

**EFEITOS COMPARATIVOS DA SALINIDADE SOBRE O
METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM FOLHAS E NÓDULOS
DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP]
INOCULADO COM *Bradyrhizobium* sp.**

BENEDITO DE BRITO CARDOSO

FORTALEZA – CEARÁ

Abril – 2000

EFEITOS COMPARATIVOS DA SALINIDADE SOBRE O METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM FOLHAS E NÓDULOS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP] INOCULADO COM *Bradyrhizobium* sp.

BENEDITO DE BRITO CARDOSO

Tese submetida à Coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

FORTALEZA

Abril – 2000

Essa 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 dessa Tese será permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Benedito de Brito Cardoso

Dra. Ilka Maria Vasconcelos
UFC/DBBM - Conselheira

Dra. Vânia Felipe Freire Gomes
UFC/DCS - Conselheira

~~Dr. Levi de Moura Barros~~
EMBRAPA/CNPAT- Conselheiro

Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire
EMBRAPA/CNPAT- Conselheiro

Dr. Joaquim ~~Albenisio~~ Gomes da Silveira
UFC/DBBM - Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, por minha orientação e formação científica;

Aos Professores Dra. Ilka Maria Vasconcelos, Dra. Vânia Felipe Freire Gomes, Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire e Dr. Levi de Moura Barros, pelas críticas e sugestões;

À amiga de todas as horas, Zenaide Barbosa;

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

Esse trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia e Centro Nacional de Pesquisa de Agricultura Tropical
- Universidade Federal do Ceará
- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

A VOCÊ

"Você pode comprar o tempo de um homem, você pode também, comprar-lhe certa atividade. Mas não pode comprar a iniciativa, não pode comprar a lealdade, nem a devoção de espírito, de coração, de alma.

Essas coisas você necessita conquistar!

Muito obrigado a você que enriqueceu minha mente, que encheu de amor e ternura o meu coração. A você que me animou, que sorriu para mim.

Muito obrigado a você, não importa quantos nomes você tenha."

(Anônimo)

“Que importa que ao chegar eu nem pareça um pássaro!
Que importa que ao chegar venha me rebentando, caindo aos pedaços, sem
prumo e sem beleza!
Fundamental é cumprir a missão e cumprí-la até o fim.”

Dom Helder Câmara

À minha Mãe, Suzana; ao meu Pai, Francisco; aos meus irmãos, Suzana, Selma, Francisco, Nicodemos e Lara Beatriz; à minha Avó Antônia,

Ofereço.

À minha esposa Nelma e aos meus filhos Daniel e Davi, os amores de minha vida,

Dedico.

SUMÁRIO

	P.
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE FOTOS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Identificação do problema e objetivos.....	1
1.2. Revisão de literatura.....	4
1.2.1. A cultura do feijão-de-corda	4
1.2.2. Salinidade e o crescimento de plantas cultivadas	6
1.2.3. Ajustamento osmótico e adaptação de plantas submetidas à salinidade	11
1.2.4. Utilização de nitrogênio pelas plantas.....	16
1.2.5. Fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico	18
1.2.5.1. A planta hospedeira	19
1.2.5.2. O microssimbionte	21
1.2.5.3. Capacidade competitiva de estirpes de rizóbio	22
1.2.6. Bioquímica e fisiologia da fixação biológica de nitrogênio	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1. Condições ambientais	26
2.2. Substrato para cultivo das plantas	26
2.3. Origem, tratamento e plantio das sementes	27
2.4. Origem e multiplicação da estirpe de rizóbio e inoculação das plântulas.....	27
2.5. Nutrição das plantas	27
2.6. Descrição dos experimentos	28
2.6.1. Experimento I.....	28

2.6.2. Experimento II	28
2.7. Parâmetros analisados	29
2.7.1. Determinação de massa fresca e massa seca	29
2.7.2. Extração e determinação do teor de proteínas solúveis totais em folhas e nódulos.....	29
2.7.3. Atividade <i>in vivo</i> da redução de nitrato	29
2.7.4. Concentração de prolina livre.....	30
2.7.5. Atividade de glutamina sintetase	31
2.7.6. Concentração de clorofila total.....	31
2.7.7. Concentração de aminoácidos livres	32
2.7.8. Extração e determinação de Leghemoglobina	32
2.7.9. Concentração de cloreto.....	33
2.7.10. Concentração de sódio e potássio	33
2.7.11. Nitrogênio total.....	33
2.7.12. Concentração de nitrato	34
2.7.13. Concentração de amônia livre.....	34
2.7.14. Determinação de ureídeos	34
2.7.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e β -2-mercaptoetanol.....	35
2.7.16. Determinação de ureídeos na seiva do xilema.....	36
3. RESULTADOS	38
3.1. Efeitos da salinidade sobre o crescimento de nódulos e folhas de feijão-de-corda em experimentos de curta e longa duração.	38
3.2. Efeitos da salinidade sobre a atividade dos nódulos relacionada com a fixação de N_2	51
3.3. Efeitos da salinidade sobre o metabolismo de nitrogênio nas folhas	59
3.4. Efeitos da salinidade sobre o acúmulo de solutos envolvidos com o ajustamento osmótico.	66

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	73
5. CONCLUSÕES	84
6. BIBLIOGRAFIA	87

LISTA DE FIGURAS

	P.
Figura 1 – Massa fresca de folhas e de nódulos de plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento.	43
Figura 2 – Consumo diário de água e concentração de clorofilas totais em plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento.....	44
Figura 3 – Massa fresca de folhas e de nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO ₃ na solução nutritiva	45
Figura 4 – Concentração de clorofilas totais e suculência foliar das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO ₃ na solução nutritiva	54
Figura 5 – Concentração de proteínas solúveis e de aminoácidos livres totais (N-α amino) em nódulos de plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento.	55
Figura 6 – Atividade de Glutamina sintetase e concentração de leghemoglobina em nódulos de plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento.....	56
Figura 7 – Eletroforese de nódulos	57
Figura 8 – Concentração de prolina e de amônia livre em nódulos de plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento.....	58
Figura 9 – Concentração de proteínas solúveis e de aminoácidos livres totais (N-α amino), em nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO ₃ na solução nutritiva.....	61
Figura 10 – Concentração de leghemoglobina total e atividade de glutamina sintetase em nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO ₃ na solução nutritiva.....	62
Figura 11 – Concentração de ureídeos em nódulos e seiva do xilema.....	63
Figura 12 – Conteúdo total de N e % N na folha.....	64
Figura 13 – Atividade da redutase de nitrato e concentração de nitrato em folhas das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO ₃ na solução nutritiva.....	65
Figura 14 – Atividade da glutamina sintetase e concentração de proteínas solúveis em folhas.....	68
Figura 15 – Eletroforese de Folhas.....	69
Figura 16 – Concentração de aminoácidos livres totais, prolina, amônia e ureídeos	

em folhas de plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento..... 70

Figura 17 – Concentração de prolina e concentração de amônia em folhas das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO_3^- na solução nutritiva 71

Figura 18 – Concentração de Na^+ , Cl^- , K^+ e Ca^{+2} em folhas de plantas de feijão-de-corda, com 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento..... 72

LISTA DE FOTOS

P.

- Foto 1.** Detalhes dos sintomas visuais observados nas folhas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, submetido à salinidade (NaCl), na concentração de 400mM.L^{-1} 46
- Foto 2.** Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de dois níveis de nitrato (1mM.L^{-1} e 10mM.L^{-1}), na ausência de salinidade (NaCl), aos 25 DAE (dias após emergência)..... 47
- Foto 3.** Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de nitrato (10mM.L^{-1}) e na ausência de salinidade (NaCl), aos 30 DAE. 48
- Foto 4.** Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência e presença (50mM.L^{-1}) de salinidade (NaCl), supridas com 1mM.L^{-1} de nitrato, aos 25 DAE..... 49
- Foto 5.** Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7 inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de dois níveis de nitrato (1mM.L^{-1} e 10mM.L^{-1}) e salinidade (50mM.L^{-1} NaCl), aos 25 DAE. 49
- Foto 6.** Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência e presença (200mM.L^{-1}) de salinidade (NaCl), supridas com 10mM.L^{-1} de nitrato, aos 30 DAE. 50
- Foto 7.** Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 3, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência e presença (200mM.L^{-1}) de salinidade (NaCl), supridas com 10mM.L^{-1} de nitrato, aos 30 DAE. 50

EFEITOS COMPARATIVOS DA SALINIDADE SOBRE O METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM FOLHAS E NÓDULOS DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP] INOCULADO COM *Bradyrhizobium* sp.

Autor: Benedito de Brito Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira

RESUMO

Apesar da importância das leguminosas cultivadas no suprimento de proteínas para o homem e animais, além da capacidade de aproveitamento de nitrogênio atmosférico, são poucos os estudos acerca do cultivo dessas plantas sob condições de salinidade. Nesse trabalho, plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], uma espécie medianamente tolerante à salinidade, foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., estirpe BR-3256, na presença de dois níveis de NO_3^- : um muito baixo, para permitir uma ampla nodulação (1mM.L^{-1}) e um elevado, para inibir a nodulação e suprir a planta essencialmente com nitrato (10mM.L^{-1}). Foram introduzidos dois níveis de Ca^{+2} : um baixo, cálcio residual da vermiculita e o armazenado na planta, e um elevado, 10mM.L^{-1} , aplicados diariamente por 4 dias. No Experimento I, plantas da cultivar Vita 7 permaneceram até os 27 dias na ausência de NaCl quando foram aplicados os níveis crescentes de NaCl: 50mM.L^{-1} (baixo – moderado), 100mM.L^{-1} (moderado – alto), 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} (muito altos). No Experimento II, duas cultivares (Vita 3 e Vita 7) permaneceram na presença de 50mM.L^{-1} de NaCl desde a inoculação, até os 27 dias, quando um lote de plantas recebeu um choque salino com 200mM.L^{-1} de NaCl, durante quatro dias. Os efeitos do estresse salino induzidos pelo NaCl causaram reduções proporcionais na acumulação de fitomassa em nódulos e folhas das duas cultivares. Os níveis elevados de NaCl (200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}) causaram maior redução na massa das folhas devido aos processos de clorose,

senescência e abscisão foliar em relação aos nódulos que mantiveram sua integridade. Não se observou efeito favorável desse cátion para o crescimento dos nódulos. A cultivar Vita 3 foi mais tolerante à salinidade, principalmente quando inoculada na presença de um nível muito baixo de nitrato. Nessa condição, as duas cultivares apresentaram nodulação semelhante. As cultivares apresentaram produção de fitomassa total semelhante quando inoculadas com *Bradyrhizobium* na presença de um nível muito baixo (1mM.L^{-1}) ou quando supridas com nível elevado de NO_3^- (10mM.L^{-1}), ambos na ausência de NaCl. O estresse salino moderado por longa duração, assim como o choque salino com nível elevado de NaCl nas plantas não alteraram a suculência foliar, o conteúdo de água e a concentração de clorofilas. Os nódulos sofreram menores alterações em seus componentes bioquímicos relacionados com a fixação de N_2 , na presença dos níveis mais elevados de NaCl. A concentração de leghemoglobina, atividade de glutamina sintetase e a concentração de amônia livre não foram alteradas pelo estresse salino, enquanto que a concentração de proteínas foi ligeiramente reduzida. Inversamente, ocorreu pequeno aumento na concentração de aminoácidos livres totais. Nos níveis mais elevados de NaCl verificou-se grande aumento na concentração de ureídeos nos nódulos, acompanhado de expressiva redução na concentração desses compostos na seiva do xilema. Nos níveis mais moderados de estresse salino não se observou alteração significativa nas concentrações de ureídeos. Nas folhas, os níveis mais elevados de NaCl provocaram profundas alterações no metabolismo dos compostos nitrogenados. A atividade de glutamina sintetase foi aumentada, paralela ao incremento na concentração de proteínas solúveis, aminoácidos totais, amônia livre e ureídeos. A concentração de prolina foi aumentada cerca de 20 vezes no nível mais elevado de NaCl. Esse aumento foi acompanhado de acréscimos nas concentrações de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} nas folhas. A concentração de K^+ aumentou apenas discretamente. Ao contrário, nos tratamentos que induziram estresse mais moderado, os aumentos na concentração de prolina foram de apenas 5 vezes e somente nas plantas supridas com nível elevado de NO_3^- . A concentração de nitrogênio total, nas plantas inoculadas na presença de nível muito baixo de nitrato e submetidas ao estresse salino durante longa

duração, foi reduzida proporcionalmente ao acúmulo de fitomassa na parte aérea, indicando que nessa condição os processos de fixação de N_2 e a produção de fitomassa foram afetados de maneira similar. Nas outras situações de estresse salino (plantas supridas com nível elevado de nitrato ou níveis elevados de NaCl por curta duração), a acumulação de fitomassa na parte aérea das plantas foi mais afetada do que a assimilação do nitrato, através de redutase de nitrato, ou por meio da fixação simbiótica de N_2 . Os resultados indicam que deve existir um balanço funcional coordenado para o crescimento de nódulos e folhas de plantas noduladas de feijão-de-corda submetido ao estresse salino. Os compostos nitrogenados exportados pelos nódulos, particularmente os ureídeos, podem exercer regulação sobre as taxas de fixação de N_2 . Por sua vez, a mobilização desses compostos está relacionada com o fluxo transpiratório nas folhas, o qual exerce efeitos diretos na fotossíntese e crescimento da planta. Não foi evidenciado um efeito regulador no crescimento dos nódulos através de restrição no suprimento de fotossintatos devido ao estresse salino.

