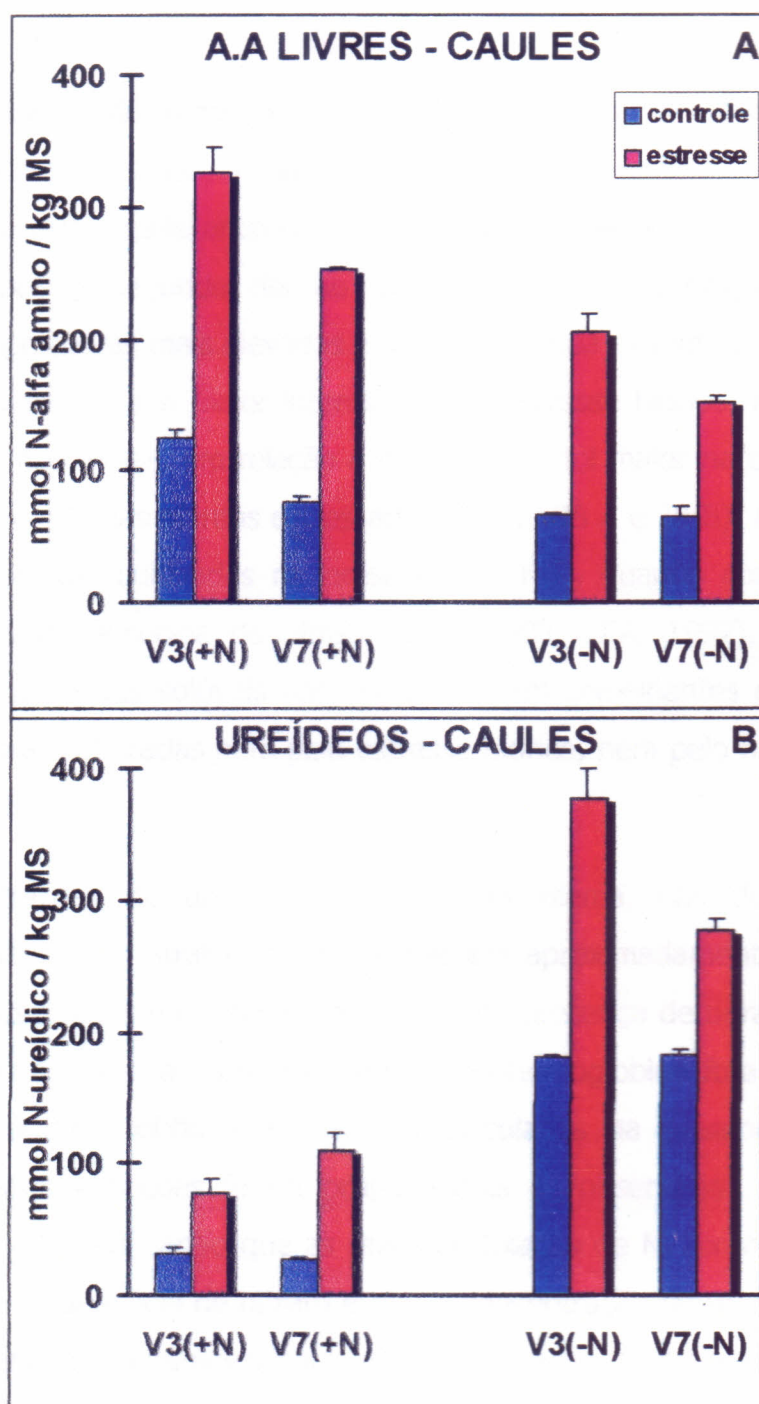


Figura 34. Concentração aminoácidos livres totais (A) e concentração de ureídeos (B) em caules de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

Esses resultados são semelhantes aos observados no Cap. 2 para a cultivar Vita 7. Entretanto, neste estudo, os dados evidenciam que o estresse hídrico imposto foi mais moderado que aquele anterior, particularmente quando comparado com os dados obtidos após o segundo dia de desidratação. Nas condições anteriores prevaleceram temperaturas mais elevadas e maior demanda evapotranspiratória, que devem ter contribuído para a maior intensidade do estresse hídrico. É interessante observar que aGS nas folhas, em relação à massa seca, foi maior na cultivar Vita 7, tanto no controle, como nas plantas estressadas (Figura 38 A e 38 B). A atividade de GS é maior em plantas cultivadas na presença de NO_3^- quando comparada com aquelas noduladas na ausência de nitrato (LEA, 1993; LEA, 1997). A aGS e as concentrações de proteínas solúveis nos nódulos foram semelhantes entre as duas cultivares e não foram alteradas nem pelo estresse hídrico, nem pelo nível de nitrato (Figura 39 A e 39 B).

As concentrações de ureídeos na seiva do xilema, nas duas cultivares inoculadas na ausência de nitrato, foram maiores em aproximadamente 3 vezes em relação àquelas observadas nas plantas inoculadas na presença de nitrato (Figura 40 B). Nas mesmas condições, as concentrações de leghemoglobina foram cerca de 2 vezes superiores àquelas obtidas em plantas inoculadas na presença de nitrato (Figura 40 A). Essas variações foram proporcionais às observadas na massa de nódulos (Figura 25 B), ratificando que as taxas de fixação de N_2 foram maiores nas plantas inoculadas na ausência de nitrato e que a concentração de ureídeos na seiva do xilema pode servir de parâmetro para estimar a fixação de nitrogênio (PEOPLES *et al.*, 1989; DAKORA, 1995; SILVEIRA *et al.*, 1998 a,b). Dessa maneira, é possível inferir que o estresse hídrico reduziu intensamente a fixação de N_2 nas duas cultivares e nos dois níveis de nitrato.

Deve ser ressaltado que a maior fixação de N_2 observado na cultivar Vita 3, inoculada na ausência de nitrato, com base na massa de nódulos e na produção de massa seca total (Figuras 23 A e 25 B), não relacionou-se positivamente com a concentração de ureídeos na seiva do xilema (Figura 40 B). Na realidade, o melhor

parâmetro para estimar as taxas de fixação de N_2 é o fluxo de ureídeos na seiva do xilema (mmol de ureídeos/L seiva/hora). Dessa maneira, a despeito das duas cultivares exibirem concentrações semelhantes de ureídeos, o fluxo foi maior na cultivar Vita 3 devido apresentar maiores massas de raízes (Figura 25 A), de nódulos (Figura 25 B) e maior área foliar (maior transpiração), estimado através da massa das folhas (Figura 24 A). Essa cultivar apresentou maior fluxo de seiva (mL/hora) em relação à Vita 7, tanto no controle como nas plantas estressadas (dados não apresentados).

Se for assumido que a concentração de ureídeos na seiva do xilema apresenta uma boa correlação com a taxa de fixação de N_2 (PEOPLES *et al.*, 1989; HUNGRIA *et al.*, 1994; DAKORA, 1995), pode-se inferir, com limitações, que o estresse hídrico reduziu de maneira semelhante a fixação de nitrogênio nas duas cultivares e nos dois níveis de nitrato. A redução média, nesta condição, foi de aproximadamente 70% (Figura 40 B). É interessante observar que esse decréscimo foi semelhante ao observado para aRN nas folhas das duas cultivares cultivadas na presença de 5mM de NO_3^- (Figura 35 A). Portanto, os dois processos de assimilação de N foram afetados de maneira similar pelo déficit de água.

Na presença de 5 mM de NO_3^- , as cultivares Vita 3 e Vita 7 apresentaram crescimentos (produção de massa seca total) e parâmetros relacionados com a assimilação de N (NO_3^- e N_2) similares entre si, tanto na condição normal como na presença de déficit hídrico. Apesar de exibirem sensibilidades semelhantes ao estresse hídrico, as duas cultivares mostraram acumulação de prolina e aminoácidos livres diferentes nas raízes. Vita 3 apresentou maior acúmulo de aminoácidos, enquanto que Vita 7 exibiu maior acúmulo de prolina nas raízes. Dessa maneira, é possível que as duas cultivares tenham apresentado estratégias diferentes de ajustamento osmótico a partir de prolina e outros compostos nitrogenados solúveis.

Nas plantas noduladas na ausência de nitrato, a cultivar Vita 3 apresentou maior crescimento e maior fixação de N_2 em relação à Vita 7. Essa primeira cultivar apresentou, nessas condições, maior sensibilidade ao estresse hídrico, tanto em

relação à Vita 7, como em relação a ela mesma cultivada na presença de NO_3^- . A maior sensibilidade de Vita 3 foi associada com um maior decréscimo de massa seca total, aumento no tamanho médio dos folíolos, diminuição na acumulação de prolina nas folhas. Portanto, a despeito de Vita 3 mostrar maior capacidade de fixação de N_2 e de crescimento nessas condições, a presença de NO_3^- foi positiva para a maior tolerância ao estresse hídrico.

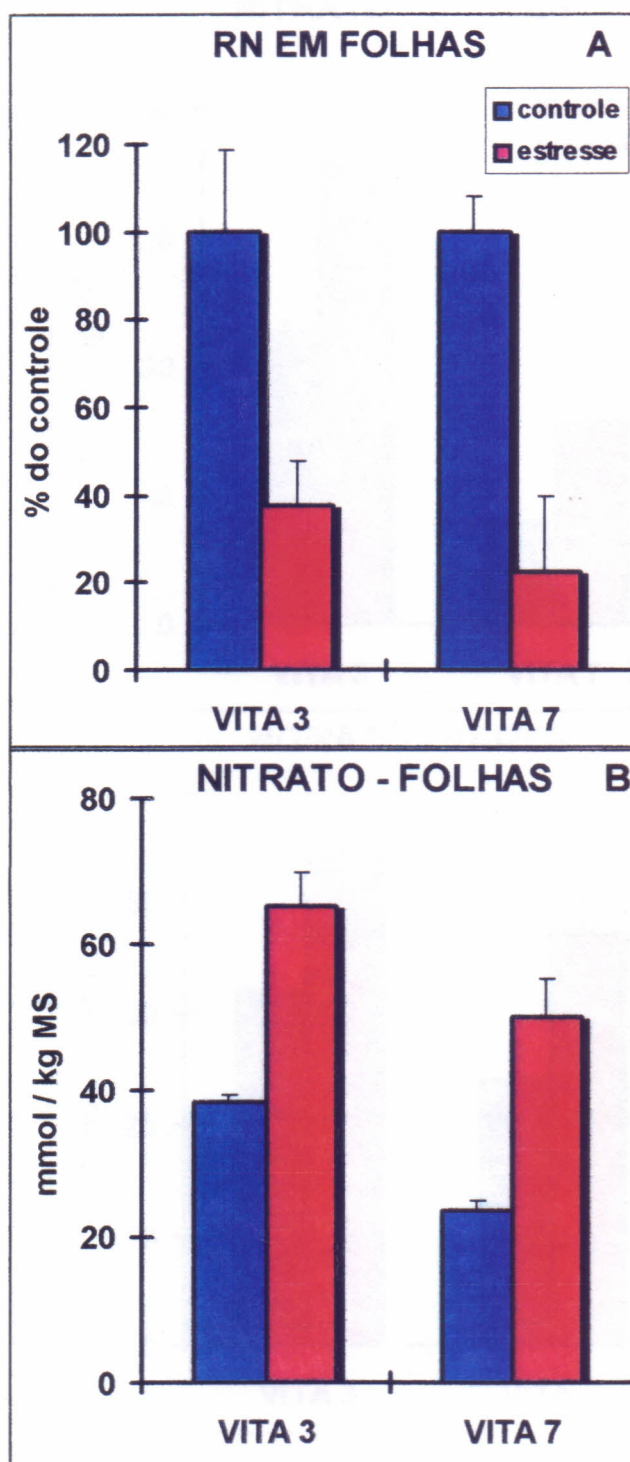


Figura 35. Atividade *in vivo* de redutase de nitrato em discos de folhas (A) e concentração de NO_3^- (B) em folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão. Os valores correspondentes a 100% de atividade de aRN do controle foram de 1,83 e 1,80 mmoles de NO_2^- /kgMF/hora, para Vita 3 e Vita 7, respectivamente.