COMPARATIVE EFFECTS OF SALINITY ON NITROGEN METABOLISM IN LEAVES AND NODULES OF COWPEA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP] INOCULATED WITH *Bradyrhizobium* sp..

Author: Benedito de Brito Cardoso

Adviser: Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. da Silveira

ABSTRACT

Few researches have reported about salt effects on legumes, although this group of plants represents an important source of protein for men and animals besides the ability to fix atmospheric nitrogen. Cowpea plants [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], a moderately salt tolerant species, were inoculated with *Bradyrhizobium* sp., BR-3256 strain and grown in two levels of nitrate (NO_3^-): 1mM.L^{-1} (nodulation promoter) and 10mM.L^{-1} (nodulation inhibitor). In addition, two levels of Ca^{2+} were used during four days: a low (calcium in vermiculite residue and in the plant) and a high one (10mM.L^{-1}). In the Experiment I, Vita 7 cultivar was grown for 27 days in a salt free nutritive solution. At this time, five different levels of salt (NaCl) were used for four days: 50mM.L^{-1} (low – moderate), 100mM.L^{-1} (moderate – high), 200mM.L^{-1} and 400mM.L^{-1} (very high). In the Experiment II, two cultivars (Vita 3 and Vita 7) were grown in $\text{NaCl } 50\text{mM.L}^{-1}$, since plants inoculation, until 27 days, when some plants were submitted to salt shock with $\text{NaCl } 200\text{mM.L}^{-1}$, for four days. Salt stress effects resulted in proportional reduction on nodule and leaves mass accumulation in both cultivars. Very high levels of salt (200mM.L^{-1} and 400mM.L^{-1}) caused higher reduction in leaves mass due to chlorosis process, senescence and leaf abscission in relation to the nodules. Nodule growth was not favored by Ca^{2+} . Vita 3 cultivar was more tolerant to salinity, specially when inoculated in low level of nitrate. In this condition, both cultivars had similar nodulation. Also both showed similar leaves mass production when inoculated in the presence of

NO_3^- 1mM.L^{-1} or supplied with NO_3^- 10mM.L^{-1} , since that in salt free nutritive solution. Long term moderate salt stress, as well as the salt shock with high level of NaCl did not influence leaf succulence, water content and chlorophyll concentration. Nodule suffered less modification in biochemical patterns, related to N_2 fixation in higher levels of NaCl. Leghemoglobin, glutamine synthetase activity and free ammonium concentration were not modified by salt stress, while protein concentration had a slight decrease. The nodule ureides concentration was improved at higher levels, while the xylem sap had its concentration depressed. At moderate levels of salt stress, ureides concentration was not significant. In the leaves, the highest NaCl level promoted deep modification in nitrogen compounds metabolism. The glutamine synthetase activity improved as the protein concentration, total aminoacids, free ammonium and ureides did, too. Proline concentration improved 20 fold in NaCl higher levels as the Na^+ , Cl^- and Ca^{2+} concentrations in leaves did too. K^+ concentration improved slightly. On the other hand, moderate stress favored only the improvement of proline concentration in plants supplied with 10mM.L^{-1} . The results suggest that it is possible to exist an organized functional balance for nodule and leaves growth of inoculated plants under salt stress. Nitrogen compounds exported by nodules, specially ureides, may play the regulation on nitrogen fixation rates. The mobilization of these compounds is related to the leaves transpiration and plant growth. Regulatory effect on nodule growth was not evidenced but the restriction of photosynthates supply due to the salt stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Identificação do problema e objetivos

A simbiose entre as leguminosas e as bactérias do gênero *Rhizobium* depende de diversos fatores. A interação entre os pares simbiontes é bastante complexa, envolvendo fatores genético-fisiológicos, tanto da estirpe bacteriana, quanto da planta hospedeira, os quais também interagem com fatores do ambiente. Dentre os tipos de estresses ambientais, a deficiência hídrica, as temperaturas elevadas e a salinidade dos solos concorrem decisivamente para o sucesso da fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, com reflexos diretos no crescimento e produção das leguminosas.

O processo biológico de fixação de nitrogênio permite grande economia de fertilizantes nitrogenados, contribuindo, também, para o controle da poluição dos solos e lençóis freáticos com nitrato residual. Além disso, no caso de leguminosas cultivadas, o uso de sementes inoculadas com estirpes eficientes de rizóbio poderá promover o aumento de produtividade, particularmente nos solos de baixa fertilidade e em agricultura com baixo nível tecnológico, como a que é praticada, em geral, pelos pequenos produtores.

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (Walp) L.] é intensivamente cultivado no Norte e Nordeste do Brasil por pequenos agricultores, que se caracterizam pela baixa renda e uso de mão-de-obra familiar, em pequenas propriedades, empregando técnicas agrícolas rudimentares. Essa cultura representa a maior fonte de suprimento de proteínas para a maioria da população dessas regiões, muito embora apresente baixa produtividade, decorrente do baixo nível tecnológico adotado, da pouca utilização de insumos

agrícolas, tais como calcário e fertilizantes, ou ainda, do não emprego de inoculantes com rizóbio por ocasião do plantio.

No semi-árido brasileiro, o feijão-de-corda se desenvolve, em geral, sob condições ambientais adversas, principalmente deficiência hídrica, temperaturas elevadas e salinização dos solos. Por outro lado, em algumas regiões produtoras tem havido, recentemente, a utilização da irrigação nessa cultura. Entretanto, nessas condições, os riscos de salinização dos solos são consideravelmente aumentados devido a problemas com a qualidade das águas usadas para irrigação, associados com as condições edáfico-climáticas propícias ao aumento do processo de salinização.

Apesar da literatura registrar que a salinidade afeta intensamente o processo de fixação simbiótica de nitrogênio, observa-se que os trabalhos são ainda incipientes. Um volume mais significativo das pesquisas tem se dedicado ao problema da deficiência hídrica. No caso do feijão-de-corda, são escassos os trabalhos envolvendo salinidade e fixação de nitrogênio. Apesar de diversos trabalhos publicados, permanecem várias lacunas a respeito dos efeitos e do modo de ação da salinidade sobre os diferentes aspectos da simbiose: sobrevivência do rizóbio, etapas iniciais da nodulação, crescimento dos nódulos, mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos com a fixação, dentre outros.

Diferentemente de outras leguminosas, a simbiose entre feijão-de-corda e *Bradyrhizobium* sp. tolera níveis moderados de nitrato no solo ($1-5\text{mM.L}^{-1}$). Esse fato pode ser bastante favorável para o manejo da nutrição nitrogenada, já que a planta pode utilizar, de maneira simultânea, as duas formas de nitrogênio: NO_3^- e N_2 . Diversos trabalhos têm demonstrado que as leguminosas tropicais são mais sensíveis ao estresse hídrico, em termos de fixação de N_2 , do que as leguminosas de clima temperado. Por outro lado, sob deficiência de água, as plantas nutridas com nitrato se mostram mais tolerantes do que aquelas supridas somente com o nitrogênio da fixação simbiótica. Entretanto, no caso do estresse salino, não se observou nenhum trabalho na literatura tratando desse problema.

Sob determinadas condições ambientais, o sucesso da simbiose rizóbio-leguminosa irá depender do balanço funcional estabelecido entre a parte aérea da planta e da atividade de raízes e nódulos. As folhas atuam no suprimento de derivados da fotossíntese (sacarose) para o crescimento e metabolismo de raiz e nódulos e esses fornecem os nutrientes minerais para o desenvolvimento da parte aérea. Esse sistema opera com retro-alimentação e seus controles bioquímico-fisiológicos são ainda pouco conhecidos. As diversas hipóteses lançadas para explicar o funcionamento dos nódulos, a partir do controle exercido pelas folhas através do suprimento de fotossintatos, são atualmente questionadas e não dispõem de suporte experimental.

Esse trabalho teve como objetivo, comparar os efeitos e alguns mecanismos da ação da salinidade (NaCl) sobre o crescimento e aspectos do metabolismo do nitrogênio em nódulos e folhas de plantas de feijão-de-corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de dois níveis contrastantes de nitrato. Adicionalmente, pretende-se compreender algumas das relações entre o balanço funcional de folhas e nódulos na presença do estresse salino.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. A cultura do feijão-de-corda

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma *Dicotyledonea* que pertence à divisão *Magnophyta*, classe *Magnoliopsida*, sub-classe *Rosidae*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, gênero *Vigna* (CRONQUIST, 1988). É uma planta anual, originária da África, cultivada amplamente na África, América Latina, sudeste da Ásia e sul dos Estados Unidos. É uma planta bem adaptada às condições brasileiras de clima e solo (BRASIL, 1984), cultivada para a produção de grãos, destinados à alimentação humana, nas regiões de clima quente, seja úmida ou semi-árida do Norte e do Nordeste do Brasil, respectivamente. É uma cultura de subsistência, constituindo-se na principal fonte de proteína para a população rural e, em menor parte, também, da urbana, tornando-se uma cultura de grande expressão sócio-econômica para essas regiões. Difundido nas demais regiões do país como hortaliça para a produção de grãos verdes e vagens, é também utilizado na produção de ramos e folhas para a alimentação de animais, sendo consumido naturalmente ou como feno. Pela sua capacidade de se desenvolver bem em solos de baixa fertilidade, constitui-se, também, numa opção como fonte de matéria orgânica a ser utilizada como adubo verde na recuperação de solos naturalmente pobres em fertilidade ou esgotados pelo seu uso intensivo (OLIVEIRA & CARVALHO, 1988).

O feijão-de-corda desenvolve-se na faixa de temperatura compreendida entre 18°C e 34°C (PONTE, 1979). À medida que a temperatura se afasta dessa faixa, o desenvolvimento da planta fica prejudicado. Altas temperaturas durante o período de florescimento reduzem o desenvolvimento floral e prejudicam a floração (ARAÚJO *et al.*, 1984). RACHIE & ROBERTS (1974) relataram que a faixa de 24°C a 33°C é a mais apropriada para a formação de nódulo na raiz. Entretanto, quando a temperatura ultrapassa 31°C, o número de plantas com nódulos e o número de nódulo por planta decrescem. Temperaturas noturnas entre 19°C e 24°C favorecem o crescimento, floração e produção de grãos

(OLIVEIRA & CARVALHO, 1988). Os solos das regiões Norte e Nordeste do Brasil onde o feijão-de-corda é cultivado possuem limitações de fertilidade, além de apresentarem problemas como a salinidade, no Nordeste, e altos níveis de alumínio no Norte. O baixo teor de fósforo é comumente um fator limitante da fertilidade desses solos, enquanto o nitrogênio, caso haja condições de pH e alumínio favoráveis, pode ser suprido simbioticamente à cultura, que nodula eficientemente com numerosas estirpes de rizóbio presentes no solo (STAMFORD & NEPTUNE, 1979). A cultura não se adapta bem aos solos com excesso de umidade. De modo geral, desenvolve-se em solos com regular teor de matéria orgânica, soltos, leves e profundos, arejados e dotados de razoável fertilidade. Os maiores rendimentos são obtidos nos solos argilo-silicosos ou sílico-argilosos. Quando o teor de areia aumenta, a terra fica mais solta, proporcionando maior arejamento ao sistema radicular, a planta se desenvolve melhor e a sua produção aumenta (OLIVEIRA & CARVALHO, 1988).

Os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijão-de-corda na região semi-árida são: a situação sócio-econômica do produtor, as deficiências estruturais, o baixo nível tecnológico empregado (sementes não melhoradas geneticamente, ausência do preparo e da correção da acidez dos solos etc), associados às condições ambientais desfavoráveis, tais como a baixa disponibilidade de água no solo, temperaturas elevadas e presença de salinidade nos solos (ARAÚJO *et al.*, 1984). O Estado do Ceará é o principal produtor de feijão-de-corda do país (TEIXEIRA *et al.*, 1988), contribuindo com cerca de 21% da produção nacional. O Ceará ainda apresenta a maior área de dispersão, com a planta sendo cultivada praticamente em todas as áreas agricultáveis do estado, abrangendo desde a cultura de subsistência da família rural até as plantações dos perímetros irrigados, onde o cultivo dessa leguminosa assume maior expressão econômica (TEÓFILO *et al.*, 1986).