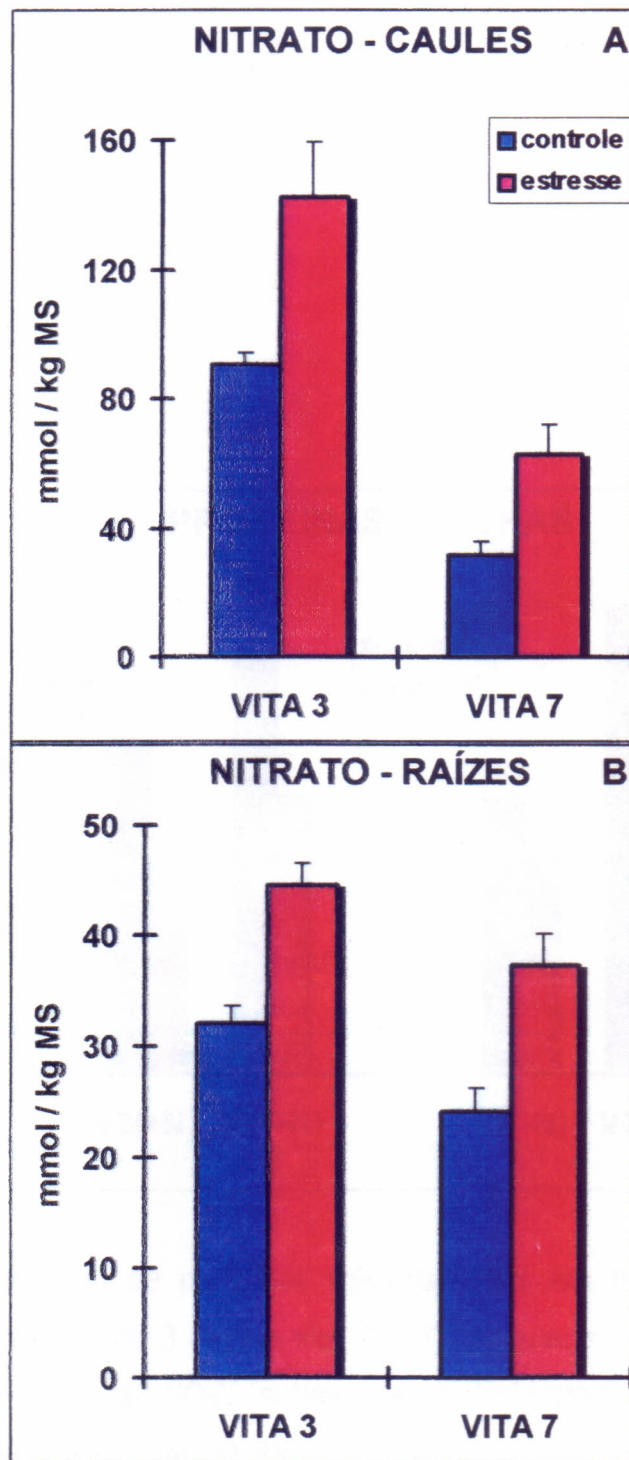


Figura 36. Concentração de NO_3^- em caules (A) e em raízes (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

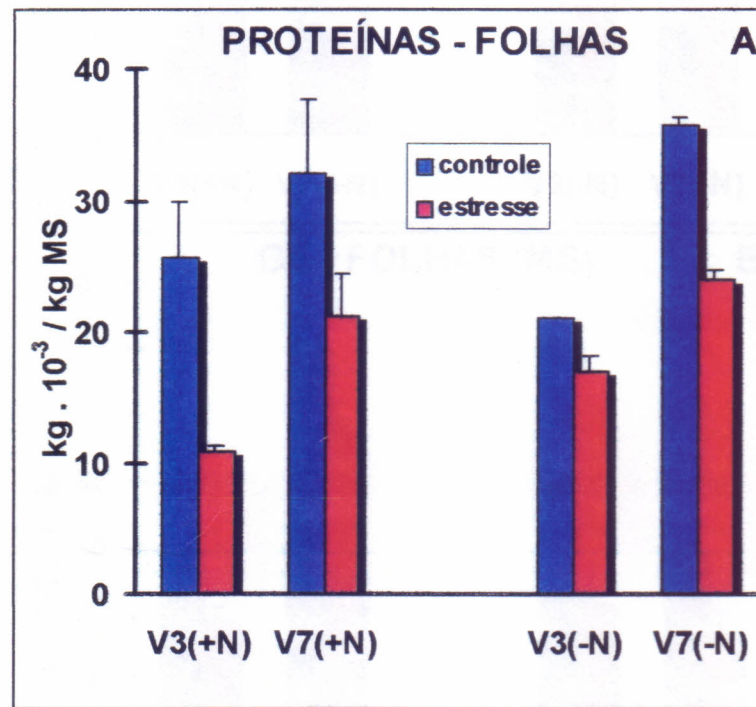


Figura 37. Concentração de proteínas solúveis totais em folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

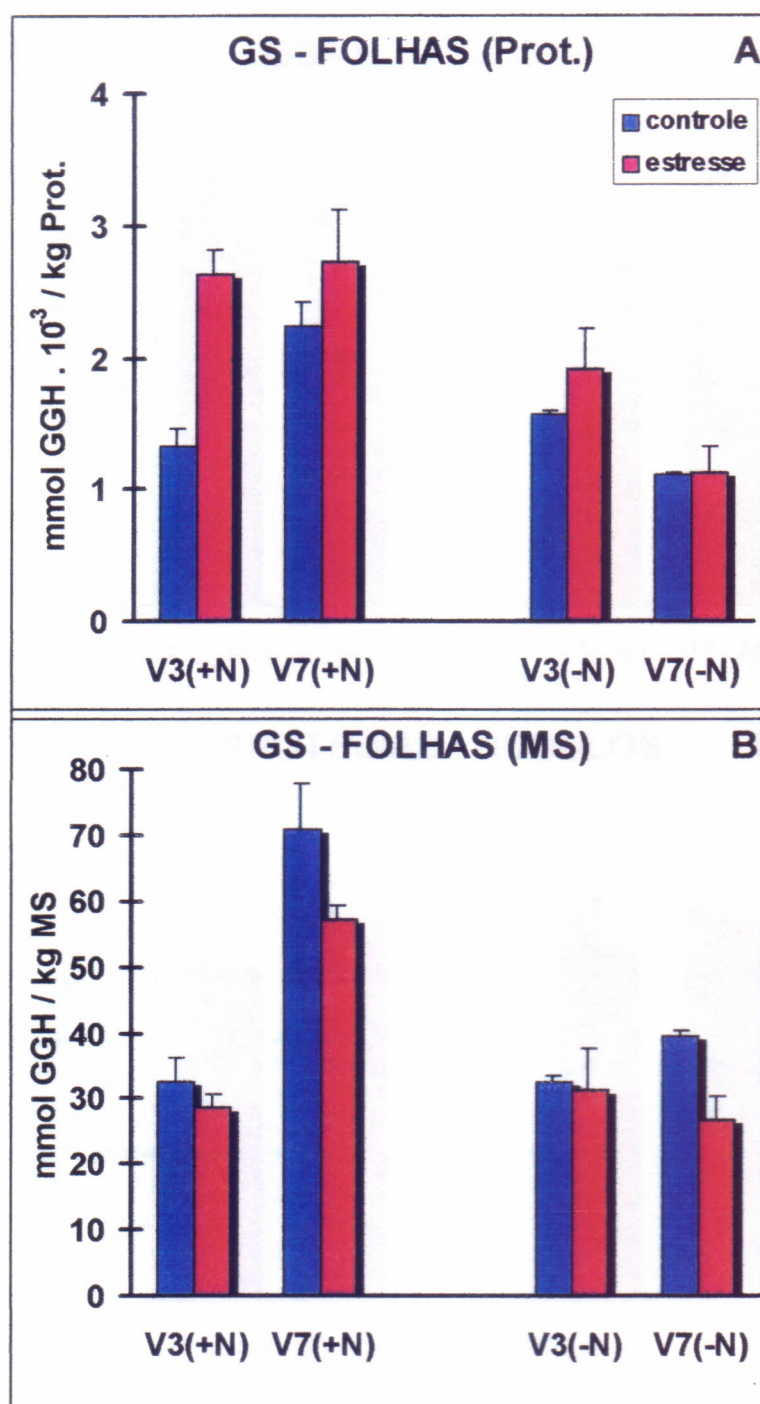


Figura 38. Atividade de glutamina sintetase, na base de proteínas (A) e na base de massa seca (B) em folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

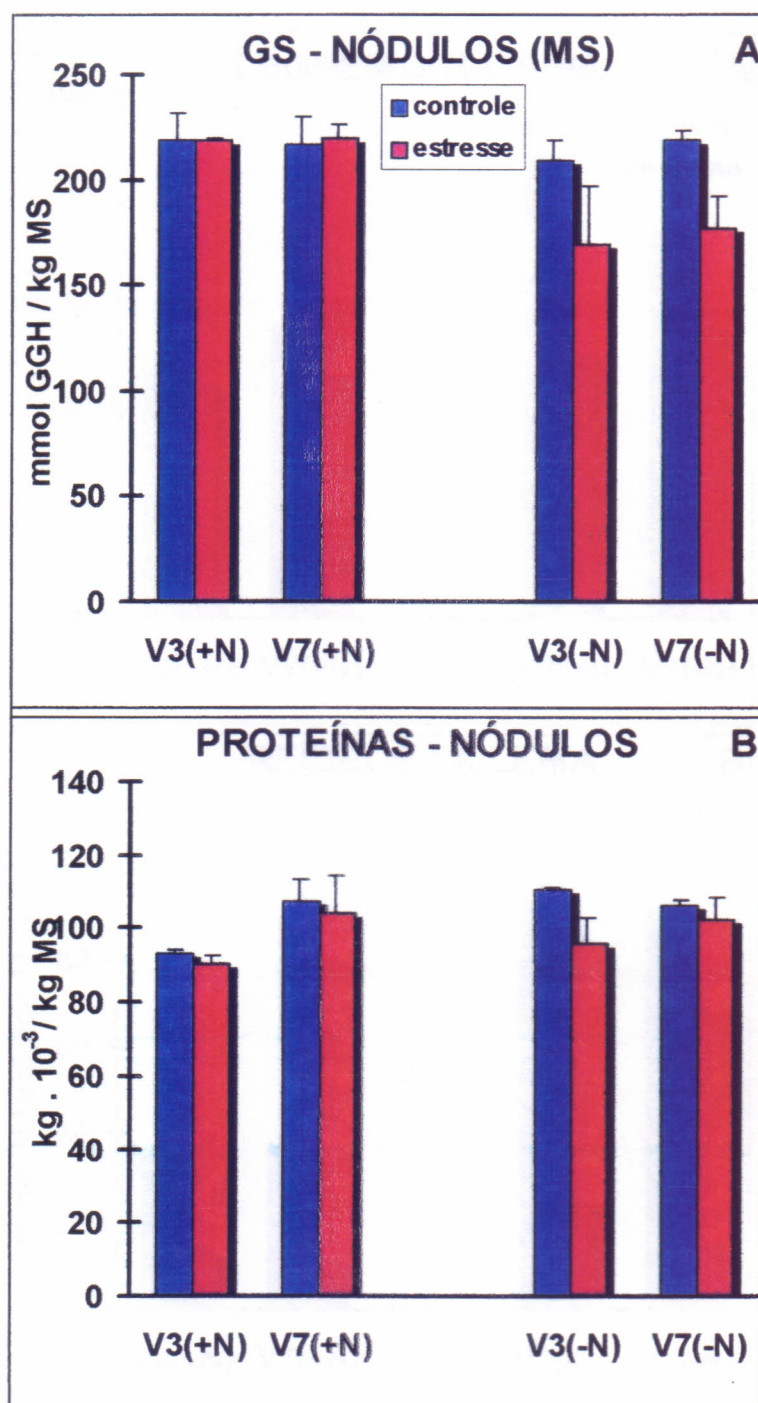


Figura 39. Atividade de glutamina sintetase (GS), em relação à massa seca (A) e proteínas solúveis totais (B) de nódulos de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

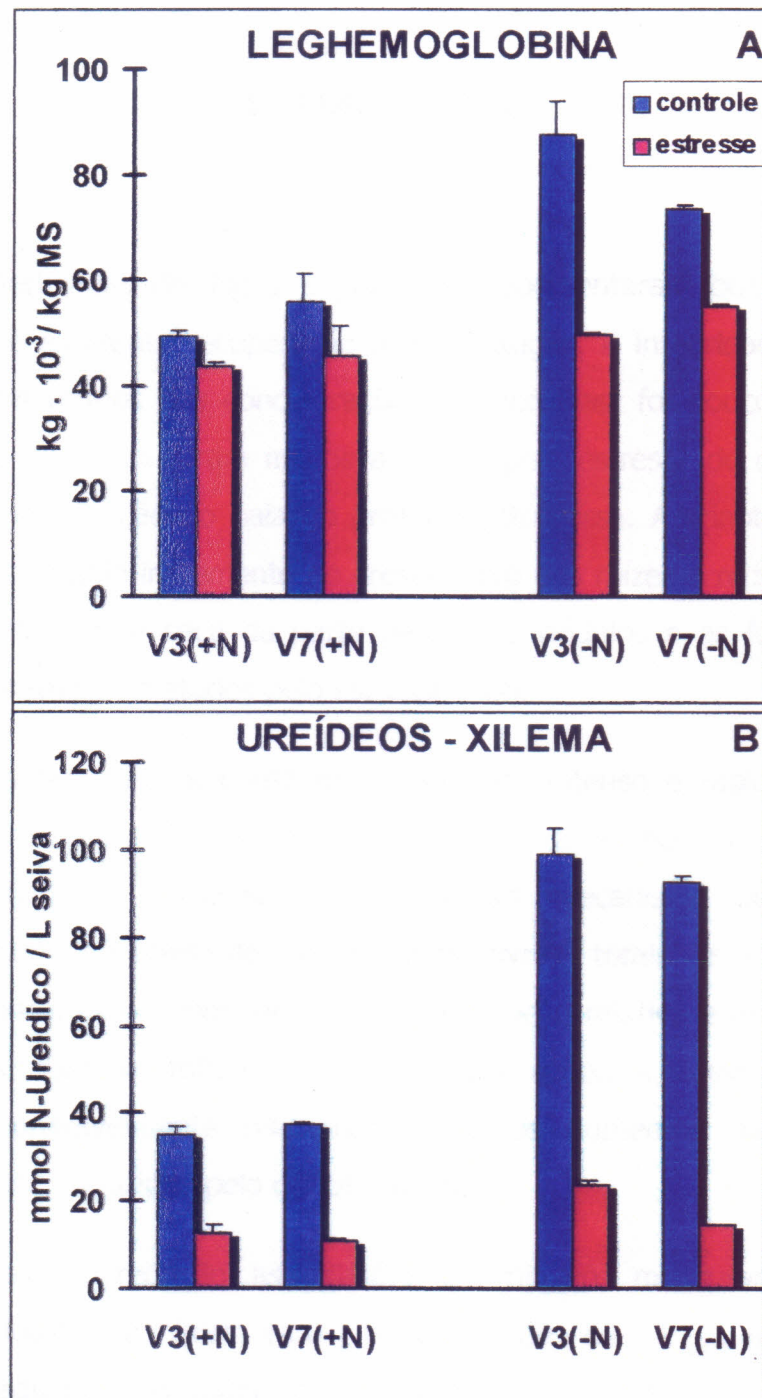


Figura 40. Concentração de leghemoglobina dos nódulos (A) e ureídeos da seiva do xilema (B) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 (V3) e Vita 7 (V7), noduladas na presença (+N) e na ausência (-N) de 5 mM de NO_3^- , submetidas à desidratação progressiva (seca) durante 3 dias consecutivos e de plantas irrigadas diariamente (controle). As barras representam o desvio padrão.

5 - CONCLUSÕES

Plantas noduladas de *Vigna unguiculata* apresentaram boa adaptação ao déficit de água e excelente recuperação à rehidratação. A integridade do aparelho fotossintético, em termos das concentrações de clorofilas, foi pouco alterada pelo estresse hídrico. As folhas foram menos afetadas pelo estresse do que os nódulos em termos da manutenção do balanço proteínas/fitomassa. A adaptação ao déficit hídrico foi mostrada pelo incremento no crescimento das raízes e reduções drásticas na acumulação de massa seca da parte aérea. Os nódulos e as folhas foram as partes mais severamente afetados pelo estresse hídrico.

As plantas de feijão-de-corda mostraram um intenso e rápido acúmulo de prolina livre, particularmente nas raízes, em resposta às pequenas reduções na disponibilidade hídrica, provavelmente como um mecanismo de ajustamento osmótico. As concentrações de aminoácidos livres totais e ureídeos foram aumentadas intensamente, enquanto que a composição relativa e as concentrações dos aminoácidos totais nas folhas não sofreram alterações. A biossíntese de prolina nas folhas foi provavelmente relacionada com os aumentos na atividade de glutamina sintetase, induzidos pelo déficit hídrico.

O processo de redução assimilatória de nitrato, mensurado através da atividade de redutase de nitrato (aRN) e acumulação de nitrato nos tecidos, foi drasticamente reduzido nas folhas por efeito do estresse hídrico. Entretanto, as plantas estressadas exibiram uma recuperação intensa na aRN, decorridas 24 horas após a rehidratação. Ao contrário, aRN nos nódulos não foi afetada pelo estresse, sugerindo o predomínio de RN do tipo constitutiva nesses tecidos, em relação ao tipo induzível pelo nitrato, predominante nas folhas.

O processo de fixação simbiótica de N_2 , avaliado a partir do crescimento dos nódulos, atividade de glutamina sintetase, concentração de leghemoglobina e de ureídeos na seiva do xilema, também foi intensamente reduzido pelo déficit hídrico.

O decaimento assim como a recuperação desse processo foi mais lento que o da aRN nas folhas, reforçando a idéia de que os nódulos foram mais profundamente alterados que as folhas em termos de integridade das proteínas, quando as plantas noduladas foram submetidas ao estresse hídrico.

As cultivares Vita 3 e Vita 7, quando noduladas na presença de 5 mM de NO_3^- , apresentaram a mesma intensidade de crescimento e distribuição da fitomassa. O estresse hídrico provocou reduções mais acentuadas no acúmulo de massa seca das folhas da cultivar Vita 3. Por outro lado, Vita 7 apresentou maior crescimento nas raízes, nessas condições. Essa última cultivar exibiu maior concentração de prolina livre nas raízes enquanto que Vita 3 mostrou maior acumulação desse aminoácido nas folhas, evidenciando diferentes estratégias de ajustamento osmótico entre as duas cultivares submetidas ao estresse hídrico.

A cultivar Vita 3, quando nodulada na ausência de nitrato, apresentou maior produção de fitomassa total, em relação à Vita 7. Entretanto, a primeira cultivar foi mais sensível ao déficit hídrico. A maior sensibilidade de Vita 3, nessas condições, foi inferida a partir das drásticas alterações na morfologia das folhas, as quais apresentaram um aumento intenso no tamanho médio dos folíolos, em relação a essa mesma cultivar nodulada na presença de nitrato.

A maior sensibilidade de Vita 3, nodulada na ausência de nitrato, foi ainda inferida a partir de decréscimos na acumulação de prolina nas folhas. Por outro lado, Vita 7 mostrou intensa redução no acúmulo de prolina principalmente nas raízes, em relação às plantas noduladas na presença de nitrato, quando ambas foram submetidas ao déficit hídrico. As duas cultivares mostraram semelhantes aumentos nas concentrações de ureídeos no caule por efeito desse tratamento.

Na presença de 5 mM de NO_3^- as cultivares Vita 3 e Vita 7 apresentaram semelhanças na assimilação de nitrato (aRN e acúmulo de nitrato) e nos parâmetros relacionados com a fixação de N_2 (concentração de leghemoglobina, atividade de glutamina sintetase nos nódulos e concentração de ureídeos na seiva do xilema),

tanto na condição normal como na presença de déficit hídrico. A atividade específica de glutamina sintetase nas folhas foi ligeiramente aumentada pelo estresse hídrico nas duas cultivares.

A cultivar Vita 3, nodulada na ausência de nitrato, apresentou maior fixação simbiótica de N_2 , em relação à presença de nitrato e também em relação à Vita 7 nodulada na ausência de nitrato. A maior fixação foi relacionada com um maior crescimento nos nódulos, maior concentração de leghemoglobina e maiores fluxos de ureídeos na seiva do xilema. O estresse afetou de maneira semelhante as duas cultivares em termos desses parâmetros relacionados com a fixação de N_2 .

Os resultados mostraram que os dois processos de assimilação de N (redução assimilatória de NO_3^- e fixação e assimilação de N_2) foram intensamente sensíveis ao déficit de água, sendo que a recuperação na atividade dos nódulos foi mais lenta do que a das folhas, provavelmente devido a maior degradação de proteínas. As plantas de feijão-de-corda mostraram capacidade de ajustamento osmótico através da acumulação de prolina, principalmente nas raízes. A presença de nitrato favoreceu a adaptação das plantas noduladas ao déficit hídrico.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROL, Y.P. & NAIR, T.V.R. (1978). **Nitrogen Assimilation and Crop Productivity**. Association Publishing Company, New Delhi.
- ABROL, Y.P. (1990). **Nitrogen in Higher Plants**. Research Studies Press Lda., Tourton, Somerset, England and John Wiley & Sons Inc. New York-USA.
- ABROL, Y.P.; SAWHNEY, S.K. & NAIK, M.S. (1983). Light and dark assimilation of nitrate in plants. **Plant Cell Environment 6**: 595-599.
- AKTINS, C.A. (1984). Efficiencies and inefficiencies in the legume. *Rhizobium* symbiosis – A review. **Plant and Soil 82**: 273-284.
- ANIKIEV, V.V. & KURAMAGOMEDOV, M. K. (1975). Activity of nitrate reductase in leaves of barley shoots at different levels of soil moisture. **Soviety Plant Physiology 22**: 293-297.
- ANTONIW, L.D. & SPRENT, J. I. (1978). Primary metabolites of *Phaseolus vulgaris* nodules. **Phytochemistry 17**: 675-678.
- APARICO-TEJO, P. M.; SÁNCHEZ-DIAZ, M.F. & PEÑA, J. I. (1980). Nitrogen fixation, stomatal response and transpiration in *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *T. subterraneum* under water stress and recovery. **Physiologia Plantarum 48**: 1-4.
- APPLEBY, C.A. (1984). Leghemoglobin and Rhizobium respiration. **Annual Review Plant Physiology 35**: 443-478.
- APPLEBY, C.A. ; DENNIS, E.S. & PEACOCK, W.J. (1990). A primaeval origin for plant and animal haemoglobin ? **Australian Journal Systematic Botany 3**: 81-90.
- APPLEBY, C.A.; BLUMBERG, E.; PEISACH, J.; WITTENBERG, B.A & WITTENBERG, J.B. (1976). Leghemoglobin. An electron paramagnetic resonance and optical spectral study of the free protein and its complexes with nicotinate and acetate. **Journal Biology Chemistry 251**: 6090-6096.
- ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. (1988). **O caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA. Brasília-DF, p.722.

- ARNON, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology** **24**: 1-15.
- ASLAM, M. & OAKS, A. & HUFFAKER, R.C. (1976). Effects of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. **Plant Physiology** **58**: 588-591.
- ASLAM, M. & OAKS, A. (1976). Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. **Plant Physiology** **57**: 572-576.
- ASPINALL D. & PALEG, L.G. (1981). Proline accumulation: Physiological aspects. **In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.)**, pp. 206-240. Academic Press, New York.
- BALASUBRAMANIAN, V. RAJAGOPAL, V. & SINHA, S.K. (1974). Stability of nitrate reductase under moisture and salt stress in some crops. Breeding Researches In Asia and Oceania. **Indian Journal Genetic** **34 A**: 1055-1061.
- BARBOSA, N.M. & MEIRELLES, N.C. (1994). Purificação de leghemoglobina de mucuna preta (*Stylobium aterrimum*). Separação e quantificação dos componentes nos diferentes estágios de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, 17 (2)** : 183-188.
- BARDZIK, J.M.; MARSH, H.V.J. & HAVIS, J. R. (1971). Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. **Plant Physiology** **47**: 828-831.
- BARNEIX, A.J.; JAMES, D.M.; WATSON, E.F. & HEWITT, E.J. (1984). Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Sonja). **Planta** **162**: 469-476.
- BARNETT, N.M. & NAYLOR, A. W. (1966). Amino acid and protein synthesis in *Bermuda grass* during water stress. **Plant Physiology** **41**: 1222-1230.
- BAR-NUN, N. & POLJAKOFF-MAYBER, A. (1977). Salinity stress and the content of proline in roots of *Pisum sativum* and *Tamarix tetragyna*. **Annual Botany** **41**: 173-179.
- BATES, L. S., WALDREN, R. P. & TEARE I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. **Short Communication. Plant and Soil.** **39**: 205-207.