1.2.2. Salinidade e o crescimento de plantas cultivadas

O problema de salinidade existe quando os sais se acumulam na zona radicular, numa concentração tal que ocasiona perdas na produção. Esses sais são, geralmente, provenientes dos sais contidos na água de irrigação ou nas águas de lençol freático elevado. O rendimento das culturas diminui quando os teores de sais na solução do solo são tais que não permitem que a planta retire água suficiente da zona radicular, provocando, assim, estado de escassez de água por tempo significativo. Se a extração de água pelas raízes reduz-se muito, as plantas diminuem seu crescimento e chegam a apresentar sintomas semelhantes aos provocados por estiagem, tais como murchamento ou coloração verde-azulada escura e, algumas vezes, folhas cerosas e com maior espessura (AYERS & WESTCOT, 1991).

O processo de salinização pode originar-se de causas naturais ou artificiais. As áreas naturalmente salinas do mundo compreendem aquelas que são constantemente inundadas pelas águas salgadas de lagos e, principalmente, dos mares (áreas de manguezais nas costas tropicais e subtropicais), os desertos salinos e pequenas áreas próximas a depósitos de sais (CHAPMAN, 1975). Em algumas regiões de clima semi-árido, onde o período chuvoso é curto, o aparecimento de intensas precipitações promove o deslocamento de sais de uma área de melhor para outra de pior drenagem. Como nessas regiões há o predomínio da evaporação sobre a precipitação, os sais se acumulam na camada superficial do solo provocando a formação de solos salinos (CARTER, 1975).

As causas artificiais do processo de salinização originam-se na atividade humana, relacionadas com a agricultura irrigada, em que a acumulação de sais depende basicamente da qualidade da água, do manejo da irrigação e da eficiência do sistema de drenagem (AYERS & WESTCOT, 1991), além do uso intensivo e indiscriminado de fertilizantes químicos.

O processo natural de salinização dos solos envolve a acumulação de íons, principalmente Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} e HCO_3^- , nas camadas

agriculturáveis dos solos (OLIVEIRA, 1997). Dessa forma, a salinidade provoca modificações químicas e físicas, com consequências sobre a atividade biológica do solo (SANTOS & MURAOKA, 1997).

As principais alterações químicas provocadas pela salinização dos solos são na composição e balanço de cátions nos complexos de troca e na solução do solo, com reflexos no pH, na capacidade de troca iônica e disponibilidade de nutrientes (SANTOS & MURAOKA, 1997). No caso dos solos sódicos, o excesso de Na^+ provoca alterações nas propriedades físicas do solo, reduzindo a floculação das argilas e a estabilidade dos agregados, provocando reduções na porosidade e capacidade de retenção de água (LIMA, 1997). O excesso de sais provoca diminuição na pressão osmótica e toxicidade para o desenvolvimento da fauna e flora, diminuindo as taxas de mineralização e humificação da matéria orgânica, favorecendo a redução na fertilidade dos solos (SANTOS & MURAOKA, 1997).

A intensidade de redução no crescimento de diferentes espécies provocada pela salinidade é bastante variável. No extremo superior de capacidade de tolerância ao excesso de sais estão as plantas halófitas, constituídas por espécies adaptadas e evoluídas sob condições de altos níveis de salinidade (FAGERIA & GHEYI, 1997). Nesse grupo, a presença de excesso de sais, dentro de certos limites, estimula o crescimento dessas espécies. Por outro lado, no extremo inferior, encontram-se as espécies muito sensíveis, as glicófitas (BOHNERT *et al.*, 1995). Entre os dois grupos, existe um grande gradiente de tolerância em termos de espécies cultivadas e até mesmo dentro de espécies (cultivares), mostrando que as plantas superiores apresentam uma grande variabilidade genética para a tolerância ao estresse salino (WINICOV, 1998).

O excesso de sais no solo pode provocar diversos tipos de efeitos sobre o crescimento das plantas. Em geral, pela redução no fluxo de água na planta, pela diminuição na absorção de nutrientes minerais e desbalanço nutricional e pelos efeitos tóxicos dos íons salinos (GREENWAY & MUNNS, 1980;

CHESSEMAN, 1988). A salinidade provoca reduções no potencial osmótico da solução do solo, induzindo decréscimos na energia livre da água. Como consequência, um dos primeiros efeitos será a diminuição no influxo de água nas raízes e no fluxo transpiratório (SALISBURY & ROSSI, 1992), através da diminuição do gradiente de potencial hídrico. As diminuições no fluxo de água nas raízes induzem aumentos na síntese de ácido abscísico, acarretando aumentos na resistência estomática (WINICOV, 1998).

As plantas do tipo não halófitas desenvolvem, em geral, como mecanismo de adaptação à salinidade, em primeira instância, aumentos nas taxas de absorção dos próprios íons salinos em excesso na solução externa (GREENWAY & MUNNS, 1980). Dessa forma, verifica-se uma diminuição no potencial osmótico das raízes e das outras partes da planta, favorecendo a entrada e a manutenção da água nas células (NIU *et al.*, 1995). A redução no influxo de água poderá acarretar diminuições no potencial de turgor nas células (SALISBURY & ROSSI, 1992). Apesar dos mecanismos moleculares que desencadeiam os processos ainda não serem conhecidos, especula-se que sob essas condições ocorrem decréscimos na intensidade de crescimento, provocados, provavelmente, por reduções nas taxas de síntese de parede celular e de proteínas (SALISBURY & ROSSI, 1992).

Dessa maneira, é possível que algumas espécies possam compatibilizar suas taxas de crescimento com as taxas de absorção de íons. Nesse caso, as concentrações dos íons salinos seriam mantidas aproximadamente constantes ao longo do desenvolvimento (TAIZ & ZEIGER, 1991). Num segundo estágio de adaptação à salinidade, algumas plantas glicófitas promovem uma compartimentalização dos sais em células e órgãos, através da acumulação preferencial nos vacúolos de raízes, caules e folhas (GREENWAY & MUNNS, 1980). Paralelamente, algumas espécies podem incrementar a biossíntese de solutos osmoticamente compatíveis, promovendo ajustamento osmótico para a manutenção de um estado hídrico compatível com os níveis de crescimento necessários para o desenvolvimento (BOHNERT *et al.*, 1995).

A situação anteriormente delineada ocorre geralmente em condições de estresse salino moderado ou tratando-se de espécies adaptadas à salinidade. Ao contrário, na presença de concentrações elevadas de sais ou para plantas não adaptadas, verificam-se, comumente, descompassos entre as taxas de absorção de íons e as de crescimento, ocorrendo acumulação progressiva de sais tóxicos, com diminuição acentuada na fotossíntese e de síntese de proteínas e o surgimento de diversos efeitos indiretos sobre o crescimento (SALISBURY & ROSSI, 1992). Nesses casos, os diferentes efeitos da salinidade, a deficiência hídrica induzida, a toxicidade direta dos íons e o desbalanço nutricional, ocorrem, provavelmente, como efeitos em cascata (NIU *et al.*, 1995), acarretando o surgimento do processo de senescência induzida, redução do crescimento e início da necrose dos tecidos.

A quantidade de água transportada do solo até as folhas é proporcional ao gradiente de potencial de hídrico e inversamente ao somatório das resistências apresentadas (LACERDA, 1995). No caso das plantas adaptadas e ajustadas osmoticamente ao estresse salino, poderá ocorrer manutenção do gradiente de potencial, porém associado com reduções na condutividade hidráulica das raízes e maior fechamento dos estômatos. Isso resultará em menores taxas de absorção e assimilação de CO_2 , induzindo menores taxas de crescimento (AZAIZEH *et al.*, 1992). Muitas vezes, as folhas das plantas estressadas com a salinidade, mas previamente ajustadas, apresentam aspecto normal, sendo, em geral, menores e mais suculentas (relação massa úmida/área). Portanto, nesses casos, a pressão de turgescência não é diminuída pelo estresse salino (BOYER, 1965).

Os efeitos da salinidade podem variar em função de diversos fatores. Além da variabilidade genética, das concentrações dos sais, por meio do decréscimo no potencial da água na solução do solo e os efeitos tóxicos dos íons, é importante, também, a duração do estresse, seja curto (dias) ou longo (semanas). Além disso, é fundamental estabelecer o estágio de desenvolvimento da planta, assim como as condições ambientais de temperatura e umidade do ar (LACERDA, 1995). No caso de exposição de curta

duração, os efeitos do NaCl são, em geral, mais de natureza osmótica, induzindo reduções na absorção de água. No caso de longos períodos, a acumulação de Na^+ e Cl^- , principalmente nas folhas, poderá provocar redução do crescimento, senescência e necrose (YEO *et al.*, 1991).

Diversos processos metabólicos são alterados pela salinidade. Apesar dos mecanismos moleculares de tradução de sinais ainda não serem conhecidos, diversos trabalhos têm mostrado que o estresse salino induz inicialmente aumentos na biossíntese de ácido abscísico nas raízes e sua mobilização para as folhas (BOHNERT *et al.*, 1995; INGRAM & BARTELS, 1996). Como consequência, observa-se a diminuição na abertura estomática e nas taxas de fotossíntese. Ainda não está claro se os efeitos ocorrem mais em função da diminuição nas concentrações de CO_2 nas células do mesófilo ou se diretamente sobre a atividade da rubisco e de outras proteínas dos cloroplastos (BRUNGOLI & LAUTERI, 1991).

A taxa de síntese de proteína também é reduzida pelo excesso de sais (ASLAM *et al.*, 1984). Trabalhos com utilização de ^{15}N e incorporação de leucina- ^{14}C têm mostrado que plantas de cevada submetidas à salinidade do NaCl apresentaram redução na síntese protéica (ASLAM *et al.*, 1984). Entretanto, em experimentos de longa duração de exposição ao estresse salino, não é possível separar os efeitos diretos da salinidade daqueles efeitos indiretos decorrentes de alterações no metabolismo e crescimento. De maneira semelhante, não são conhecidos os mecanismos de ação da salinidade sobre a transcrição e a tradução (SALISBURY & ROSSI, 1992). Algumas evidências sugerem que os efeitos diretos dos íons salinos ocorrem principalmente nos polissomos (ASLAM *et al.*, 1984).

1.2.3. Ajustamento osmótico e adaptação de plantas submetidas à salinidade

Quando plantas halófitas e não halófitas são submetidas à presença de NaCl, observa-se inicialmente aumento na absorção iônica, particularmente dos próprios Na^+ e Cl^- , em resposta ao aumento das concentrações externas. Com

o decorrer do estresse salino, na maioria das plantas cultivadas, ocorrem aumentos pronunciados nas concentrações de alguns solutos orgânicos (NIU *et al.*, 1995; BOHNERT *et al.*, 1995). O mecanismo de resposta que leva à acumulação de solutos inorgânicos e orgânicos nos tecidos, provocando diminuição no potencial osmótico da célula, é denominado de ajustamento osmótico (SALISBURY & ROSSI, 1992). Apesar de reconhecido há muito tempo, esse processo fisiológico ainda é pouco conhecido em seu nível molecular, assim como seu papel efetivo na tolerância ao déficit de água, conferida a tecidos submetidos aos estresses hídricos e salinos (TAIZ & ZEIGER, 1991).

O ajustamento osmótico permite às plantas manterem um turgor celular compatível para o crescimento (ZIMMERMANN, 1978). Esse processo envolve transporte, acumulação e compartimentalização de íons inorgânicos e solutos orgânicos (SPICKETT *et al.*, 1992). Sob condições salinas, a saída da água da célula pode causar um decréscimo no potencial de parede abaixo do limite para a expansão celular e crescimento. O ajustamento osmótico requer a regulação intracelular nos níveis de diversos compostos do carbono (carboidratos, açúcares, álcoois e ácidos orgânicos) e compostos nitrogenados (prolina, glicinabetaína, colina, poliaminas e aminoácidos), muitos dos quais são tidos como compartimentalizados no citosol, enquanto íons inorgânicos, principalmente Na^+ , Cl^- e K^+ são sequestrados para os vacúolos ou distribuídos entre citosol e vacúolos (GREENWAY & MUNNS, 1980).

Os solutos orgânicos no citosol contribuem para o balanço osmótico intracelular quando as concentrações de íons inorgânicos são elevadas nos vacúolos e também contribuem na proteção de enzimas citoplasmáticas quando as concentrações iônicas aumentam (GREENWAY & MUNNS, 1980). Além disso, o acúmulo de solutos permite à célula manter um potencial de turgor positivo, requerido para a expansão celular e abertura dos estômatos (NABIL & COUDRET, 1995). O ajustamento osmótico, juntamente com a elasticidade da célula, ajuda na manutenção do turgor sob baixo potencial de água no tecido e evita danos mecânicos sobre a membrana plasmática (SHIHE *et al.*, 1994).

Diversas espécies utilizam preferencialmente a prolina como soluto osmoticamente compatível no ajustamento osmótico (RABE, 1993; BOHNERT et al., 1995; BRAY, 1997). Apesar da acumulação desse aminoácido, que é induzida por diversos tipos de estresses ambientais, ser conhecida há bastante tempo, sua participação efetiva como caráter de tolerância das plantas cultivadas ainda é motivo de discussão e especulação (ASPINALL & PALEG, 1981; STEWART, 1981; INGRAM & BARTELS, 1996; WINICOV, 1998). É pacífico que a prolina esteja envolvida com o ajustamento osmótico e, possivelmente, na proteção de proteínas citoplasmáticas contra a desidratação (LAROSA *et al.*, 1991; LIU & ZHU, 1997; KUZNETSOV & SHEVYAKOVA, 1997).

Trabalhando com células modificadas de plantas de fumo submetidas a condições de salinidade e altas temperaturas, KUZNETSOV & SHEVYAKOVA, (1997) concluíram que ao longo do desenvolvimento da tolerância para salinidade, as células desenvolveram habilidades para acumular prolina e poliaminas, tanto de forma constitutiva como induzida pelo cloreto de sódio. A acumulação desses solutos parece proteger o metabolismo celular nas condições de estresse. Os autores observaram, também, uma resposta cruzada a partir dos dois tipos de estresse, ocorrendo uma alta acumulação transiente de prolina após o tratamento simultâneo de salinidade e altas temperaturas. Finalmente, os autores especulam que a síntese de proteínas e polipeptídeos induzida pelos estresses pode estar relacionada com a proteção contra altas temperaturas nas células.

Sob condições de estresse salino, a prolina parece ser sintetizada principalmente a partir de glutamato (LAROSA *et al.*, 1991). A reação é realizada em 4 passos, sendo a última catalizada por Δ -pirroline-5-ácido carboxílico redutase (P5C) (STEWART, 1981). A partir de observações empíricas, foi lançada a hipótese de que a tolerância ao NaCl estaria relacionada com os níveis e atividade de P5C (LAROSA *et al.*, 1991). Trabalhando com diferentes linhagens de células de plantas de fumo, expressando diferenças na tolerância ao NaCl e na atividade da enzima, os autores concluíram que a atividade específica não foi limitante para a síntese de

prolina nas células não tolerantes. Os autores sugerem que o passo limitante deve ser anterior à síntese de P5C.

Os genes para a síntese de prolina já foram identificados em *Arabidopsis* e recentemente clonados em plantas de fumo (KISHOR *et al.*, 1995). Apesar das plantas transgênicas exibirem respostas favoráveis em condições de laboratório, os resultados ainda são limitados (FLOWERS *et al.*, 1997). Por outro lado, plantas tolerantes de alfalfa rapidamente dobram suas concentrações de prolina nas raízes, enquanto que as plantas sensíveis apresentam um retardamento na resposta (PETRUSA & WINICOV, 1997). Esses resultados evidenciam que o nível basal de prolina, assim como a rapidez de sua síntese, são importantes no ajustamento osmótico. Por outro lado, eles mostram também que o metabolismo desse aminoácido nas raízes deve ser mais estudado (TAIZ & ZEIGER, 1991).

Apesar de *Vigna unguiculata* ser considerada uma espécie de baixo potencial de ajustamento osmótico (McCREE & RICHARDSON, 1987), trabalho recente em nossas condições tem mostrado que, sob condições de estresse hídrico, essa espécie apresentou um incremento de cerca de 30 vezes na concentração de prolina nas raízes. O aumento foi rápido, assim como o decréscimo após a rehidratação (COSTA, 1999). Foi proposto que esse aminoácido participa do ajustamento osmótico de plantas de feijão-de-corda submetidas ao estresse hídrico. Entretanto, a efetividade da prolina como um agente que pode conferir tolerância diferencial a essa espécie ainda permanece como uma questão em aberto, inclusive para condições de estresse salino (SILVEIRA *et al.*, 1999).

Trabalho com *Acacia nilotica*, uma espécie lenhosa não halófito, porém adaptada à condição de salinidade dos solos, submetida a 75mM.L^{-1} , 100mM.L^{-1} e 200mM.L^{-1} de NaCl, mostrou que a manutenção do turgor até 100mM.L^{-1} de NaCl foi ocasionada pelos ajustamentos osmótico e elástico da parede celular (NABIL & COUDERT, 1995). Por outro lado, a intensa redução no crescimento e a mortalidade nos níveis mais elevados de NaCl devem ter sido provocados

pelo excesso de Na^+ e Cl^- nos tecidos. Apesar das concentrações de prolina nas folhas terem aumentado em função dos níveis de NaCl, os autores observaram que a adaptação inicial (até 75mM.L^{-1} de NaCl) foi devida ao ajustamento osmótico decorrente da acumulação, principalmente de Na^+ , Cl^- e K^+ .

A expansão celular em plantas submetidas ao estresse salino depende da manutenção do influxo de água, através do ajustamento osmótico (GIRMA & KRIEG, 1992). A diminuição no potencial osmótico também minimiza as perdas de água a partir das folhas, particularmente em condições de elevada demanda evapotranspiratória. Entretanto, um ajustamento osmótico ativo pode ser estabelecido somente a partir do aumento líquido na concentração dos solutos, não podendo ser confundido com acumulação passiva de solutos devida à desidratação, através da diminuição no conteúdo de água, redução no volume celular, mudanças na elasticidade do tecido ou partição da água entre simplasto e apoplasto (GIRMA & KRIEG, 1992).

Quando plântulas de milho foram submetidas à diferentes níveis de salinidade, observou-se inicialmente uma rápida absorção de Cl^- seguida de acumulação de Na^+ , Cl^- e K^+ nas raízes. Essa acumulação foi mais intensa nas partes mais maduras das raízes, proporcional à quantidade de vacúolos nos tecidos. Nessas condições, observou-se acumulação progressiva de prolina e sacarose nos tecidos apicais. Plantas pré-tratadas com 25mM.L^{-1} de NaCl apresentaram maior tolerância aos níveis mais elevados de NaCl (50mM.L^{-1} , 100mM.L^{-1} e 150mM.L^{-1}). A acumulação dos íons inorgânicos mais a de prolina e sacarose foram suficientes para o ajustamento osmótico nos níveis dos potenciais hídricos impostos nos tratamentos (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997).

Um decréscimo de -5 bar induzido pelo choque com 150mM.L^{-1} de NaCl durante a exposição inicial de 10 minutos não provocou desidratação, evidenciando que um efetivo ajustamento osmótico ocorreu nas raízes das plântulas de milho. Entretanto, esse tratamento provocou um rápido decréscimo nos potenciais de água e osmótico, enquanto que o potencial de turgor foi apenas ligeiramente reduzido (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997). Trabalho

com plantas de sorgo e milho, tolerantes à salinidade e submetidas ao estresse salino, mostrou que o turgor dos tecidos não foi limitante para o crescimento nessas condições. A maior tolerância observada nas plantas de sorgo foi relacionada com a maior exclusão de Na^+ e maior elasticidade da parede celular nas condições de estresse (ERDEI & TALEISNIK, 1993).

A capacidade de ajustamento osmótico inicial para propiciar adaptação às condições de salinidade está relacionada com o equilíbrio entre as taxas de absorção dos íons salinos e as taxas de crescimento (TALEISNIK & GRUNBERG, 1994). Se o primeiro processo exceder o segundo, acima de certos níveis críticos para cada espécie, ocorrerá uma acumulação progressiva de Na^+ e Cl^- até níveis tóxicos para o metabolismo (DURAND & LACAN, 1994). Em tomateiro, a tolerância diferencial entre cultivares está relacionada com a capacidade de manutenção de exclusão de Na^+ e Cl^- dos tecidos foliares através da retenção desses íons nas raízes e caules (TALEISNIK & GRUNBERG, 1994). Além disso, a manutenção de altas relações K^+/Na^+ pode ser um caráter favorável para a adaptação às condições de salinidade (CANO *et al.*, 1991).

A baixa tolerância à salinidade de algumas glicófitas está relacionada com a pouca habilidade para tolerar ou prevenir altos níveis de NaCl na parte aérea. Portanto, a tolerância pode depender da capacidade das raízes de limitar o acesso de Na^+ e Cl^- até a parte aérea (MUNNS, 1993). Trabalhando com plantas de soja submetidas ao estresse salino moderado, DURAND & LACAN (1994) observaram que as plantas apresentaram uma apreciável retenção de Na^+ nos caules e nas folhas mais velhas, contribuindo para o baixo transporte para as folhas mais jovens. Os autores observaram também uma elevada recirculação desse íon através do floema, contribuindo para a exclusão foliar. Por outro lado, o Cl^- acumulou-se preferencialmente nas lâminas das folhas.

Seguindo-se o processo de salinização, observa-se um forte aumento nas concentrações de Na^+ e Cl^- na seiva do xilema (MUNNS, 1988). É possível que a tolerância apresentada por plantas de cevada esteja relacionada com a

limitação do transporte de Na^+ no xilema para a parte aérea (MUNNS, 1993). Em algumas leguminosas, como *Phaseolus vulgaris* e *Glicine max*, o xilema do caule próximo das raízes é progressivamente exaurido em Na^+ , através de troca com o K^+ . A reabsorção de Na^+ pelo caule pode contribuir com a exclusão de íons salinos das folhas (DURAND & LACAN, 1994). Entretanto, em *Lupinus albus*, uma espécie sensível à salinidade, observou-se uma intensa exclusão de Na^+ através das raízes (MUNNS, 1988).

1.2.4. Utilização de nitrogênio pelas plantas.

Nos países desenvolvidos, a agricultura é dependente de fertilizantes químicos e defensivos para incrementar e manter as altas produções, que são possíveis graças ao uso de cultivares modernas de alta produtividade. Contudo, os efeitos adversos conhecidos desses químicos enfatizam a importância do desenvolvimento de novos métodos de produção que sejam sustentáveis agrônomicamente e economicamente, ambientalmente benéficos e que produza alimentos que sejam seguros para o consumo humano. O grande desafio consiste em estabelecer sistemas de cultivo mais sustentáveis, sem comprometer os níveis de produção; na verdade, o aumento na produtividade será necessário para acomodar o crescimento global da população.

O nitrogênio é o elemento do solo requerido em maior quantidade pelas culturas. Nos últimos 40 anos, o uso de nitrogênio sintético aumentou de 3 milhões para 80 milhões de toneladas, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Os gastos mundiais para a produção de fertilizantes nitrogenados excedem a 20 bilhões de dólares anuais – montante equiparável ao destinado à produção de defensivos químicos sintéticos (HARDY, 1993). A produção industrial moderna desses fertilizantes demanda grandes quantidades de energia na forma de gás natural, uma fonte de recurso não renovável. Do que é utilizado numa cultura, raramente mais de 50% é assimilado, e, freqüentemente, a eficiência de utilização é bem menor. Qualquer que seja o tipo de fertilizante nitrogenado utilizado, a ação microbiana o converte para nitrato, uma forma móvel que é assimilada pelas plantas,

sujeita a perdas pelo movimento da água ao longo do perfil do solo, podendo, dessa forma, poluir mananciais hídricos e, eventualmente, afetar ecossistemas marinhos e estuários. O nitrato pode, ainda, lixiviar-se para os lençóis freáticos, contaminando poços e, assim, por em risco a saúde humana e animal. Em solos úmidos, bactérias desnitrificantes convertem-no a óxido nitroso e nitrogênio elementar.

O nitrogênio é o elemento chave em muitos dos compostos presentes nas células das plantas, encontrado nos nucleotídeos e aminoácidos que formam a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas, respectivamente. A disponibilidade de nitrogênio para as plantas cultivadas é um importante fator na produção agrícola e isso é demonstrado pelo fato de que somente o oxigênio, o carbono e o hidrogênio são mais abundantes nas células das plantas superiores (TAIZ *et al.*, 1991). Encontra-se presente na biosfera em diversas formas. A atmosfera contém vasta quantidade de nitrogênio molecular, cerca de 78% em volume. Sua aquisição a partir da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla, excepcionalmente estável, entre dois átomos de nitrogênio, sendo que as plantas superiores são incapazes de realizar essa reação de modo direto. Por outro lado, quando presente na forma de nitrato ou amônio, é prontamente assimilado pelas plantas superiores. O consumo de plantas pelos animais permite que se movam além da cadeia alimentar, retornando ao solo por meio da morte e decomposição de plantas e animais (TAIZ *et al.*, 1991).