- BECANA, M. & KLUCAS, R. (1992). Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. A review. **Plant Physiology** **98**: 1217-1221.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. (1983). Uptake and reduction of nitrate: Bacteria and higher plants. **In: INORGANIC PLANT NUTRITION (LÄUCHLI, A. & BIELESKI, R.L. eds.)**, p.p. 351-375. Encyclopedia of Plant Physiology, NS, Vol 15 A. Springer, Berlin.
- BEN-ZIONI, A.; ITAI, C. & VAADIA, Y. (1967). Water and salt stress, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. **Plant Physiology** **42**: 361-365.
- BERGENSEN, F.J. & TURNER, G.L. (1967). Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breir of soubean root nodules. **Biochemistry and Biophysic acta** **141**: 507-515.
- BERGENSEN, F.J. (1965). Ammonia an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodule. **Australia Journal Biology Science** **18**: 1-19.
- BERGENSEN, F.J. (1974). Developments of root nodule symbiosis. Formation and function of bacteroids **In: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION (QUISPEL, A., ed.)**. pp.473-498. North-Holland, Amsterdam.
- BETHLENGALVAY, G.J.; NORRIS, R.F. & PHILLIPS, D.A. (1978). Interactions between symbiotic nitrogen fixation, combined N application, and photosynthesis in *Pisun sativum*. **Physiologia Platarum** **42**: 119-123.
- BETHLENGALVAY, G.J.; NORRIS, R.F. & PHILLIPS, D.A. (1979). Effect of benlazon, a hill reaction inhibitor, on symbiotic nitrogen-fixing capability and apparent photosynthesis. **Plant Physiology** **63**: 213-215.
- BEWLEY, J. D. (1981). Protein Synthesis. **In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.)**, pp. 261-281. Academic Press, New York.
- BOGGESE, S.F. & STEWART, C. R. (1976). Contribution of arginine to proline accumulation in water stressed barley leaves. **Plant Physiology** **58**: 796-797.
- BOGGESE, S.F. & STEWART, C. R. (1980). The relationship between water stress induced proline accumulation and inhibition of protein synthesis in tobacco leaves. **Plant Science Lettler** **17**: 245-252.

- BOGGESE, S.F.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1976 a). Stress metabolism, IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. **Australian Journal Plant Physiology** **3**: 513-525.
- BOGGESE, S.F.; STEWART, C. R.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1976 b). Effects of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. **Plant Physiology** **58**: 398-401.
- BOGUSZ, D.; APPLEBY, C.A. ; LANDSMANN, J.; DENNIS, E.S.; TRINICK, M.J. & PEACOCK, W.J. (1988). Function haemoglobin genes in non-nodulation plants. **Nature** **331**: 178-180.
- BOLLAND, M.J.; FARNDEN, K.J.F. & ROBERTSON J.G. (1980). Ammonia assimilation in nitrogen fixing legume nodules. In: **NITROGEN FIXATION VOL.VII (NEWTON, W.E. & ORME-JOHNSON, W.H. eds.)**.pp.33-52. University Park Press, Beltemore.
- BRADFORD, K. J. & HSIAO, T.C. (1982). Physiological responses to moderate water stress. In: **PHYSIOLOGICAL PLANT ECOLOGY II, WATER RELATIONS AND CARBON ASSIMILATION (LANGE, O . L. NOBEL, P.S., OSMOND, C. B. & ZIEGLER, H., eds.)**, pp. 263-324. Springer-Verlag, New York.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry** **722**: 248-254.
- BRAY, E. A. (1993). Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology** **103**: 1035-1040.
- BRAY, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science** **2**: 48-54.
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. (1980). Nutritional value of legumes crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A. H. (eds.). **Advances in Legume Science** **1(3)**: 135-155.
- BROWN, L.M. & HELLEBUST, J. A. (1978). Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga, *Stichococcus bacillaris*. **Canada Journal of Botany** **56**: 676-679.

- BUNCE, J. A. (1988). Nonstomatal inhibition of photosynthesis by water stress. Reduction in photosynthesis at high transpiration rate without stomatal closure in field grown tomato. **Photosynthesis Research** **18**: 357-362.
- BUSHBY, H.V. & MARSHALL, K.C. (1977). Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and their protection by montmorillonite. **Journal of Genetic Microbiology** **99**: 19-27.
- BUTZ, R.G. & JACKSON, W.A. (1977). A mechanism for nitrate transport and reduction. **Phytochemistry** **16**: 409-417.
- CAMPBELL, W.H. & REMMLER, J.L. (1986). Regulation of corn leaf nitrate reductase. I. Immunochemical methods for analysis of the enzyme's protein component. **Plant Physiology** **80**: 435-441.
- CANCIAN, A.J. (1978). **Estudo dos Componentes Prevenção e Tolerância à Seca em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. CV. "Seridó" e *Phaseolus vulgaris* (L.) CV. "Rico-23"**. Viçosa, UFV. 35 p. Tese de Mestrado.
- CABA, J.M.; HERVAS, A.; LLUCH, C. & LEGERO, F. (1990). Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. **Physiologia Plantarum** **79**: 531-539.
- CABA, J.M.; LLUCH, C. & LEGERO, F. (1994). Variability in symbiotic performance of *Vicia faba* genotypes. **Soil Science (Trends in Agrícola Science)** **2**: 37-43.
- CABA, J.M.; LLUCH, C. & LEGERO, F. (1995). Distribution of nitrate reductase in *Vicia faba*: Effects of nitrate and plant genotype. **Physiologia Plantarum** **93**: 667-672.
- CARPITA, N. C. (1992). Growth and Development. **In: Plant Physiology (SALISBURY, F.B. & ROSS, C. W., eds.)**, pp. 329-356. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.
- CARVALHO, M.H.C.; LAFFRAY, D. & LOUGUET, D. (1998). Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. **Environmental and Experimental Botany** **40(3)**: 197-207.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E. & YUGS, V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commum Soil Science and Plant Analysis** **6(1)**: 71-80.

- CHANTAROTWONG, W.; HUFFAKER, R.C.; MILLER, B.L. & GRANSTEDT, R.C. (1976). In vivo nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content and in vitro nitrate reductase activity in intact barley seedlings. **Plant Physiology** **57**: 519-522.
- CHING, T.M.; HEDTKE, S. ROSSEL, S.A. & EVANS, H. (1975). Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-grown plants. **Plant Physiology** **55**: 796-798.
- CHU, T. M.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1974). Stress metabolism. VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. **Australian Journal Plant Physiology** **1**: 87-97.
- CHU, T. M.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1976 a). Stress metabolism. VII. Salinity and proline accumulation in barley. **Australian Journal Plant Physiology** **3**: 219-228.
- CHU, T. M.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1976 b). Stress metabolism. VIII. Specific ion effects on proline accumulation in barley. **Australian Journal Plant Physiology** **3**: 503-511.
- COOMBS, J. & HALL, D.O. (1982). Techniques in Bioproductivity & Photosynthesis. **Pergamon Press**. New York. 171 p.
- CORNISH, K. & ZEEVAART, J. A . D. (1985). Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in *Xanthium strumarium* L. **Plant Physiology** **78**: 623-626.
- CORUZZI, G.M. (1991). A gene network controlling glutamine and asparagine biosynthesis in plants. **Plant Journal** **1**: 275-280.
- COSTA, R.C.L. da (1986). Efeito de Níveis de Água e de Doses de Nitrogênio Sobre o Crescimento, Morfologia, Partição de Assimilados e Troca de CO₂ em *Phaseolus vulgaris* L. Tese de Mestrado. UFV, Viçosa-MG. 90 p.
- COSTA, R.C.L. da; LOPES, N.F. & OLIVA, M.A. (1991). Crescimento, morfologia, partição de assimilados e produção de matéria seca em *Phaseolus vulgaris* L. submetido a três níveis de nitrogênio e dois regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, **23(12)**: 1371-1379.

- COSTA, R.C.L. da; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A. & BARROS, N.F. (1988). Efeito da água e do nitrogênio sobre a fotossíntese, respiração e resistência estomática em *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 23(12):** 1371-1379.
- COSTA, R.C.L. da; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A. & BARROS, N.F. (1989). Crescimento e conversão da energia solar em feijão submetido a três doses de nitrogênio e dois regimes hídricos. **Agropecuária Brasileira, Brasília, 24(12):** 1439-1450.
- CRAFTS-BRANDNER, S.J.; BELOW, F.E.; HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. (1983). Metabolism of carbon and nitrogen by soybean seedlings in response to vegetative apex removal. **Plant Physiology 73:** 6-10.
- CRAMER, G.R.; LAÜCHLI, A. & POLITO, V.S. (1985). Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of roots cells. A primary response to salt stress ? **Plant Physiology 79:** 207-211.
- CRAWFORD, N.M.; SMITH, M.; BELLISSIMO, D. & DAVIS, R.W. (1988). Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 85:** 5006-5010.
- CRISWELL, J.G.; HAVELKA, U.D.; QUEBEDAUX, B. & HARDY, R.W.F.(1977). Effects of rhizosphere pO_2 on nitrogen fixation by excised and intact nodulated soybean roots. **Crop Science 17:** 34-44.
- CUNHA, C. O .(1997). **Cultura do Feijoeiro : Microbiologia, Biologia Molecular e Taxonomia de Bactérias. Tese de Doutorado.** Faculdade de Agronomia de Lueven, Belgica. p.117, 1997.
- CUTLER, J.M.; RAINS, D.W. & LOOMIS, R.S. (1977). The importance of cell size in the water relations of plants. **Physiology Plantarum 40:** 255-260.
- DAKORA, F.D. (1995). A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of two proteins in legume root nodules. **Annals of Botany Company 75:** 49-54.
- DAKORA, F.D. (1998). Nodule function in symbiotic bambara groundnut (*Vigna subterrânea* L.) and kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) is tolerant of nitrate in the roots medium. **Annals of Botany Company 82(5):** 687-690.

- DALLING, M.J. & LOYN, R.H. (1977). Level of activity of nitrate reductase at the seedling stage, as a predictor of grain nitrogen yield in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal Agricultural Resersh 28**: 1-4.
- DALTON, H. (1980). The Cultivation of Diazotrophic Microorganism. **In: BERGERSEN F.J. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**. New York, John Wiley & Sons.
- DECKARD, E.L.; LAMBERT, R.J. & HAGEMAN, R.H. (1973). Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yelds of grain and grain protein. **Crop Science 13**: 343-350.
- DENISON, R.F.; WITTY, J.F. & MINCHIN, F.R. (1992). Reversible O₂ inhibition of nitrogenase activity in attached soybean nodules. **Plant Physiology 100**: 1863-1868.
- DRY, I.B.; BRYCE, H.J. & WISKICH, J.J. (1986). Regulation of mitochondrial respiration. **In: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS, VOL.IX (STUMPF, P.K. & CONN, E.E. eds.)**. Academic Press, London.
- DUKE, S.H. & DUKE, S.O. (1984). Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants. **Plant Physiology 62**: 485-493.
- DURANT, J.L.; SHEEHY, J.E.; MINCHIN, F.R. (1987). Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. **Journal of Experimental Botany 38**: 311-321.
- ELLFOLK, N., (1972). Leghaemoglobin: a plant haemoglobin. **Endeavour 31**: 39-42.
- ENGEL, V.L. & POGGIANI, F. (1991). Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 3(1)**: 39-45.
- ENGIN, M. & SPRENT, J.I. (1973). Effects of water stress on growth and nitrogen fixing activity of *Trifolium repen*. **New Phytology 72**: 117-126.
- EVANS, G. (1977). The effects of continuous es flower and pod removal on growth and nitrogen fixation of cowpea (*Vigna unguiculata*(L) walp). **In: NEVES, M.C.P. INTERDEPENDÊNCIA FISIOLÓGICA ENTRE COMPONENTES DO SISTEMA SIMBIÓTICO RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS**. Revista Brasileira de Ciência do Solo 5: 79-92.