A conversão do nitrogênio molecular em outras formas, tais como amônio ou nitrato, é conhecida como fixação do nitrogênio, e pode ocorrer como resultado de um processo natural ou industrial. Para combinar-se com outros elementos, geralmente o hidrogênio e o oxigênio, é necessária uma energia superior a 225,8 Kcal/mol para romper a molécula de N_2 . Sob condições de elevadas temperaturas (cerca de 400°C) e pressões (cerca de 200 atmosferas), o nitrogênio molecular combinar-se-á com o hidrogênio para formar amônia. O hidrogênio para a síntese de amônia vem do gás natural de petróleo, do gás residual das refinarias, da nafta ou mesmo do álcool (TEDESCO, 1983). Essa reação, denominada de processo Haber-Bosh, é o

ponto de partida para a produção de uma variedade de produtos industriais e agrícolas. A fixação industrial de nitrogênio no mundo representa cerca de 50 milhões de toneladas anualmente, equivalente a 12% do nitrogênio global removido do montante atmosférico a cada ano (MARSCHNER, 1986).

O processo natural corresponde a uma quantidade maior de nitrogênio fixado (DELWICHE, 1983). Do total, 10% resulta dos lampejos dos relâmpagos, que causa a formação de radicais hidroxila e átomos de hidrogênio e oxigênio livres, provenientes do vapor de água e oxigênio na atmosfera, e essas espécies reativas atacam o nitrogênio molecular para formar ácido nítrico, que é carregado ao solo pelas chuvas. Os 90% restantes do nitrogênio disponível é fixado pela ação de microrganismos, por meio de um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (TAIZ, 1991).

1.2.5. Fixação simbiótica de N₂

O nitrogênio atmosférico é abundante na natureza, constituindo quase 80% do gás atmosférico. Algumas bactérias aeróbias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* possuem um complexo enzimático denominado dinitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação entre dois átomos de nitrogênio e transformá-lo em uma forma utilizável pelas plantas. Esse processo ocorre em estruturas típicas e altamente específicas, os nódulos, que são formados após o estabelecimento da simbiose entre o microssimbionte e a planta hospedeira, sendo o processo conhecido por fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

As quantidades de nitrogênio fixado e os efeitos da inoculação na produção dependem muito da estirpe do rizóbio empregada e da leguminosa cultivada. Entretanto, a importância da fixação biológica de nitrogênio para a economia nacional é evidenciada para o caso da soja, que no Brasil, como em outras partes do mundo, é cultivada usando-se, principalmente, o nitrogênio obtido pela fixação simbiótica. Considerando-se a produção nacional, esse processo representa uma economia de mais de 6 milhões de toneladas de uréia, o que equivale a aproximadamente U\$ 1,3 bilhão (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Para o caso do feijoeiro, tem-se uma situação bem diferente. A produtividade média brasileira está entre 400Kg/ha a 600Kg/ha de grãos, sendo a maior parte produzida sem adubação nitrogenada, havendo em muitos casos boa nodulação com as estirpes nativas do solo. Nessas condições, o N exportado nos grãos é de apenas 16 quilogramas de nitrogênio, portanto muito inferior ao que pode ser fixado por essa cultura, que pode alcançar de 73kg N/ha a 354kg N/ha, por ano ou ciclo, no caso do feijão-de-corda (RENNIE, 1984).

Outro aspecto interessante é a baixa resposta comumente encontrada à adubação nitrogenada em feijoeiro. Isso pode ter várias causas, mas uma delas é a presença de rizóbio eficiente no solo. Dessa forma conclui-se que, mesmo para essa cultura em que a inoculação não é difundida, a fixação biológica tem grande importância. Sua contribuição pode ser aumentada pela seleção de cultivares com maior capacidade para nodulação e eliminação dos estresses ambientais e do solo os quais, geralmente, limitam a nodulação e fixação de nitrogênio nessa cultura. O fato de o feijoeiro ser uma cultura de subsistência, evidencia a importância sócio-econômica desse processo (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

1.2.5.1. A Planta hospedeira

As leguminosas compõem a terceira maior família de plantas florícolas, sendo superadas apenas pelas famílias Compositae e Orchidaceae. Foi Andrews o primeiro a sugerir que as leguminosas se originaram nos trópicos durante o período Cretáceo Superior, caracterizado por condições tropicais úmidas em grande parte da superfície da terra. Através de adaptações e diferenciações, espalharam-se para outras zonas climáticas, havendo estimativas da existência de aproximadamente 700 gêneros e cerca de 1.800 espécies que ocorrem desde os trópicos e zonas áridas, até as regiões temperadas e temperadas-frias (NORRIS, 1968). Essas espécies estão distribuídas em quatro sub-famílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae, Papilonoideae e Swartzioideae (VINCENT, 1974).

De uma maneira geral, das 1.300 espécies da subfamília Caesalpinoideae até agora identificadas, menos de 30% nodulam. Essa subfamília é dominada por espécies arbóreas, sendo de maior ocorrência nos trópicos. Não existe grande diferença na capacidade de nodulação entre espécies das subfamílias Mimosoideae (1.500 espécies) e Papilonoideae (10.000 espécies), sendo que aproximadamente 90% das espécies de ambas subfamílias, até agora identificadas, apresentam nodulação (SIQUEIRA & FRANCO, 1988)

As leguminosas de grão, que ocupam o segundo lugar na alimentação humana e animal, sendo superadas apenas pelos cereais, são nutricionalmente duas a três vezes mais ricas em proteínas e algumas, como a soja e o amendoim, apresentam ainda alto teor de óleo. Conseqüentemente, um programa de extensão direcionado para incrementar o uso dessas plantas poderia levar à eliminação das deficiências protéicas a curto prazo em muitos países subdesenvolvidos, além de proporcionar uma considerável redução energética no processo produtivo (VIDOR *et al*, 1983).

As leguminosas também podem ser utilizadas para reflorestamento, adubação verde, produção de moirão vivo, recuperação de solos erodidos, rotação de cultura e em pastagens. Para todos esses sistemas existem espécies de leguminosas que nodulam com potencial de fixação de nitrogênio suficiente para atender sua demanda de nitrogênio para altas produções, desde que sejam escolhidos a a espécie leguminosa e rizóbio apropriados e eliminados os fatores limitantes à nodulação e simbiose, cujas exigências não são muito diferentes das exigências das plantas em si, para altas produtividades (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

1.2.5.2. O Microsimbionte

O manual de taxonomia de Bergey classifica os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* no reino *Procaryotae* e na família *Rhizobiaceae*. Recentemente, essas bactérias foram reclassificadas nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (JORDAN, 1984), formando nódulos nas raízes e, em alguns casos, no caule, fornecendo à bactéria fotossintatos e recebendo em troca

produtos nitrogenados: aminoácidos e ureídeos. A reclassificação do gênero *Rhizobium*, que era baseada na espécie da qual era isolada a bactéria, passou também a considerar as características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas da bactéria. Entretanto, não melhorou em nada a classificação dentro do grupo caupi, tendo apenas sido recomendado que após o nome *Bradyrhizobium* fosse colocado o nome do hospedeiro do qual a bactéria fora isolada. Anteriormente, usava-se *Rhizobium spp.*, grupo caupi, às vezes seguido do nome da espécie de leguminosa da qual havia sido isolado. O termo rizóbio é usado indistintamente para *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium* (SIQUEIRA & FRANCO, 1984).

As bactérias do gênero *Rhizobium* são predominantemente aeróbias, quimioautotrófica, que se desenvolvem na presença de oxigênio e utilizam carboidratos livres e uma fonte de nitrogênio (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994). Morfologicamente, são células em forma de bastonetes, com dimensões de 1,0 μ m a 3,0 μ m de comprimento e de 0,5 μ m a 0,9 μ m de largura. Não formam endosporos se movimentam móveis por meio de flagelos. Devido ao conteúdo de lipopolissacarídeos na parede celular, são definidas como gram-negativas. Metabolicamente, as espécies são geralmente classificadas como de crescimento rápido e de crescimento lento. As de crescimento rápido podem utilizar uma infinidade de fontes de carbono e acidificam o meio de crescimento. Contudo, o pH do meio nunca é inferior a 6,0. As de crescimento lento são mais seletivas quanto a fonte de carbono e o pH do meio nunca é inferior a 7,0. Essas características podem ser observadas em um meio padrão de manitol-levedura, contendo azul de bromotimol como indicador de pH, resultando uma reação ácida para as de crescimento rápido e básica para as de crescimento lento (ABD-ALLA & ABDEL WANAB, 1995). Entretanto, a característica taxonômica que mais o identifica é a sua capacidade de nodular uma leguminosa. Os nódulos formados nas raízes dessas plantas são sítios de fixação de nitrogênio, estabelecendo-se, assim, uma relação simbiótica. Contudo, é o rizóbio que possui a habilidade de fixar nitrogênio. Diferentes espécies podem utilizar diferentes fontes de nitrogênio, incluindo o nitrogênio

atmosférico, íons nitrato e amônio, aminoácidos, uréia e biureto (VICENT, 1974).

1.2.5.3. Capacidade competitiva de estirpes de rizóbio

A simbiose entre as leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* pode suprir grande parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento e produtividade das leguminosas. Entretanto, para que isso ocorra, a leguminosa deve estar eficientemente nodulada pelo rizóbio específico. Portanto, uma boa nodulação normalmente dá indicações de que a leguminosa hospedeira está se beneficiando da fixação do N₂. Para que seja abundante, torna-se necessária uma alta população do rizóbio específico, junto ou próximo à superfície radicular da planta. No entanto, nem sempre o solo apresenta alta população de estirpes eficientes e para que isso ocorra, utiliza-se a prática da inoculação artificial das sementes com estirpes de comprovada eficiência fixadora do N₂. Porém, nem sempre a introdução de estirpes eficientes por meio da inoculação irá assegurar uma nodulação eficiente, principalmente em solos contendo uma população estabelecida do rizóbio específico. Conseqüentemente, a nodulação é dependente de uma série de fatores envolvendo a leguminosa hospedeira, o rizóbio, o solo e a interação dos três. A ação conjunta desses fatores poderá limitar ou estimular esse processo, o que irá se refletir sobre a quantidade de nitrogênio fixado e sobre a produtividade da leguminosa (VIDOR *et al.*, 1983).

Para que se assegure uma boa nodulação, as estirpes que compõem os inoculantes devem apresentar as seguintes características: a) comprovada eficiência fixadora em experimentação de campo; b) apresentar amplo espectro de nodulação e eficiência (baixa especificidade hospedeira); c) apresentar capacidade de colonizar e sobreviver no solo; d) apresentar alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular. O preenchimento dessas quatro características é de grande valia no aumento da produtividade das leguminosas porque evitariam possíveis riscos de ocorrência de nodulação ineficiente ocasionada por estirpes neutralizadas de baixa eficiência, mas com alta capacidade de competitividade por sítios de infecção nodular (VIDOR *et al.*,

1983).

A primeira etapa num programa de seleção de estirpes relaciona-se com a avaliação do potencial de fixação das estirpes em experimentos conduzidos em casa de vegetação, em areia e solução nutritiva. As estirpes com alta atividade fixadora de nitrogênio determinarão um maior peso de matéria seca da parte aérea e/ou maior concentração de nitrogênio total. Em continuação, as melhores estirpes devem ser avaliadas quanto a sua especificidade hospedeira em termos de fixação de nitrogênio e a capacidade competitiva por sítios de infecção nodular, tanto em areia e solução nutritiva como em solo em casa de vegetação. Nas pesquisas com solo em casa de vegetação, também são avaliados os efeitos de fatores relacionados com o solo que podem deprimir a fixação e, conseqüentemente, mascarar o potencial da estirpe. Algumas estirpes são bastante eficientes em areia e solução nutritiva, mas são incapazes de contribuir significativamente quando testadas em condições de campo (VIDOR et al., 1983).

1.2.6. Bioquímica e Fisiologia da Fixação Biológica de Nitrogênio

A reação química global do processo de fixação de nitrogênio é representada por:



Como visto, o processo requer uma fonte de prótons e elétrons e várias moléculas de ATP. Além disso, a produção de um H₂ formado por N₂ reduzido, parece obrigatória (HAAKER, 1988). Também requer um complexo enzimático denominado nitrogenase, que catalisa vários outros substratos incluindo o acetileno, a azida, o óxido nitroso etc.

A fonte original de elétrons e prótons provém dos carboidratos translocados a partir das folhas e oxidado pelas bactérias, levando à redução do NAD⁺ a NADH ou de NADP⁺ a NADPH. Alternativamente, em alguns organismos fixadores de nitrogênio, a oxidação do piruvato durante a respiração causa a redução de uma proteína denominada flavodoxina; desse modo, flavodoxina,

NADH ou NADPH reduzem a ferredoxina ou proteínas similares que são altamente eficientes na redução do N_2 a NH_4^+ . A nitrogenase aceita elétrons da flavodoxina, ferredoxina ou outros agentes redutores ao catalisar a fixação do nitrogênio. Ela consiste de duas proteínas distintas, frequentemente denominadas de Ferro-proteína e Ferro-Molibidênio-proteína. O ferro e o molibidênio tornam-se reduzidos e são oxidados quando a nitrogenase recebe elétrons da ferredoxina e os transfere ao N_2 para produzir NH_4^+ . O ATP é essencial no processo porque liga-se à ferro-proteína, tornando-a um forte agente redutor e ao transferir os elétrons para a ferro-molibidênio-proteína promove a hidrólise do ATP a ADP (TAIZ & ZEIGER, 1991).

As proteínas que compõem o sistema nitrogenase são sensíveis a concentrações elevadas de oxigênio que promovem a sua desnaturação. A leghemoglobina controla a disponibilidade de oxigênio no bacteróide, encontrando-se presente no citoplasma das células infectadas dos nódulos, conferindo ao nódulo a cor rósea interna característica. A porção globina é produzida pela planta hospedeira em resposta à infecção pela bactéria (MARSCHNER, 1986), e a porção heme pelo microsimbionte (APPLEBY, 1984).

o citoplasma das células onde estão contidos os bacteróides, a amônia - provavelmente como íon amônio, é convertida em glutamina, ácido glutâmico e asparagina e em muitas espécies, em compostos ricos em nitrogênio denominados ureídeos. Os dois principais ureídeos presentes nas leguminosas são a alantoína e o ácido alantóico, que como a asparagina, possuem uma relação C:N relativamente alta. Cada um desses três compostos representam a principal forma de nitrogênio translocado dos nódulos para outras partes da planta. A asparagina predomina em leguminosas de origem temperada e os ureídeos naquelas de clima tropical (SCHUBERT *et al.*, 1978).

A amônia e os íon amônio não se acumulam nas células das plantas, sendo rapidamente incorporados em compostos orgânicos, mediante duas vias. A primeira, envolve a aminação redutiva do alfa-cetoglutarato, produzindo glutamato, reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase, encontrada

nos cloroplastos, bem como nas mitocôndrias. Nas mitocôndrias, teria um abundante suprimento de NADH e alfa-cetoglutarato continuamente produzidos pelo ciclo de Krebs. A segunda, envolve uma reação com o glutamato, formando a sua amida, a glutamina, reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, que requer energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). A glutamina pode então ser convertida a duas moléculas de glutamato, reação catalisada pela enzima glutamato sintase, localizada nos cloroplastos e no citosol das folhas e no citosol de células de raízes (OAKS & HIREL, 1985).

As duas vias resultam na produção de glutamato, mas discute-se qual das duas é a mais importante na assimilação da amônia. Ensaio enzimáticos têm revelado que a GDH possui um valor K_m relativamente alto para a amônia (BEEVERS & HAGEMAN, 1983). O K_m corresponde à concentração de amônia na qual a enzima produz metade de sua velocidade máxima. O valor de K_m para a GDH encontra-se dentro de níveis considerados tóxicos para as células das plantas. Dessa forma, a enzima não contribuiria para o metabolismo da amônia a níveis muito mais baixos encontrados nas células. A glutamina sintetase tem um valor K_m muito mais baixo para a amônia. Essa diferença na concentração de amônia na qual essas duas enzimas operam tem levado muitos pesquisadores a considerar a segunda via a mais lógica para a incorporação do $N-NH_4^+$ (TAIZ & ZEIGER, 1991).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos sob condições de casa-de-vegetação, no campus da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Estado do Ceará. O Experimento I foi conduzido de setembro a novembro de 1998 e o Experimento II, de março a abril de 1999.

2.1. Condições ambientais

Prevaleceram as condições naturais de luminosidade da cidade de Fortaleza, atingindo valor máximo às 12:00 horas e fotoperíodo com duração média de 12 horas. A temperatura média no interior da casa-de-vegetação variou entre 28 e 36°C durante o dia e 24 e 27°C durante a noite, registrando-se variações na umidade relativa do ar de 40 a 80%.

2.2. Substrato para cultivo das plantas

O substrato utilizado constituiu-se de uma mistura de sílica : vermiculita, na proporção de 1:2 (v:v), esterilizado por autoclavagem, à temperatura de 120°C, pressão manométrica de 1 atm, durante uma hora, por duas vezes, com intervalo de 24 horas, acondicionado, em seguida, em vasos de Leonard modificados, desinfestados com hipoclorito de sódio 5%. Procedeu-se a saturação do substrato com solução de CaCO₃ 0,1mM, para favorecer as condições ótimas de pH e suprimento de cálcio.

2.3. Origem, tratamento e plantio das sementes

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (Walp) L.], cultivares Vita 3 e Vita 7, foram fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa do Meio

Norte/EMBRAPA, Teresina, Piauí.

A desinfestação das sementes foi realizada imergindo-as inicialmente em álcool 70% por três minutos. Após a drenagem do álcool, foram imersas em hipoclorito de sódio 1%, durante três a quatro minutos e, em seguida, lavadas com água esterilizada para eliminar resíduos do produto, para evitar danos à germinação.

As sementes foram plantadas diretamente nos vasos, em número de oito, selecionando-se as mais vigorosas após a germinação, permanecendo duas plantas por vaso, após o raleamento.

2.4. Origem e multiplicação da estirpe de rizóbio e inoculação das plântulas

A estirpe de rizóbio utilizada foi a BR 3256, liofilizada, fornecida pelo Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia/EMBRAPA, originária do Zimbábue e isolada de *Vigna unguiculata*. As bactérias foram cultivadas em meio composto de extrato de levedura-manitol, pH 6,8. Padronizou-se a concentração de 10^9 células/ml para fim de inoculação, por meio da comparação com os padrões do nefelômetro de McFarland. A inoculação foi feita em três etapas: emissão da radícula, emissão da plântula e emissão do primeiro par de folhas definitivas, adicionando-se um mililitro do inoculante por plântula.

2.5. Nutrição das plantas

A nutrição das plantas foi feita por meio de solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada, conforme a seguinte composição, para ambos os experimentos, pH $6,0 \pm 0,3$: K_2SO_4 0,5M; K_2HPO_4 1,0M; KH_2PO_4 1,0M; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,0M; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0M; Fe(EDTA): a) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1M; b) $Na_2(EDTA)$ 0,08M; H_3BO_3 0,04M; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,009M; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,0003M; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0007M; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0001M; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,004M; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 1,0M. A solução nutritiva foi fornecida apresentando 1/5 da concentração iônica inicial durante as duas primeiras semanas de

estabelecimento das plântulas; após essa fase, foi fornecida sem diluição. Procedeu-se a troca da solução a cada dois dias, fazendo-se a reposição de água nos vasos quando necessária.

2.6. Descrição dos Experimentos

2.6.1. Experimento I

No Experimento I foram utilizadas plantas da cultivar Vita 7, todas inoculadas. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com dois níveis de cloreto de cálcio (0 e 10mM.L⁻¹) e cinco níveis de cloreto de sódio (0, 50mM.L⁻¹, 100mM.L⁻¹, 200mM.L⁻¹ e 400mM.L⁻¹), com três repetições, perfazendo um total de trinta parcelas. Vinte e sete dias após a emergência, as plantas foram submetidas à salinidade por um período de quatro dias, sendo posteriormente coletadas. As concentrações de cloreto de sódio de 50mM.L⁻¹, 100mM.L⁻¹, 200mM.L⁻¹ e 400mM.L⁻¹, correspondem, respectivamente, à condutividade elétrica de 6,12mS/cm, 11,62mS/cm, 22,70mS/cm e 43,6mS/cm.

2.6.2. Experimento II

No Experimento II foram utilizadas plantas das cultivares Vita 3 e Vita 7, todas inoculadas. Os tratamentos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com três níveis de cloreto de sódio (0, 50mM.L⁻¹ e 200mM.L⁻¹) e dois níveis de nitrato (1mM.L⁻¹ e 10mM.L⁻¹), com três repetições, perfazendo um total de trinta e seis parcelas. O tratamento com 50mM.L⁻¹ foi aplicado ainda na fase de plântula durante vinte e sete dias. O tratamento com 200mM.L⁻¹ foi aplicado aos vinte e cinco dias sobre as plantas do controle e as tratadas com 50mM.L⁻¹, durante quatro dias, quando então foram coletadas.

2.7. Parâmetros analisados

2.7.1. Determinação de massa fresca e massa seca

As plantas foram coletadas às 9:00 horas e separados o caule, folhas e nódulos. Em seguida, as partes foram pesadas separadamente para

determinação da massa fresca. Uma amostra das folhas foi coletada para determinar a porcentagem de umidade e a massa seca, em estufa, com circulação de ar forçada, a 70°C. Imediatamente após a coleta, todo o material foi congelado com nitrogênio líquido e mantido em freezer (-20°C) até a liofilização.

2.7.2. Extração e determinação do teor de Proteínas Solúveis Totais em Folhas e Nódulos

O teor das proteínas solúveis totais de nódulos e folhas foi determinado pelo método colorimétrico de BRADFORD (1976). Os nódulos foram triturados em almofariz banhado em gelo e resfriado com nitrogênio líquido (-196°C). Adicionou-se 0,1g de nódulo seco liofilizado em 5mL de tampão HEPES 0,1M, pH 8,0, contendo KOH 0,1M, ditioneitol 5mM e EDTA-Na 0,2M. Centrifugou-se a 30.000g, em centrífuga refrigerada por 30 minutos. O sobrenadante foi congelado para posterior análise. Tomou-se um grama de folha seca liofilizada em 10mL de tampão Tris-HCl 25mM, pH=7,6, contendo MgCl₂ 10mM, β-2-mercaptoetanol 10mM, EDTA-Na 5mM e PVP solúvel 5% (p/v). Centrifugou-se e o sobrenadante foi congelado. A reação foi preparada em tubo de ensaio, adicionando-se 100μL de extrato a 2,5mL do reagente de Bradford. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nanômetros (nm). A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada a partir da curva padrão de B.S.A.

2.7.3. Atividade *in vivo* da redutase de nitrato em folha

O método utilizado para determinação da atividade *in vivo* da redutase de nitrato foi o de HAGEMAN & HUCKLESBY (1971). Amostras de 200mg de tecido vegetal (discos foliares com diâmetro aproximado de 0,5cm) foram acondicionadas em tubos de ensaio, tipo "vacuntiner", contendo 5,0mL da solução de incubação (tampão fosfato 0,1mM.L⁻¹, pH 7,5; isopropanol 1,0% (v/v); KNO₃ 50mM.L⁻¹; clorafenicol 1,5% m/v). Os tubos foram envoltos em papel alumínio de modo a proteger o meio de reação da luz. Em seguida, procedeu-se a realização de vácuo, com auxílio de uma bomba de sucção, durante dois minutos, para produzir no interior dos tubos um ambiente

anaeróbio.

Logo após, os tubos de ensaio foram acondicionados em banho-maria, durante 30 minutos, a uma temperatura de 35°C, seguindo-se a retirada de alíquotas de 2,0mL que foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,0ml da solução de reação (1,0mL de sulfanilamida 1,0% em HCl 2,4mM.L⁻¹ e 1,0mL de N-1-naftilenodiamina dicloridrato 0,02%). Decorridos 15 minutos, as soluções foram lidas em espectrofotômetro a 540nm. A atividade da redutase de nitrato foi mensurada a partir da formação de nitrito no meio de reação, por meio de um reta padrão ajustada com concentrações crescentes de KNO₂.

2.7.4. Concentração de prolina livre

A determinação dos teores de prolina livre seguiu a metodologia de BATES *et al.*, (1973). Amostras de tecido vegetal, previamente liofilizadas, foram maceradas na presença de 3,0mL de ácido sulfossalicílico 3% (m/v). Em seguida, 2,0mL do extrato produzido foram transferidos para tubos tipo "ependorf", centrifugado a 12.000g, por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. Alíquotas de 1,0mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,0mL de ninhidrina ácida (1,0g do reagente ninhidrina em 24,0mL de ácido acético glacial P.A. e 16,0mL de ácido fosfórico 6,0mol.L⁻¹) e 1,0mL de ácido acético glacial concentrado.

Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 100°C, durante uma hora. A reação foi interrompida pela redução da temperatura do meio de reação, mediante o contato dos tubos de ensaio com água a 2°C. Em seguida, uma alíquota de 2,0mL de tolueno foi adicionada ao meio de reação. Após agitação, por aproximadamente 15 segundos, duas fases foram formadas. A fase aquosa superior, de coloração avermelhada (cromóforo + tolueno), foi recuperada e submetida a leitura em espectrofotômetro a 520nm. Os teores de prolina livre foram estimados com base em um reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-prolina.