- FARNDEN, K.J.F. & ROBERTSON, J.G.(1980). Methods for Studying Enzymes Involved in Metabolism Related to Nitrogenase. In : BERGERSEN, F. J. eds. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation.** New York, John Wiley & Sons Ltda. pág 265-314 .
- FELLOWS, R.J.; PATTERSON, R.P.; RAPER, C.D. & HARRIS, D. (1987). Nodule activity and allocation of photosynthate of soybean during recovery from water stress. **Plant Physiology** **84**: 456-460.
- FERRARI, T.E.; YODER, O.C. & FILNER, P. (1973). Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. **Plant Physiology** **51**: 423-431.
- FERRARIO, S.; VALADIER, M. & FOYER, C.H.(1998). Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Phyology**, 117:293-302.
- FINN, G.A. & BRUN, W. A. (1980). Water stress effects on CO₂ assimilation, photosynthate partitioning, stomatal resistance, and nodule activity in soybean. **Crop Science** **20**: 431-434.
- FLEMING, A .; WITTENBERG, J.B.; WITTENBERG, B.A .; DUDMAM, W.F. & APPLEBY, C.A . (1987). The purification, characterization and ligant-binding kinetics of hemoglobins from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca-Frankia* symbiosis. **Biochemistry and Biophysic Acta** **911**: 209-220.
- FORDE, B.G. & CULLIMORE, J.V. (1989). The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. In: OXFORD SURVEYS OF PLANT MOLECULAR AND CELL BIOLOGY, VOL.5 (MIFLIN, B.J. ed.).p.p. 246-296. Oxford University Press, Oxford.
- FOYER, C.H.; VALADIER, M-H.; MIGGE, A. & BECKER, T.W. (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coodination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiology** **117**: 283-292.
- FRASER, H.L. (1942). The occurrence of endodermis in leguminonous root nodules and its effects upon nodule function. **Proc.R.Society Edinburgh Sect.B.** **61**: 328-343.

- FREIRE-FILHO, F.R.(1988). Origem, evolução e domesticação do caupi. **In :** ARAÚJO, J.P.P. de & WATT, E.E.(eds.) O caupi no Brasil.p.p. 27-46. Brasília: IITA/EMBRAPA.
- FREIRE-FILHO, F.R.; ARAÚJO, A.G.de & CARDOSO, J.C. (1982). *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Nomenclatura científica e nomes vulgares. **Resumo da I Reunião Nacional de Pesquisa do Caupi**. Goiânia:EMBRAPA, v.1, p. 43-44.
- FREIRE-FILHO, F.R.; RIBEIRO, V. Q. & BANDEIRA, L.M.R. (1997). **Cultivares de feijão caupi recomendadas para o plantio nas regiões Norte e Nordeste : ano agrícola 1996/1997**. Teresina: EMBRAPA-CPAMN.26 p.(EMBRAPA-CPAMN). Documentos, 22.
- FREIRE-FILHO, F.R.; SANTOS, A.A dos; ARAÚJO, A. G.; CARDOSO, M. J. ; RIBEIRO, V.Q.; SANTOS, M.L.B dos & MARTINS, R.P. (1983). **Vita-3 e vita-7, cultivares de feijão macassar para o Piauí**. Teresina:EMBRAPA-CPAMN, Comunicado Técnico nº 20 (12), pág.5.
- FUCHSMAN, W.H. & APPLEBY, C.A . (1979). Separation and determination of the relative concentrations of the homogenous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. **Biochemistry and Biophysic Acta 579:** 314-324.
- FUJIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. (1978). Effects of allopurinol (4-hydroseypyrazolo (3, 4 - d) pyrimidine) on the metabolism of allantoin in soybean plants. **Plant Physiology 62:** 134-138.
- GALLACHER, A.E. & SPRENT, J.I. (1978). The effect of different water regimes on growth and nodule development of greenhouse-grown *Vicia faba*. **Journal of Experimental Botany 29:** 413-423.
- GANDHI, A. P.; SAWHNEY, S.K. & NAIK, M.S. (1973). Activation of nitrate reductase from rice seedlings by NADH. **Biochemistry and Biophysic Res.Commun. 55:** 291-296.
- GOMES, M.M.A.G.; MAGALHÃES, A.M.; MACHADO, E.C. & FURLANI, P.R. (1997). Trocas gasosas e quantificação do ácido abscísico em duas cultivares de arroz de sequeiro submetido à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 9(3):** 177-183.

- GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J. & PRISCO, J.T. (1996). Effects of osmotic stress on growth and ribonuclease activity in *Vigna unguiculata* (L.) walp. Seedlings differing in stress tolerance. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 8(1):** 51-57.
- GORGOCENA, Y.; GORDON, A.J.; ESCUREDDO, P.R.; MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; MORAN, J.F. & BECANA, M. (1997). N₂ fixation, carbon metabolism and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plant **Plant Physiology 113:** 1193-1201.
- GÖRING, Von H.; DREIER, W. & HEINKE, F. (1977). Zytoplasmatische Osmoregulation durch Prolin bei Wuyln von *Zea Mays* L. **Biology Rundsch 15:** 377-380.
- GREENWAY, H. & LEAHY, M. (1972). Effects of rapidly and slowly permeating osmoticum on macromolecule and sucrose synthesis. **Journal of Experimental Botany 23:** 459-468.
- GUIMARÃES, C.M. (1988). Melhoramento e práticas culturais em caupi visando incrementar a resistência à seca. **In: O CAUPI NO BRASIL. (ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E., eds.)**. p.p. 285-302. EMBRAPA/CNPAF/Departamento de Publicações, Brasília-DF.
- GUERIN, V.; TRINCHANT, J.C. & RIGAUD, J. (1990). Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. **Plant Physiology 92:** 595-601.
- HABISH, H.A. & MAHDI, A.A. (1976). Effects of soil moisture on nodulation of cowpea and hyacinth bean. **Journal of Agricultural Science 86:** 553-560.
- HAGEMAN, R.H. & HUCKLESBY, D.P. (1971). Nitrate reductase from higher plants. **In: Methods in Enzymology, 17 A:** 491-503.
- HAGEMAN, R.H.; FLESHER, D. & GITTER, A. (1961). Diurnal variation and other light effects influencing the activity of nitrate reductase and nitrogen metabolism in corn. **Crop Science 1:** 201-204.
- HALLIDAY, J. & PATE, J.S. (1976). The acetylene reduction assay as a means of studying nitrogen-fixation in white clover under swards and laboratory conditions. **Journal Br.Grassed.Society 31:** 29-35.

- HANSON, A. D. & HITZ, W. D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review of Plant Physiology** **33**: 163- 203.
- HANWAY, J.J. & ENGLEHORN, A.J. (1958). Nitrate accumulation in some Iowa crop plants. **Agronomia Journal** **50**: 331-334.
- HARDY, R.W.F; CRISWELL, J.G. & HAVELKA, U. D. (1977). Investigations of possible limitations of nitrogen fixation by legumes. (1) methodology, (2) identification and (3) assessment of significance. **In: RECENT DEVELOPMENTS IN NITROGEN FIXATION (NEWTON, W. ed.)**. pp. 451-467. Academic Press, London.
- HARDY, R.W.F & HAVELKA, U.D. (1976). Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybean. **In: SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS (NUTMAN, P.S. ed.)**. IBP synthesis vol. 7, p.p. 421-439. Cambridge University Press, London.
- HARTUNG, W.; RADIN, J.W. & HENDRIX, D.L. (1988). Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. Role of apoplastic pH . **Plant Physiology** **86**: 908-913.
- HELLY, F.W. & OFER, I. (1972). Nodulation of frequencis of wild leguminous species in the Northern Negev region of Israel. **Australian Journal of Agriculture Reserach** **23**: 267-284.
- HERVAS, A.; LIGERO, F. & LLUCH, C. (1991). Nitrate reduction in pea plants: Effects of nitrate application and *Rhizobium* strains. **Soil Biology and Biochemistry** **23**: 695-699.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON. D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Univ. Calif. Berkeley Circ.** 347:139.
- HONG, T.D.; MINCHIN, F.R. & SUMMERFIELD, R.J. (1977). Recovery of nodulated cowpea plants (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) from waterlogging during vegetative growth. **Plant and soil** **48**: 661-672.
- HSIAO, T. C. (1973). Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology** **24**: 519 – 570.
- HSIAO, T.C. (1970). Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. **Plant Physiology** **46**: 281-285.

- HUANG, C.Y.; BOYER, J.S. & VENDERHOEF, L.N. (1975 a). Acetylene reduction (nitrogen fixation) and metabolic activities of soybean having various leaf and nodule water potentials. **Plant Physiology** **56**: 222-227.
- HUANG, C.Y.; BOYER, J.S. & VENDERHOEF, L.N. (1975 b). Limitation of acetylene reduction (nitrogen fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials. **Plant Physiology** **56**: 228-232.
- HUFFAKER, R.C.; RADIN, T.; KLEINKOPF, G.E. & COX, E.L. (1970). Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. **Crop Science** **10**: 471-474.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. (1986). Efeito da manipulação de fotossintetatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **21(1)**: 9-24.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J. & DÖBEREINER, J. (1985). Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **20(10)**: 1143-1156.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.; SUHET, A.A.R.; PERES, J.R.R. & MENDES, I.C. (1994). Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio. **In: MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA. (HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S. (eds.)).** p.p. 285-334. Embrapa, Brasília, Brasil
- HYLDIG-NIELSEN, J.J.; JENSEN, E. O .; PALUDAN, K.; WIBORG, O .; GARRET, R. JORGENSEN, P. & MARCKER, K.A . (1982). The primary structures of two leghemoglobin genes from soybean. **Nucleic Acids Research** **10**: 689-701.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Departamento de Agropecuária. **Relatório Anual**, 1995.
- INGRAM, J. & BARTELS, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **47**: 377-403.
- IRIGOYEN, J.J.; EMERICH, D.W. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M.(1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. **Physiologia Plantarum** **84**: 55-60.

- JACKSON, M.B. (1985). Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology** **36**: 145-174.
- JOLLY, S.O. & TOLBERT, N.E. (1978). NADH-nitrate reductase inhibitor from soybean leaves. **Plant Physiology** **62**: 197-203.
- JONES, M.M.; TURNER, N.C. & OSMOND, C.B.(1981). Mechanisms of Drought Resistance. **In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.)**, pp. 15-35. Academic Press, New York.
- JONES, P.W. & MHUIMHNEACHÁIN, M.N.(1985). The activity and stability of wheat nitrate reductase in vitro. **Phytochemistry** **24**: 385-392.
- KADAM, S.S.; GANDHI, A. P.; SAWHNEY, S.K. & NAIK, M.S.(1974). Inhibitor of nitrate reductase in the roots of rice seedlings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH. **Biochemistry and Biophysic Acta** **350**: 162-170.
- KAISER, W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiology Plantarum** **71**: 142-149.
- KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; MAE,T. & OJIMA, K.(1991). A role for glutamine synthetase in remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiol.** **96**, 411-417.
- KEITHLEY, J.H. & NADLER, K.D. (1983). Protoporphyrin formation in *Rhizobium japonicum*. **Journal Bacteriology** **154**: 838-845.
- KEMBLE, A. R. & MacPHERSON, H.T. (1954). Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. **Biochemistry Journal** **58**: 46-49.
- KENNEDY, I.R.; PARKER, C.A. & KIDBY, D.K. (1966). The probable site of nitrogen fixation in root nodules of *Ornithopus sativus*. **Biochemistry and Biophysic acta** **130**: 517-519.
- KISHOR, P.B.K.; HONG, Z.; MIAO, G-H.; HU, C-A. & VERMA, S.P.S. (1995). Overexpression of Δ^1 - pyrroline - 5 - carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology** **108**: 1387-1394.

- KEINHOF, A. & WARNER, R.L. (1990). Advances in nitrate assimilation. **In: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS, VOL. 16 (MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. eds.)**.p.p. 89-120. Academic Press, San Diego.
- KEINHOF, A.; KUO, T. & WARNER, R.L. (1980). Characterization of nitrate reductase deficient barley mutants. **Molecular Gen.Genétic 177**: 421-425.
- KLUCAS, R.V. & EVANS, H.J. (1968). An electron donor system for nitrogenase dependent acetylene reduction by extracts of soybean nodules. **Plant Physiology 43**: 1458-1460.
- KLUCAS, R.V. & APPLEBY, C.A .(1991). Nicotinate, nicotinamide and the reactivity of leghemoglobin in soybean root nodules. **Plant Physiology 95** : 551-555.
- KLUCAS, R.V. & BURRIS, R.H. (1966). Locus of nitrogen fixation in soybean nodules . Fixation by crushed nodules. **Biquemistry and Biophysic acta 136**: 399-401.
- KORTT, A . A .; BURNS, J.E.; TRINICK, M.J. & APPLEBY, C.A .(1985). The amino acid sequence of hemoglobin I from *Parasponia andersonii*, a non-leguminous plant. **FEBS Lett. 180**: 55-60.
- KOW, Y.W.; ERBES, D.L. & GIBBS, M. (1982). Chloroplast respiration. A means of supplying oxidized pyridine nucleotide for dark chloroplastic metabolism. **Plant Physiology 69**: 422-447.
- KRETOVICH, W.L.; ROMANOV, V.I.; YASHKOVA, L. A.; SHANKO, V.I. & FEDULOVA, N.G. (1977). Nitrogen fixation and poli-B-hydroxybutyric acid content in bacteroids of *Rhizobium lupin* and *Rhizobium leguminosarum*. **Plant Physiology 48**: 291-302.
- KRIEDMANN, P.E. & LOVEYS, B. R. (1974). Hormonal mediation of plant responses to environmental stress. **In: MECHANISMS OF REGULATION OF PLANT GROWTH. (BIELESKI, R.L.; FERGUSON, A .R. AND CRESWELL, M. M. eds.)**, pp.461-465. The Royal Society of New Zealand, Wellington.
- LAEMMLI, U. K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄, **Nature**, 227:689-695.
- LAW, R. J. & BRUN, W. A. (1974). Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. **Crop Science 14**: 11-16.

- LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. (1993). **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England.
- LEA, P.J. (1991). The inhibition of ammonia assimilation: a mechanism of herbicide action. In: HERBICIDES (BAKER, N.R. & PERCIVAL, M.P. eds.), p.p. 267-298. Elsevier, Amsterdam.
- LEA, P.J. (1993). Nitrogen Metabolism. In: PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. eds.) pp. 155-180. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England.
- LEA, P.J. (1997). Primary Nitrogen Metabolism. In: PLANT BIOCHEMISTRY (DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. eds.), pp. 273-306. Academic Press, San Diego, California-USA.
- LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D. & AZEVEDO, R.A. (1992). Analysis of barley metabolism using mutant genes. In: BARLEY : GENETICS, BIOCHEMISTRY, MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (SHEWRY, P.R. ed.). p.p. 180-207, CAB International, Wallingford.
- LEA, P.J.; ROBINSON, S.A. & STEWART, G.R. (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS, VOL16 ((MIFLIN, B.J. AND LEA, P.J.).pp.121-159. Academic Press, San Diego.
- LEE, J.S.; BROWN, G.G. & VERMA, D.P.S. (1983). The primary structures of leghemoglobin genes from soybean. **Nucleic Acids Research** **11**: 5541-5553.
- LEECH, R.M. & MURPHY, D.L. (1976). The cooperative function of chloroplasts in the biosynthesis of small molecules. In: THE INTACT CHLOROPLAST (BARBER, J. ed.).p.p. 365-401. Elsevier, Amsterdam.
- LEEGOOD, R.C. (1993). Carbon dioxide-concentrating mechanism. In: PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. eds.). p.p. 47-72. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
- LEEGOOD, R.C. (1993). The calvin cycle and photorespiration. In: PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. eds.). p.p. 27-45. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
- LEONG, C.C. & SHEN, T.C.(1982). Occurrence of nitrate reductase inhibitor in rice plants. **Plant Physiology** **70**: 1762-1763.

- LEVITT, J. (1980). **Responses of Plant to Environmental Stresses, Second Edition, Vols I and II.** Academic Press, New York and London
- LILLO, C. & HENRIKSEN, A. (1984). Comparative studies of diurnal variations of nitrate reductase activity in wheat, oat and barley. **Physiologia Plantarum** **62**: 89-94.
- MACKOWN, C.T.; JACKSON, W.A. & VOLK, R.J. (1983). Partition of previously accumulated nitrate to translocation, reduction and efflux in corn roots. **Planta** **157**: 8-14.
- MAGUE, T.H. & BURRIS, R.H. (1972). Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. **New Phytology** **71**: 275-286.
- MARÉCHAL, R.; MACHERPA, J.M. & STAINER, F. (1988). Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissira**. **28**: 273, 1978 apud FREIRE-FILHO.
- MARQUEZ, L. & MARIA, U. (1996). Preparo de amostras para análise de aminoácidos em proteínas alimentares. **Bol. SBCTA** **30**: 19-27.
- MARSCHNER, H. (1986). **Mineral Nutrition of Higher Plantas.** Academic Press. New York. 674 p.
- MARTIN, K.D.; SAARI, L.; GUANG-XIN, W.; WANG, T.; PARKHURST, L.S. & KLUCAS, R.V. (1990). Kinetics and thermodynamics of oxygen, CO and azite binding by subcomponents of soybean leghemoglobin. **Journal Biology Chemistry** **265**: 19588-19593.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. (1977 a). Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. **Plant Cell Physiology** **18** : 459-462.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. (1977 b). Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non nodulating soybean plants. **Plant Cell Physiology** **18** : 353-359.
- MATTAS, R.E. & PAULI, A.W. (1965). Trends in nitrate reduction and nitrogen fractions in young corn (*Zea mays* L.) plants during heat and moisture stress. **Crop Science** **5**: 181-184.

- McCREE, K.J. & RICHARDSON, S.G. (1987). Stomatal closure vs. Osmotic adjustment: A comparison of stress responses. **Crop Science 27**: 539-543.
- MEEKS, J.C.; WOLK, C.P.; SCHILLING, N. SHAFFER, P.W.; AVISSAR, Y. & CHIEN, W. (1978). Initial organic products of fixation of ($^{13}\text{N}_2$) dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). **Plant Physiology 61**: 980-983.
- MENGEL, K. & PILBEAM, D.J. (1991). **Nitrogen Metabolism in plants**. Oxford University Press, Oxford.
- MENGEL, K. (1992). Nitrogen Metabolism in plants. **In: NITROGEN METABOLISM IN PLANTS (MENGEL, K. & PILBEAM, D.J. eds.)**. pp.1-15. Clarendon Press, Oxford.
- MINCHIN, F.R. & PATE, J.S. (1973). The carbon balance of legume and the functional economy of its root nodules. **Journal of Experimental Botany 24**: 259-271.
- MINCHIN, F.R. & PATE, J.S. (1974). Diurnal functioning of the legume root nodule. **Journal Experimental of Botany 24**: 295-308.
- MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E. & WITTY, J.F. (1986). Further errors in the acetylene reduction assays: effects of plant disturbance. **Journal Experimental Botany 37**: 1581-1591.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & NEVES, M.C.P. (1980). Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cawpea (*Vigna unguiculata* L.) grown in an adverse temperature regime. **Journal of Experimental Botany 31**: 1327-1345.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H. & RAWSTHORNE, S. (1982). Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. **Plant Cell and Environment 4** : 5-26.
- MORGAN, A.A.; VOLK, R.J. & JACKSON, W.A. (1973). Simultaneous influx and efflux of nitrate during uptake by perennial rye grass. **Plant Physiology 51**: 267-272.
- MORGAN, J. M.(1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Plant Phisiology 35**: 299- 348.

- MORGAN, M.A.; JACKSON, W.A. & VOLK, R.J. (1985). Uptake and assimilation of nitrate by corn roots during and after induction of the nitrate uptake system. **Journal of Experimental Botany 36**: 859-869.
- MORILLA, C. A.; BOYER, J.S. & HAGEMAN, R.H. (1973). Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L.) having low leaf water potentials. **Plant Physiology 51**: 817-824.
- NAIK, M.S. & NICHOLAS, D.J.D. (1986). Malate metabolism and its relations to nitrate assimilation in plants. **Phytochemistry 25**: 571-576.
- NELSON, R.S.; RYAN, S.A. & HARPER, J.E. (1983). Soybean mutants lacking constitutive nitrate reductase activity. 1. Selection and initial characterization. **Plant Physiology 72**: 503-509.
- NELSON, R.S.; STREIT, L. & HARPER, J.E. (1986). Nitrate reductase from wild-type and nr₁ - mutant soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. 11. Partial activity, inhibitor and complementation analysis. **Plant Physiology 80**: 72-76.
- NEVES, M.C.P. (1981 a). Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium* Leguminosas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo 5**: 79-92.
- NEVES, M.C.P. (1989). Relação fonte/dreno em associações de *Rhizobium* com leguminosas de grão. **In: ANAIS DA II REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL (SILVEIRA, J.A.G.; VITORELLO, V.A.; MACHADO, E.C. & CARELLI, M. L. eds.)**. p.p.103-113. 1989. SBFV, USP, Campus de Piracicada-SP.
- NEVES, M.C.P.; MINCHIN, F.R. & SUMMERFIELD, R.J. (1981). Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) plants dependent nitrate-nitrogen or one or two strains of *Rhizobium*. **Tropical Agriculture. 58**: 115-132.
- NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. (1987). The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Critical Review in Plant Sciences 6**: 267-320.
- NG, N.Q. & MARÉCHAL, R. (1985). Cowpea taxonomy, origin and germplasm. **In: SING, R.S. & RACHIE, K. O.(eds.)**. **Cowpea Research, Production and Utilization**. Chichester: John Wiley. p.11-21.

- NG, N.Q.(1990). Recent developments in cowpea germplasm collection, conservation, evaluation and research at genetic resources Unit, IITA. **In: NG,N.Q.; MONTI, L. M. (eds.) Cowpea genetic Resources. Thailand: Amarin Printing Group Co. Ltd. Cap.2 p.p. 13-29.**
- NOBEL, P. S. (1992). Topics in Environmental Physiology. **In: Plant Physioly (SALISBURY, F.B. & ROSS, C. W., eds.),** pp. 551-574. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.
- OGHOGHORIE, C. G. O. & PATE, J.S. (1972). Exploration of the nitrogen transport system of nodulated legume using ¹⁵N. **Plant Soil 104:** 35-49.
- OLIVEIRA, J.P. & CARVALHO, A.M.(1988). A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmido e semi-árido do Brasil. **In: ARAÚJO. J.P.P.de & WATT, E.E.(eds.). O Caupi no Brasil.** p.p 63-69.Brasília: IITA/EMBRAPA.
- PALEG, L.G. & ASPINALL, D. (1981). **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants.** Academic Press, Sydney, Australia.
- PANKHURST, C.E. & SPRENT, J.I. (1975 a). Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. **Journal of Experimental Botany 26:** 287-304.
- PANKHURST, C.E. & SPRENT, J.I. (1975 b). Surface features of soybean root nodules. **Protoplasma 85:** 85-98.
- PASSIOURA, J.B. (1981). Water collection by roots. **In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.).** p.p. 39-53. Academic Press. New York.
- PATE, J.S. (1962). Root exudation studies on the exchange of ¹⁴C labelled organic substances between the roots and shoots of the nodulated legumes. **Plant Soil 17:** 333-356.
- PATE, J.S. (1971). Movement of nitrogenous solutes in plants. **In: N-15 IN SOIL-PLANT STUDIES.** P.p.165-187, I.A.E.A., Vienna.
- PATE, J.S. (1973). Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. **Soil Biology of Biochemistry 5:** 109-119.

- PATE, J.S. (1975). Exchange of solutes between phloem and xylem and circulation in the whole plant. In: TRANSPORT IN PLANTS: PART I . PHLOEM TRANSPORT (ZIMMERMANN, N.M. & MILBURN, T.A. eds.). p.p 451-473. Springer-Verlag, Berlin.
- PATE, J.S. (1976). Physiology of the reaction of nodulated legumes to environment. In: SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS (NUTMAN, P.S. ed.) p.p 355-360. Cambridge University Press, London.
- PATE, J.S. (1977). Functional biology of dinitrogen fixation by legumes. In: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION SECTION III(HARDY, R.W.F. & SILVER, N.S. eds.). p.p. 473-517. Wiley-Interscience, New York.
- PATE, J.S.; GUNNING, B.E.S. & BRIARTY, L.G. (1969). Ultrastruture and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. **Planta 85**: 11-34.
- PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; REAKASEM, B. & HERRIDGE, D.F.(1989). **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. 76 p.
- PETRUSA, L. M. & WINICOV, I. (1997). Proline status in salt-tolerance and salt-sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. **Plant Physiology and Biochemistry 35**: 303-310.
- PETTERSON, R.P.; RAPPER, C.D. & GROSS, H.D. (1979). Growth and specific nodule activity of soybean during application and recovery of leaf moisture stress. **Plant Physiology 64**: 551-556.
- PINTO, V. de P.T.(1998). Digestibilidade in vitro e in vivo das frações albumina e globulina de oito cultivares de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza-Ce, 89 p.
- PLADYS, D. & VANCE, C.P. (1993). Proteolysis during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. **Plant Physiology 103**: 379-384.
- RABE, E. (1993). Altered Nitrogen Metabolism Under Environmental Stress Conditions. In: Handbook of Plant and Crop Stress. Ed. Mohammad Passarakli, Marcel Dekker,(Inc,), New York.