2.7.5. Atividade de glutamina sintetase (GS)

Amostras de 0,1g de nódulo e 0,2g de folha foram trituradas na presença de nitrogênio líquido e maceradas, por 5 minutos, em meio contendo 12mL de tampão de extração (Tris-HCl 25mM.L⁻¹, pH 7,6; EDTA-Na 5,0mM.L⁻¹; 2-β-mercaptoetanol 10,0mM.L⁻¹; polivinilpolipirrolidone 5%). Após a extração, procedeu-se a centrifugação a 30.000g, por 30 minutos, a 4°C. A mensuração da atividade de glutamina sintetase seguiu o método biossintético do hidroxamato descrito por SILVEIRA *et al.*, (1998). Alíquotas de 0,5mL de extrato foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 0,6mL de tampão Tris-HCl 0,25mol.L⁻¹ pH 7,6; 0,2mL de Na-glutamato 0,30mol.L⁻¹; 0,2mL de ATP 30mM.L⁻¹; 0,2mL de MgSO₄ 0,50mol.L⁻¹. A reação foi iniciada por intermédio da adição ao meio de 0,2mL da mistura (NH₂OH.HCl 1,0mM.L⁻¹ e NaOH 1,0mM.L⁻¹). Após incubação em banho-maria, por 30 minutos, a 32°C, a reação foi paralisada adicionando-se FeCl₃ 10% (m/v) em HCl 0,2mol.L⁻¹; ácido tricloracético 24% (m/v) e HCl 50% (v/v). Subseqüentemente, a solução foi centrifugada a 7.000g, por 10 minutos, à temperatura ambiente, e sua absorbância lida a 540nm. A atividade de glutamina sintetase foi determinada a partir do ajuste de uma reta padrão com concentrações crescentes de γ-glutamil-hidroximato.

2.7.6. Concentração de clorofila total

A determinação da concentração de clorofila total seguiu a metodologia descrita por WHITHAM *et al.*, (1971). Cinquenta miligramas de folhas liofilizadas foram maceradas, por 5 minutos, em 20mL de acetona 80% (v/v). Após a centrifugação a 8.000g, por cinco minutos, alíquotas da solução foram tomadas para leitura em espectrofotômetro a 652nm. A concentração de clorofila total foi determinada a partir da seguinte relação: clorofila total = $(A_{652} \times 1000 \times V / 1000MS) / 34,50$, em que A, corresponde a absorbância no comprimento de onda (nm) indicado; V, ao volume final do extrato de clorofila expresso em mL; e MS, a matéria seca expressa em gramas.

2.7.7. Concentração de aminoácidos livres totais (N- α -amino)

A concentração dos aminoácidos livres totais foi determinada pelo método de PEOPLES *et al.* (1989). 100mg de folha e nódulo liofilizados foram adicionados a tubos de ensaio, hermeticamente fechados, contendo 5,0mL de água deionizada e incubados em banho-maria, a 100°C, por 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 6.000g, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspendido em 5,0mL de água deionizada e reprocessado, conforme citado anteriormente. Após aferição com água em tubos de ensaio graduados, o volume final de extração foi elevado para 10mL. A reação para dosagem dos aminoácidos livres totais foi conduzida em tubos de ensaio contendo 0,1mL do extrato, 1,0mL de tampão citrato 0,2mol.L⁻¹, pH 5,0, 1,0mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,1mM.L⁻¹ e ninhidrina 5%, em methoxyetanol) e 4,0mL de água deionizada. Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram postos em banho-maria, a 90°C, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela redução da temperatura do meio de reação para 2°C. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 570nm. Os teores de aminoácidos livres totais foram determinados com base em um reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma mistura padronizada de L- asparagina e L- glutamina.

2.7.8. Extração e determinação de Leghemoglobina

Utilizou-se o método colorimétrico da cianometahemoglobina de WILSON & REISENAUER (1963) e DAKORA (1995), com algumas modificações. 0,2g de nódulos liofilizados em 10ml de solução de Drabkin (KCN, 0,8mM, K₃Fe(CN)₆, 0,6mM, NaHCO₃, 12mM, H₂O deionizada, q.s.p.). Centrifugou-se a 500g por 15 minutos, completando-se o volume com solução de Drabkin para 10mL (volume final), misturando-se os extratos. Em seguida, centrifugou-se a 30.000g em centrífuga refrigerada por 30 minutos. Fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540nm, usando-se a solução de Drabkin como controle. A concentração de leghemoglobina foi determinada a partir da curva padrão de hemoglobina (20mg/mL).

2.7.9. Concentração de cloreto

O método utilizado para estimativa do teor de cloreto na planta foi o da titulação com nitrato de prata, descrito por SILVEIRA *et al.*, (1999). Cem miligramas de folhas liofilizadas em 25mL de água deionizada, acondicionados em Erlenmeyer, foram submetidos à extração, utilizando-se agitador horizontal a 100rpm, por 10 minutos. Após filtração, alíquotas de 10mL do sobrenadante foram tratadas com 1,0mL do indicador cromato de potássio 5% (m/v), titulando-se com nitrato de prata 28mM.L⁻¹. Cada mililitro de nitrato de prata gasto na titulação correspondeu a 2,5mg de cloreto em 100mg de massa seca.

2.7.10. Concentrações de sódio e de potássio

Cem miligramas de folha liofilizada foram mineralizadas por via úmida, empregando-se a digestão nitroperclórica (SARRUGE & HAAG, 1974). Os seus teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, conforme descrito em SILVEIRA *et al.* (1999).

2.7.11. Nitrogênio total

Cem miligramas de folha liofilizadas foram adicionadas a tubos de microdestilação contendo 1,5mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,10g de uma mistura catalizadora composta por sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio, na proporção, em massa, de 100/10/1, respectivamente. Procedeu-se a digestão, elevando-se gradualmente a temperatura da placa até 350°C. Ao final do processo de mineralização, o conteúdo de cada tubo foi ressuspendido com água destilada (aproximadamente 20mL) e adicionados 0,3mL de fenolftaleína 3% e 10mL de NaOH 30%. Nessa etapa, os tubos foram submetidos à microdestilação (MALAVOLTA *et al.*, 1989), sendo a fase líquida recuperada em erlenmeyer contendo 6,0mL de uma solução de ácido bórico 0,020N. O conteúdo de cada Erlenmeyer foi titulado com uma solução 20mM.L⁻¹ de HCl, sendo o percentual de nitrogênio total calculado mediante a multiplicação do volume gasto na titulação (menos prova em branco) pela normalidade do HCl.

2.7.12. Concentração de nitrato

Cem miligramas de folha liofilizada foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 5,0mL de água deionizada e incubados em banho-maria, por 30 minutos, a 100°C. Centrifugou-se a 5.000g, por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante e o precipitado ressuspendido em 5,0mL de água deionizada, repetindo-se a extração, conforme procedimento acima. Aferiu-se o volume final do extrato para 10mL com água deionizada, utilizando-se tubos de ensaio graduados. Para eliminação de interferentes orgânicos, o extrato foi submetido a um tratamento químico: 2,0mL do extrato foram tratados com 0,2mL de CaCl_2 e 0,2mL de NaOH, $2,0\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Após uma hora do início da reação, à temperatura ambiente, procedeu-se a centrifugação a 5.000g, por 10 minutos. Alíquotas foram tomadas para estimativa dos teores de nitrato no tecido vegetal, de acordo com o método do ultravioleta (CAWSE, 1967), com modificações.

2.7.13. Concentração de amônio livre

Cem miligramas de folha e nódulo liofilizados foram submetidos a extração em meio contendo 4,0mL de KCl $1,0\text{mol.L}^{-1}$, pH 5,0, em agitador circular, a 25°C, por 6 horas. Após centrifugação, a 10.000g, por 5 minutos, 0,4mL dos extratos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 2,5mL da solução de reação A (5g de fenol e 0,025g de nitroprussiato de sódio e água deionizada para 500 de solução). Após agitação, foram acrescentados 2,5mL da solução de reação B (2,5g de NaOH e 12,6mL de hipoclorito de sódio comercial e água deionizada para 500mL de solução), incubando-se em banho-maria, a 37°C, por 20 minutos (FELKER, 1977). Após uma hora, as amostras foram lidas em espectrofotômetro, comprimento de onda de 625nm.

2.7.14. Determinação de ureídeos

Foi utilizado o método descrito por PEOPLES *et al.*, (1989). Cem miligramas de folha e nódulo liofilizados foram adicionados a 5,0mL de água deionizada, em tubos de ensaio, hermeticamente fechados, postos à fervura em

banho-maria a 100°C, por 30 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante, ressuspensando-se o precipitado, conforme o procedimento anteriormente citado. Aferiu-se o volume final para 10mL em tubo de ensaio graduado com água deionizada. A reação foi preparada em tubo de ensaio com rolha, adicionando-se 0,1mL de extrato e 1,15mL de água deionizada. Em seguida, adicionou-se 0,25mL de NaOH 0,5M, aqueceu-se em banho-maria a 100°C, por 15 minutos. Adicionou-se 0,25mL de HCl 0,65M, retornando ao banho-maria a 100°C, por 4 minutos. Resfriou-se, imediatamente, na água com gelo, durante 15 minutos e adicionou-se 0,25mL de tampão fosfato 0,4M, pH 7,0 e 0,25mL de fenilhidrazina, 1,25mL de HCl concentrado e pré-resfriado e 0,25mL de ferricianeto de potássio 0,05M. Deixou-se à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 535nm, usando-se água deionizada e demais reagentes como controle. A concentração de ureídeos foi determinada a partir da curva padrão com alantoína.

2.7.15. 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, na 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 0,5M, pH 6,8 e SDS a 1% (p/v). O gel de separação, com 17,5% de poliacrilamida, foi preparado com tampão TRIS-HCl 3,0M, pH 8,8, contendo SDS a 1% (p/v).

As amostras das farinhas dos nódulos e folhas liofilizadas (aproximadamente 2,5mg/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 0,0625M, pH 8,3 contendo SDS a 1%. A cada suspensão foi adicionada uma gota de β -2 mercaptoetanol (1%), 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 foram acrescentados aos extratos antes das mesmas serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à amperagem constante (20mA), com duração média de 4 horas. Após a corrida, o gel foi colocado para corar durante uma noite em "coomassie brilliant blue R-250" a 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). Utilizou-se as proteínas albumina bovina (66kDa), ovalbumina,(45kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica bovina (29kDa), Tripsinogênio de pâncreas bovino (24kDa), inibidor de tripsina de soja (20kDa) e α -lactalbumina (14,2kDa) foram usados como marcadores de massa molecular.

2.7.16. 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 9:00h da manhã. Todos os vasos foram colocados em presença de água destilada durante 30 minutos a fim de induzir a pressão radicular. Após isso, 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 1,0mL, durante 60 minutos, sendo desprezada a seiva inicial. O volume da seiva foi aferido e em seguida mantido em frasco de vidro, em freezer, até o momento da análise.

A reação foi realizada utilizando-se 5 μ L de seiva do xilema, 745 μ L de água deionizada e 250 μ L de NaOH 0,5M. Aqueceu-se em banho-maria a 100°C, por 8 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 250 μ L de HCl 0,65M e reaqueceu-se em banho-maria a 100°C por 4 minutos. Resfriou-se, em banho de gelo e adicionou-se 250 μ L de tampão fosfato 0,4M, pH 7,0 e 250 μ L de fenilhidrazina (0,066g/20mL de água) . Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e então colocados em água gelada. A seguir,

adicionou-se 1250 μ L de HCl concentrado, resfriado, 250 μ L de ferricianeto de potássio (0,417g em 25mL de água) . Retirou-se os tubos da água gelada, deixando-os à temperatura ambiente por 15 minutos, até desenvolverem uma cor rósea ou vermelha. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 535nm, usando-se água deionizada e demais reagentes como controle. A concentração de N-ureídeo foi determinada utilizando-se uma curva padrão com alantoína.

3. RESULTADOS

3.1. Efeitos da salinidade sobre o crescimento de nódulos e folhas de feijão-de-corda, em experimentos de curta e de longa duração

Os efeitos da salinidade sobre o crescimento das plantas noduladas de feijão-de-corda foram estudados a partir de diferentes situações experimentais. No Experimento I, plantas da cultivar Vita 7 foram inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência de NaCl e em presença de 1mM.L^{-1} de nitrato. Aos 27 dias após a inoculação, na fase de crescimento acelerado dos nódulos (SILVEIRA *et al.*, 1998), foram adicionados níveis crescentes de NaCl (0 , 50mM.L^{-1} , 100mM.L^{-1} , 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}), combinados com duas concentrações de Ca^{+2} (CaCl_2) : 0 e 10mM.L^{-1} , na solução nutritiva, durante quatro dias consecutivos. Como os nódulos de feijão-de-corda já se encontravam estabelecidos nessa época, a despeito de seu crescimento do tipo indeterminado, assumiu-se que os efeitos do NaCl foram preponderantemente sobre o metabolismo e crescimento dos nódulos e não envolveram fundamentalmente o processo de nodulação.