- RADIN, J.W. & HENDRIX, D.L. (1988). The apoplastic pool of abscisic acid in cotton leaves in relation to stomatal closure. **Planta** **174**: 180-186.
- RAI, A . W. (1990). **A Handbook of Simbiotic *Cyanobacteria***. CRC Press, Boca Raton.
- RAJAGOPAL, V.; BALASUBRAMANIAN, V. & SINHA, S.K. (1977). Diurnal fluctuations in relative water content, nitrate reductase and proline content in water-stressed and non-stressed wheat. **Physiologia Plantarum** **40**: 69-71.
- RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. COOKSON, C. & COOBS, J. (1980). Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. **Phytochemistry** **19**: 341-355.
- REMMLER, J.L. & CAMPBELL, W.H. (1986). Regulation of corn leaf nitrate reductase. II. Synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein. **Plant Physiology** **80**: 442-447.
- ROBERTSON, J.G. & FARNDEN, K.J.F. (1980). Ultrastructure and Metabolism of the Developing Legume Root Nodule. **In: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS-VOL 5: AMINO ACIDS AND DERIVATIVES (MIFLIN, B.J., ED.; STAMPF, P.K., & CONN, E.E. EDS.IN-CHIEF)**. pp.65-113. Academic Press, New York.
- ROBERTSON, J.G. & TAYLOR, M.P. (1973). Acid and alkaline invertases in root and nodules of *Lupinus angustifolius* infected with *Rhizobium lupini*. **Plant and Soil** **112**: 1-6.
- RODRIGUES, J.L.M.; MELLOTO, M. & SILVEIRA, J.A.G. (1998). Nodulin activities, hydrogenase expression and nitrogen fixation in cowpea inoculated with Hup⁺ and Hup⁻ symbionts. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **10(2)**: 85-90.
- RODRIGUES, J.L.M.; MELLOTO, M.; OLIVEIRA, J.T.A. & SILVEIRA, J.A.G. (1999). Efficiency of soybean nodules In relation to nodulin activities and hydrogenase expression. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **10(3)**: "in press".
- ROLDAN, J.M.; VERBELEN, J.P.; BUTLER, W.L. & TOKUYASU, K.T. (1982). Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. **Plant Physiology** **70**: 872-874.
- ROUTLEY, D.G. (1966). Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. **Crop Science** **6** : 358-361.

- SAAB, I.N.; SHARP, R.E.; PRITCHARD, J. & VOETBERG, G.S. (1990). Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. **Plant Physiology** **93**: 1329-1336.
- SAKURAI, N. & KURAISHI, S. (1988). Water potential and mechanical properties of the cell wall of hypocotyls of dark-grown squash (*Cucurbita maxima* Duch.) under water-stress conditions. **Plant Cell Physiol.** **29(8)**: 1337-1343.
- SALISBURY, F.B. & MARINOS, N. G. (1985). The ecological role of plant growth substances. In: **ENCYCLOPEDIA OF PLANT PHYSIOLOGY, VOL. 11, HORMONAL REGULATION OF DEVELOPMENT , III : Role of Environmental Factors (PHARIS,R.P. AND REID, D.M. eds.)**,pp. 707-766, Springer-Verlag, New York.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. (1992). **Plant Physiology**. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.
- SANGWAN, I. & O'BRIAN, M.R. (1991). Evidence for a inter-organismic heme biosynthetic pathway in symbiotic soybean root nodules. **Science** **251**: 1220-1222.
- SCHRADER, L.E. & THOMAS, R.J. (1981). Nitrate uptake, reduction and transport in the whole plant. In: **NITROGEN AND CARBON METABISM (BEWLEY, J.D. ed.)**.p.p. 49-93. Nijhoff/Junk, The Hague.
- SCHUBERT, K. R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology** **37**: 539- 573.
- SCHUBERT, K.R. & BOLAND, M.J. (1990). The ureides. In: **THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS, VOL 16 (MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. eds.)**.p.p. 197-282. Academic Press, San Diego.
- SCHULZE, E. D. (1986). Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and soil. **Annual Review of Plant Physiology** **37**: 247- 274.
- SCOTT, D.J.; MAY, H.D.; NEWTON, W.E.; BRIGLE, K.E. & DEAN, D.R. (1990). Role for the nitrogenase MoFe protein α -subunit in FeMo-cofactor binding and catalysis. **Nature** **343**: 188-190.

- SELLS, G.D. & KOEPPE, D.E. (1980). Proline oxidation by water-stressed corn shoot mitochondria. **Plant Physiology** **65**: 25-31.
- SHACKEL, K.A. & HALL, A.E. (1979). Reversible leaflet movements in relation to drought adaptation of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Australian Journal of Plant Physiology** **6**: 265-276.
- SHARNER, D.L. & BOYER, J.S. (1976a). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. **Plant Physiol.** **58**: 499-504.
- SHARNER, D.L. & BOYER, J.S. (1976b). Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. **Plant Physiol.** **58**: 505-509.
- SHERRARD, J.H.; KENNEDY, J.A. & DALLING, M.J. (1979). In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves. II. Isolation of factors from crude extract which affect stability of highly purified nitrate reductase. **Plant Physiology** **64**: 439-444.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology** **115**: 327-334.
- SHOUSE, P. J. (1979). **Effect of Water Deficit on the Growth, Yield, and Water Use of Field-Growth Cowpea Crop**. Riverside, University of California. 220p. Tese Doutorado.
- SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; RUTH, T.J. & RUFTY, T.W. (1990). Studies on the uptake of nitrate in barley. **Plant Physiology** **93**: 1426-1432.
- SILVEIRA, J. A. G.(1993). Relações entre metabolismo de C e N: fixação não-fotossintética de CO₂ e assimilação de N inorgânico. In: **I Simpósio Brasileiro Sobre Nitrogênio em Plantas**, Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, p. 217-234.
- SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J.L.; RODRIGUES, J.L.M. & OLIVEIRA, J.T.A. (1998 b). Phosfoenolpyruvate Carboxylase and Glutamine Synthetase Activities in Relation to Nitrogen Fixation in Cowpea Nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **10(1)** : 19-23.
- SILVEIRA, J.A G.; CASTRO, P.R.C. & DECHEN, A R. (1989). Partição de Nitrogênio e distribuição da Matéria seca em três cultivares de caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **24(9)**:1153-1160.

- SILVEIRA, J.A.G. & CROCOMO, O.J. (1985). Assimilação de nitrogênio: Implicações energéticas. In: ANAIS DO III SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA (CROCOMO et al. (eds.). p.p. 265-295. USP-ESALQ-CEBTEC/FEALQ. Piracicaba-SP.
- SILVEIRA, J.A.G. & CROCOMO, O.J. (1989). Sintomas de deficiência de potássio induzidos pelo acúmulo de aminoácidos e amônia em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **13**: 329-334.
- SILVEIRA, J.A.G. & MACHADO, E.C.(1990). Mobilização de nitrogênio e de carboidratos durante o desenvolvimento de panículas de duas cultivares de arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **2(2)**: 37-46.
- SILVEIRA, J.A.G. (1985a). Assimilação de nitrogênio: Implicações energéticas. In: ANAIS DO III SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA (CROCOMO, O.J. et al. eds.).p.p.305-354. CEBTEC/FEALQ/USP, São Paulo.
- SILVEIRA, J.A.G. (1985b). Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar.Tese de Doutorado. USP/ESALQ.Piracicaba-SP. 150 p.
- SILVEIRA, J.A.G. (1987). Carbono e nitrogênio: partição e produtividade. In: ANAIS DO V SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA (CROCOMO, O.J. & SILVEIRA, J.A.G. eds.).p.p.305-354. CEBTEC/FEALQ/USP, São Paulo.
- SILVEIRA, J.A.G.; CONTADO, J.L.; RODRIGUES, J.L.M & OLIVEIRA, J.T.A. (1999a). Nodulin activities in relation to nodule development and nitrogen fixation in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Physiology and Molecular Biology Plants** **5** : (in press).
- SILVEIRA, J.A.G.; MATOS, J.C.S.; CECCATO, V.M.; SAMPAIO, A H. & COSTA, R.C.L. (1998a). Induction of reductase nitrate activity and nitrogen fixation in two Phaseolus species in relation to exogenous nitrate level. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, **4**: 181-188.
- SILVEIRA, J.A.G.; MELO, A.R.B. & VIÉGAS, R.A. (1999b). Salt-induced decrease on nitrate uptake and assimilation In cowpea plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **11(2)**: (in press).

- SINGH, T. N.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1973 d). Stress metabolism. IV. The influence of (2-chloroethyl)-trimethylammonium choride and gibberellic acid on the growth and proline accumulation of wheat plants during water stress. **Australian Journal Biology Science 26: 77-86.**
- SINGH, T. N.; ASPINALL, D.; PALEG, L.G. & BOGGESS, S.F. (1973 b). Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. **Australian Journal Biology Science 26: 57-63.**
- SINGH, T. N.; PALEG, L.G.; & ASPINALL, D. (1973 a). Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. **Australian Journal Biology Science 26: 45-56.**
- SINGH, T. N.; PALEG, L.G.; & ASPINALL, D. (1973 c). Stress metabolism. III. Variations in response to water deficit in the barley plant. **Australian Journal Biology Science 26: 65-76.**
- SINGH, T.N.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley : a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature* 236: 188-190.
- SINGH, U. & SINGH, B. (1992). Tropical grain legumes as important human foods. **Economic Botany. V 46**, p. 310-321.
- SINHA, S. K. & NICHOLAS, D. J. D.(1981). Nitrate Reductase. **In: THE PHYSIOLOGY E BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS. (PALEG, L. G. AND ASPINALL, D. ASPINALL, eds.)**.pp.145-169. Academic Press, Sydney.
- SINHA, S. K. & RAJAGOPAL, V. (1975). Proline slows down the loss of nitrate reductase in moisture stressed plants. **Plant Physiology (Supplyment) 56 : 2-22.**
- SINHA, S.K.; KHANNA-CHOPRA, R.; HATTERJEE, S. R. & ABROL, Y.P. (1978). Composition of bleeding sap in *Vigna radiata*. **Physiologia Plantarum 42: 45-48.**
- SLAVIK, B. (1974). Methods of studying plant water relations. New York, Springer-Verlag.449 p.

- SLAVIK, B. (1975). Water stress, photosynthesis and the use of photosynthates. **In: PHOTOSYNTHESIS AND PRODUCTIVITY IN DIFFERENT ENVIRONMENTS (COOPER, J.P. ed.)**. pp.511-536. London, Cambridge University Press.
- SMITH, B.E. (1990). Nitrogen Fixation. **In: NITROGEN FIXATION : ACHIEVEMENTS AND OBJECTIVES (GRESSHOFF, P. M.; ROTH, E.L.; STACEY, G. & NEWTON, W.E. eds.)**. pp. 3-13. Chapman & Hall, New York.
- SMITH, R.J. & GALLON, J.R. (1993). Nitrogen Fixation. **In: PLANT BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (LEA, P.J. & LEEGOOD, R.C. eds.)** pp. 129-153. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England.
- SOLOMONSON, L. P.; JETSCHMANN, K. & VENNESLAND, B. (1973). Reversible inactivation of the nitrate reductase of *Chlorella vulgaris Beijerinck*. **Biochemistry and Biophysic Acta 309: 32-43.**
- SOLOMONSON, L.P. & BARBER, M.J. (1989). Structure-function relationship of algal nitrate reductases. **In: MOLECULAR AND GENETICS ASPECTS OF NITRATE ASSIMILATION (WRAY, J.L. & KINGHORN, J.R. eds.)**. p.p. 88-100. Oxford University Press, Oxford.
- SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J.; HOWARD, W.D.; JOHNSON, J.L. & RAJAGOPALAN, K.V. (1984a). Electron paramagnetic resonance studies on the molybdenum center of assimilatory NADH: nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*. **Journal Biology Biochemistry 259: 849-853.**
- SOLOMONSON, L.P.; HOWARD, W.D.; YAMAYA, T. & OAKS, A. (1984b). Mode of action of natural inactivator proteins from corn and rice on a purified assimilatory nitrate reductase. **Arch Biochemistry and Biophysic 233: 469-474.**
- SOMERS, D.A.; KUO, T-M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. & OAKS, A. (1983). Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. **Plant Physiology 72: 949-952.**
- SPRENT, J. I. & SPRENT, P. (1990). **Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects**. Chapman & Hall, London.
- SPRENT, J.I. & GALLACHER, A. (1976). Anaerobiosis in soybean root nodules under water stress. **Soil Biology and Biochemistry 8: 317-320.**

- SPRENT, J.I. (1971). The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules. I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. **New Phytology** **70**: 9-17.
- SPRENT, J.I. (1972 a). The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules II. Effects on the fine structure of detached soybean nodules. **New Phytology** **71**: 443-450.
- SPRENT, J.I. (1972 b). The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules IV. Effects on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max*. **New Phytology** **71**: 603-611.
- SPRENT, J.I. (1976). Water deficits and nitrogen fixing root nodules. **In: WATER STRESS AND PLANT GROWTH (KOZLOWSKI, T.T. ed.)**. Vol. IV, p.p. 291-315. Academic Press. New York.
- SPRENT, J.I. (1980). Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some leguminosae. **Plant Cell environment** **3**: 35-43.
- SPRENT, J.I. (1981). Nitrogen fixation. **In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.)**, pp. 131-142. Academic Press. New York.
- STAMFORD, N.P.; VASCONCELOS, I. & ALMEIDA, R.T. (1988). Fixação biológica de nitrogênio em caupi na região nordeste brasileira. **In: OCAUPINO BRASIL (ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. eds.)** p.p. 475-504. EMBRAPA/CNPAF/Departamento de Publicações, Brasília-DF.
- STEELE, W.M. & MEHERA, K.L. (1980). Structure, evolution and adaptation to farming systems and environments in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, R. J. & BUTING, A.H.(eds.) **Advances in Legume Science**. London: Royal Botanical Gardens, V. 1, cap.7 p. 393-402.
- STEWART, G.R. & BOGGESE, S.F. (1977). The effect of wilting on the conversion of arginine, ornithine, and glutamate to proline in bean leaves. **Plant Science Letter** **8**: 147-153.
- STEWART, G.R. & BOGGESE, S.F. (1978). Metabolism of [5-³H]-proline by barley leaves and its use in measuring the effects of water stress on proline oxidation. **Plant Physiology** **61**: 654-657.

- STEWART, G.R. & LARHER. (1980). Accumulation of Amino Acids and Related Compounds in Relation to Environmental Stress. In: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS-VOL 5: AMINO ACIDS AND DERIVATIVES (MIFLIN, B.J., ED.; STAMPF, P.K., & CONN, E.E. EDS.IN-CHIEF). pp.609-630. Academic Press, New York.
- STEWART, G.R. & LEE, J.A. (1974). The role of proline accumulation in halophytes. **Planta 120:** 279-289.
- STEWART, G.R. (1972 a). Effects of proline and carbohydrates on the metabolism of exogenous proline by excised bean leaves in the dark. **Plant Physiology 50:** 551-555.
- STEWART, G.R. (1972 b). Proline content and metabolism during rehydration of wilted excised leaves in the dark. **Plant Physiology 50:** 679-681.
- STEWART, G.R. (1972 c). The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. **Plant Physiology 51:** 508-511.
- STEWART, G.R. (1978). The role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. **Plant Physiology 61:** 775-778.
- STEWART, G.R.(1981). Proline accumulation: Biochemical aspects. In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.),pp.243-258. Academic Press,Sydney.
- STEWART, G.R.; BOGGESS, S.F.; ASPINALL, D. & PALEG, L.G. (1977). Inhibition of proline oxidation by water stress. **Plant Physiology 59:** 930-932.
- STEWART, G.R.; MORRIS, C.J. & THOMPSON, J. F. (1966). Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. **Plant Physiology 41:** 1585-1590.
- STREETER, J.G. & BOSLER, M.E. (1976). Carbohydrates in soybean nodules. Identification of compounds and possible relationship to nitrogen fixation. **Plant Science 7:** 321-329.
- SUSUKI, H. & VERNA, D.P.S. (1991). Soybean nodule-specific uricase (nodulin-35) is expressed and assembled into a functional tetrameric holoenzyme in *Escherichia coli*. **Plant Physiology 95:** 384-389.

- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (1991). **Plant Physiology**. The Benjamin/Cummings Company, Inc. Redwood City, California.
- TAJIMA, S. YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. (1977). Allantoin production and its utilization in relation to nodule formation in soybean. Enzymatic studies. **Soil Science Plant Nutrition 23**: 235-255.
- TEIXEIRA, S.M. ; MAY, P.H. & SANTANA, A . C. (1988) .Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P. de & WATT, E.E.(eds.). **O Caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, Cap.4, p. 99-136.
- THOMPSON, J. F. & MORRIS, C.J. (1957). Changes in nitrogen compounds under wilting conditions. **Plant Physiology 32**. XXIV.
- THOMPSON, J. F.; STEWART, C.R. & MORRIS, C.J. (1966). Changes in amino acid content of excised leaves during incubation I. The effect of water content of leaves and atmospheric oxygen levels. **Plant Physiology 41**: 1578-1584.
- THUMMLER, F. & VERNA, D.P.S. (1987). Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. **Journal of Biological Chemistry 262(30)**: 14730-14736.
- TIETZ, D. & TIETZ, A. (1982). Stress in the plant kingdom. **Biologie in unserer Zeit 12(4)**: 113-119.
- TRINICK, M. J. ; DILWORTH, M.J. & GROUNDS, M. (1976). Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of *Lupinus* species. **New phytology 77**: 359-370.
- TRIPLETT, E.W.; BLEVINS, D.G. & RANDALL, D. D. (1980). Allantoic acid synthesis in soybean root nodule citosol via xanthine dehydrogenase. **Plant Physiology 65**: 1203-1206.
- TU, C.M. & HIETKAMP, G. (1977). Effects of moisture on acetylene reduction (symbiotic nitrogen fixation) by *Rhizobium japonicum* and soybean roots nodules in silica sand. **Communication Soil Science Plant Anal. 8**: 81-86.
- TURK, K.J. & HALL, A.E. (1980 a). Drought adaptation of cowpea. I. Influence of drought on seed yield. **Agronomy Journal 72**: 413-420.

- TURK, K.J. & HALL, A.E. (1980 b). Drought adaptation of cowpea. II. Influence of drought on plant yield. **Agronomy Journal 72**: 421-427.
- TURNER, N.C. & JONES, M.M. (1980). Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. **In: ADAPTATION OF PLANTS TO WATER AND HIGH TEMPERATURE STRESS (TURNER, N.C. & KRAMER, P.J. eds.)**, pp.87-103. Wiley, New York.
- TURNER, N.C. (1979). Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. **In: STRESS PHYSIOLOGY IN CROP PLANTS. (H. MUSSEL AND R.C. STAPLES, eds.)**, pp. 343-372. Wiley-Interscience, New York.
- UDAYAKUMAR, M.; DEVENDRA, R.; REDDY, V.S. & SASTRY, K.S.K. (1981). Nitrate availability under low irradiance and its effects on nitrate reductase activity. **New Phytology 88**: 289-297.
- UHEDA, E. & SYŌNO, K. (1982). Physiological role of leghemoglobin heterogeneity in pea root nodule development. **Plant Cell Physiology 23**: 85-90.
- ULITZSCH, M. & SCHIEMANN, J. (1984). Induction of NADH-dependent nitrate reductase activity in cucumber cotyledons by de novo synthesis of the enzyme. **Biochemistry Physiology Pflanzen 179**: 115-121.
- UZOGARA, S. G. & OFUYA, Z.M. (1992). Processing and utilization of cowpeas in developing countries: a review. **Journal of Food Processing and Preservation n.16**, p. 105-147.
- VAUGHN, K.C. & DUKE, S.O. (1981). Histochemical localization of nitrate reductase. **Histochemistry 72**: 191-198.
- VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O. & FUNKHOUSER, E.A. (1984). Immunochemical characterization and localization of nitrate reductase in norflurazon-treated soybean cotyledons. *Physiologia Plantarum* 62: 481-484.
- VERMA, D.P.S. & MIAO, G-H. (1992). Inducible Plant Proteins. **In: INDUCIBLE PLANT PROTEINS (WRAY, J.L. ed.)**.pp.175-204. Cambridge University Press, Cambridge.
- VESSEY, J.K. & WATERER, J. (1992). In search of the mechanisms of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodule: Recent developments. **Physiologia Plantarum 81**: 171-176.

- VIÉGAS, R.A.; MELO, A.R.B. & SILVEIRA, J.A.G. (1999). Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) in response to salt (NaCl) shock. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **11(1)**: "in press"
- VIÉGAS, R.A. & SILVEIRA, J.A.G. (1999). Ammonia assimilation and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) plants submitted to NaCl-salinity. **Physiol. Mol. Biol. Plants**. "in press".
- VINCENT, J.M. (1974). Root nodule symbioses with *Rhizobium*. **In: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION (QUISPEL, A., ed.)**. pp.265-341. North-Holland, Amsterdam.
- VOGELS, G. D. & VAN DER DRIFT, C.(1970). Diferencial analyses of glyoxilate derivaties. **Analytical Biochemistry**, New York, 33:143-157.
- VU, J. C. V. & YELENOSKY, G. (1988). Water deficit and associated changes in some photosyntetic parameters in leaves of "Valencia" orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). **Plant Physiology** **88**: 375-378.
- WALLACE, W. & OAKS, A. (1986). Role of proteinases in the regulation of nitrate reductase. **In: PLANT PROTEOLYTIC ENZYMES, VOL. II (DALLING, M.J. ed.)**. p.p. 81-89. CRC, Boca Raton, FL.
- WALLACE, W. (1986). Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. **Physiologia Plantarum** **66**: 630-636.
- WALLACE, W. (1987). Regulation of Nitrate Utilization in Higher Plants. **IN: INORGANIC NITROGEN METABOLISM (ULLRICH, W.R.; APARICIO, P.J.; SYRETT, P.J. & CASTILLO, F. eds)**. Pp. 223-230. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- WARRAG, M.O. & HALL, A. E. (1984). Reporductive response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. To heat stress I. Response to soil and dry air temperature. **Field Crop Research** **8**: 17-33.
- WHITHAM, F.H.; BLAYDES, D.F. & DEVLIN, R.M. (1971). **Experiments in plant physiology**. New York, D.Van Nostrand Company, p. 55-58.
- WILSON, D. O. & REISENAUER, H. M.(1963). Determination of leghemoglobin in legume nodules. **Analytical Biochemistry**, 6:27-30.

- WILSON, P. W. (1940). The carbohydrate-nitrogen relationship in symbiotic nitrogen fixation. **In: THE BIOCHEMISTRY OF SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION.** University of Wisconsin Press, Madison.
- WINICOV, I. (1998). New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany 82:** 703-710.
- WITTENBERG, J.B. & WITTENBERG, B.A. (1990). Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. **Annual Review Biophysics and Biochemistry 19:** 217-241.
- WITTENBERG, J.B.; APPLEBY, C.A. & WITTENBERG, B.A. (1972). The kinetics of leghemoglobin with oxygen and carbon monoxide. **Journal Biological Chemistry 217:** 527-531.
- WONG, P.P. & EVANS, H.J. (1971). Poly-B-hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. **Plant Physiology 47:** 750-755.
- WORRALL, V.S. & ROUGHLEY, R.J. (1976). The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii*. **Journal of Experimental Botany 27:** 1233-1241.
- WRIGHT, L.; WRENCH, P.; HINDE, R.W. & BRADY, C.J. (1977). Proline accumulation in tubers of Jerusalem artichoke. **Australian Journal Plant Physiology 4:** 51-60.
- WYN JONES, R.G. & GORHAM, J. (1983). Osmoregulation. **In: ENCYCLOPEDIA OF PLANT PHYSIOLOGY, NEW SERIES, VOL.12C,(LANGE,O.L.NOBEL, P.S., OSMOND, C. B. & ZIEGLER, H., eds.)**, pp.35-58. Springer-Verlag, New York.
- WYN JONES, R.G. & STOREY, R. (1981). Betaines. **In: THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF DROUGHT RESISTANCE IN PLANTS (PALEG, L.G. & ASPINALL, D. eds.)**, pp. 206-240. Academic Press, New York.
- WU, S. & HARPER, J.E. (1990). Nitrogen fixation of nodulation mutants of soybean as affected by nitrate. **Plant Physiology 92:** 1142-1147.
- YADAVA, R.B.R. & PATIL, B.D. (1984). Screening of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) varieties for drought tolerance. **Z.Pflanzenzuecht 93:** 259-262.

- YOUNIS, M.A.; PAULI, A. W.; MITCHELL, H.L. & STICKLER, F. C. (1965). Temperature and its interaction with light and moisture in nitrogen metabolism of corn (*Zea mays* L.) seedlings. **Crop Science** **5**: 321-326.
- 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. **Planta** **185**: 356-361.
- ZIELKE, H.R. & FILNER, P. (1971). Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. **Journal of Biological Chemistry** **246**: 1772-1779.