No experimento II, plantas de duas cultivares de feijão-de-corda (Vita 3 e Vita 7), foram inoculadas na ausência (controle) e na presença de um baixo nível de NaCl (50mM.L^{-1}) e irrigadas continuamente desde a emergência até os 27 dias após a inoculação. Nessa fase, um lote de plantas pré-cultivadas com NaCl recebeu um choque salino de 200mM.L^{-1} , durante quatro dias consecutivos. Dessa maneira, foi possível investigar os efeitos acumulativos de um nível de baixa toxicidade de NaCl (MELO, 1999), bem como a possível adaptação das plantas ao receberem um choque salino. Por outro lado, foi

possível comparar os efeitos da presença de dois níveis contrastantes (1mM.L^{-1} (baixo) e 10mM.L^{-1} (alto) de nitrato, sobre a nutrição nitrogenada e a tolerância ao estresse salino das plantas noduladas, de ambas cultivares.

A Figura 1 mostra que a adição de NaCl induziu reduções na massa fresca de folhas e nódulos a partir do nível de 100mM.L^{-1} . Entretanto, os efeitos foram mais evidentes nos níveis de 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} . A ação tóxica da salinidade foi mais negativa para o crescimento das folhas do que para o de nódulos, apesar do decréscimo na massa desses ter sido aproximadamente constante, em função das doses do sal. Assim, a 400mM.L^{-1} , a massa das folhas foi reduzida para cerca de 57% do tratamento controle, enquanto que a massa dos nódulos foi reduzida para aproximadamente 73% do controle. A adição de um nível alto de Ca^{+2} (10mM.L^{-1}) na solução nutritiva promoveu uma proteção ao crescimento das folhas, em relação ao tratamento com ausência de Ca^{+2} , durante os quatro dias de tratamento. Por outro lado, não se observou um efeito evidente do Ca^{+2} no crescimento dos nódulos das plantas tratadas com NaCl (Figura 1). Deve ser ressaltado, entretanto, que anteriormente (durante 27 dias), todas as plantas haviam sido supridas com solução nutritiva contendo 3mM.L^{-1} de Ca^{+2} .

A despeito dos tratamentos com os níveis mais elevados (200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}) terem induzidos sintomas visuais de toxicidade nas folhas (clorose generalizada, "queima" nas extremidades dos folíolos jovens e manchas necróticas no limbo), a partir do segundo dia de tratamento, verificou-se que o conteúdo de água (umidade) nas folhas e nódulos não foi alterado pelo estresse (dados não apresentados). Além disso, as plantas tratadas com Ca^{+2} apresentaram sintomas visuais de menor toxicidade nas folhas. Por outro lado, os nódulos não apresentaram sintomas de senescência ou de qualquer anomalia visual, após os quatro dias de tratamento. O consumo de água pelas plantas foi drasticamente reduzido pela presença do NaCl, sendo que nos níveis mais elevados a transpiração foi praticamente reduzida a zero no intervalo de 24 horas do segundo dia de tratamento (Figura 2). Imediatamente após a adição dos níveis mais elevados de NaCl, observaram-se sintomas visuais de

diminuição na turgescência foliar que desapareceram cerca de 1 hora a partir do início do seu surgimento.

O efeito mais intensivo do choque salino sobre as folhas das plantas do Experimento I pode ser visualizado através do expressivo decréscimo na concentração de clorofilas totais (Figura 2). Como podem ser observados, os tratamentos com 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} provocaram reduções apreciáveis na concentração de clorofilas. Com 400mM.L^{-1} , a concentração de clorofilas foi reduzida em aproximadamente 50% em relação ao controle. De fato, após a adição do choque salino (nos dois níveis mais elevados), observou-se uma clorose generalizada nas folhas das duas cultivares, a partir do segundo dia de tratamento, evidenciando, de um lado, os efeitos tóxicos do NaCl e por outro, a maior susceptibilidade dos tecidos das folhas em relação às raízes e nódulos.

A massa fresca das folhas das cultivares Vita 3 e Vita 7, cultivadas na presença de 1mM.L^{-1} ou 10mM.L^{-1} de nitrato, na presença ou na ausência de 50mM.L^{-1} , desde a inoculação (Experimento II), foi semelhante entre as cultivares (Figura 3). Isso evidencia que as plantas inoculadas na presença de baixo nível de nitrato, portanto supridas quase exclusivamente com o nitrogênio, apresentaram excelente nodulação e intensa fixação biológica de nitrogênio. A cultivar Vita 3, nodulada na presença de baixo nível de nitrato, apresentou uma maior tolerância relativa no nível moderado de NaCl, comparada com a outra cultivar. A primeira cultivar mostrou uma massa de folhas correspondente a 75% do controle, enquanto que Vita 7 exibiu valores de apenas 52% (Figura 3). Já na presença de alto nível de nitrato, as duas cultivares não mostraram diferenças quanto à resposta aos tratamentos com NaCl. Ambas cultivares apresentaram valores de massa de folhas de 70% do controle no tratamento com 50mM.L^{-1} de NaCl. A adição do choque salino de 200mM.L^{-1} sobre as plantas pré-cultivadas com 50mM.L^{-1} , provocou, de modo geral, respostas similares nas duas cultivares (Figura 3), em termos de redução na fitomassa das plantas, o qual situou-se em torno de 60% das plantas tratadas somente com 50mM.L^{-1} de NaCl.

A variação da massa fresca dos nódulos, nas duas cultivares e nos diversos tratamentos, seguiu, de modo geral, a mesma tendência da apresentada pelas folhas (Figura 3). Dessa maneira, a cultivar Vita 3 mostrou menor redução relativa na massa dos nódulos nas plantas cultivadas na presença de 50mM.L^{-1} (86% do controle), comparada com a Vita 7 (60% do controle). Além disso, os valores absolutos da massa de nódulos dessas plantas, nesse tratamento, foram maiores na Vita 3: 2,52 contra 1,65g de MF(matéria fresca)/planta. De um modo geral, o efeito do choque salino com 200mM.L^{-1} foi semelhante sobre o crescimento dos nódulos das duas cultivares. Por outro lado, o tratamento com alto nível de nitrato (10mM.L^{-1}), não inibiu totalmente a nodulação, como poderia ser esperado, em ambas cultivares. Assim, a massa dos nódulos de Vita 3 atingiu valores de 30%, enquanto que para Vita 7 observou-se valores de 18%, quando se comparou com a massa dos nódulos das plantas inoculadas na presença de baixo nível de nitrato, ambas na ausência de NaCl (Figura 3). Portanto, Vita 3 exibiu maior tolerância tanto à presença de sal, quanto ao nível de 10mM.L^{-1} de nitrato.

As plantas tratadas com NaCl, nas duas cultivares, não mostraram diferenças no conteúdo de água (% de umidade) de folhas e nódulos (dados não apresentados). A despeito das diferenças na morfologia externa das folhas das duas cultivares (Vita 3 com folhas do tipo globosa e Vita 7 com folhas do tipo lanceolada), não foram observadas diferenças significativas quanto à suculência foliar (gMF/cm^2) – (Figura 4). Como não ocorreram diferenças na porcentagem de umidade, é possível inferir que essa medida relaciona o conteúdo de solutos por unidade de área do tecido foliar. Em Vita 3, o tratamento com 50mM.L^{-1} provocou aumento na suculência foliar. Entretanto, em Vita 7 não se observou efeito significativo do NaCl sobre a suculência. É interessante observar que os efeitos visuais do choque salino com 200mM.L^{-1} , durante 4 dias, sobre as plantas previamente cultivadas com 50mM.L^{-1} , foram menos intensos do que aqueles observados no Experimento I, quando se adicionou o mesmo nível de 200mM.L^{-1} sobre plantas anteriormente cultivadas na ausência de NaCl, inclusive as concentrações de clorofilas não significativamente reduzidas, particularmente em Vita 7 (Figura 4). As

fotografias de números 1 a 7 ilustram os aspectos visuais das duas cultivares, submetidas aos diferentes tratamentos.

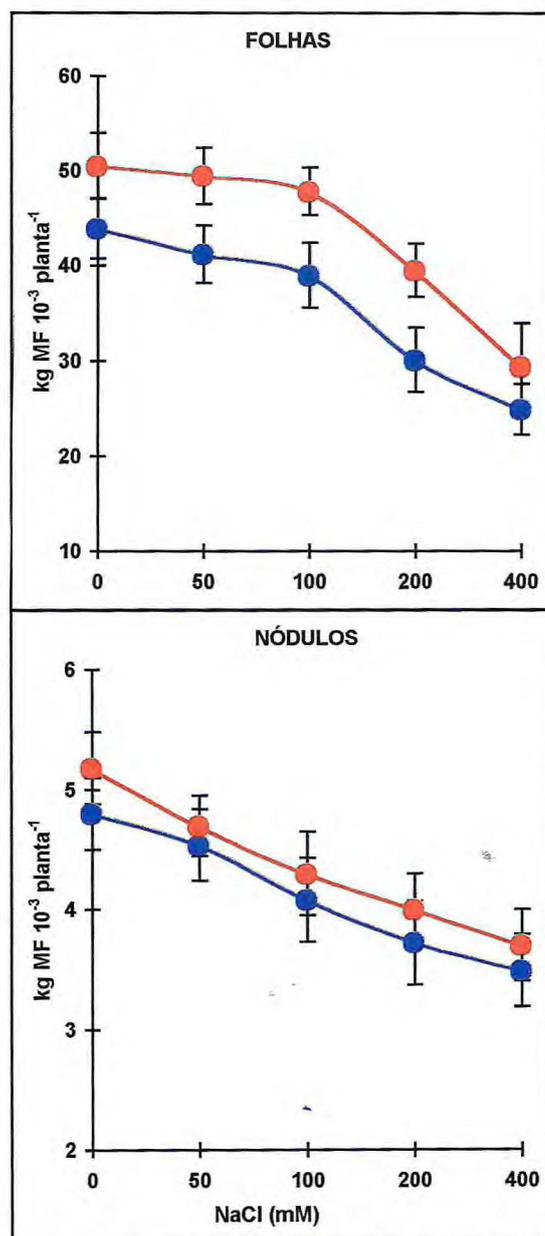


Figura 1 – Massa fresca de folhas e de nódulos de plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca²⁺ (CaCl₂) e ●---● equivale à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca²⁺, nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

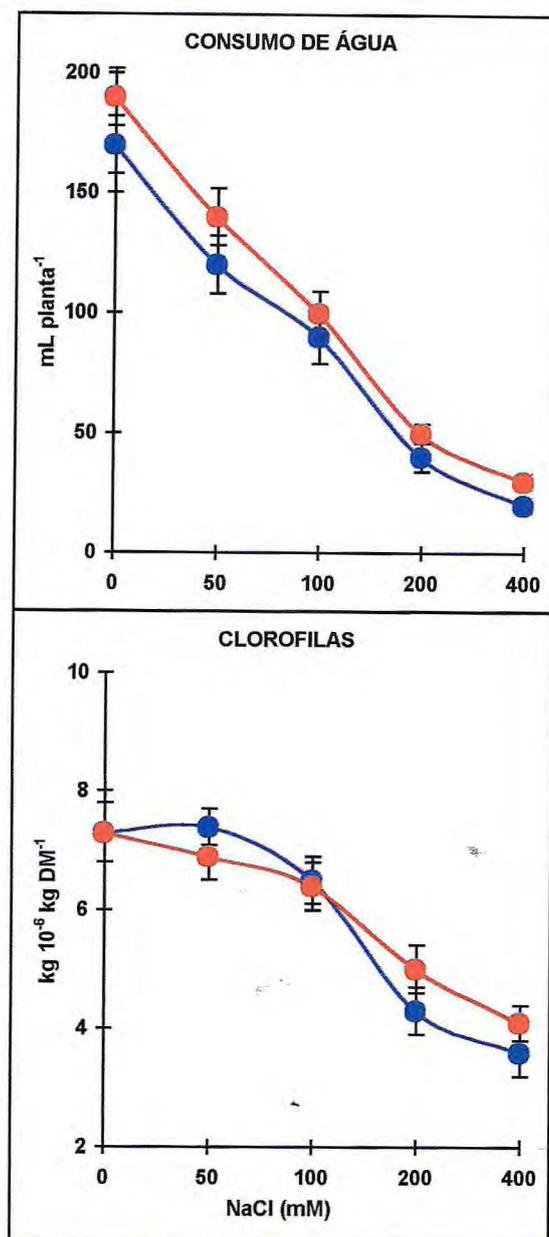


Figura 2 – Consumo diário de água e concentração de clorofilas totais em plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento na ausência de Ca²⁺ (CaCl₂) e ●---● equivale à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca²⁺, nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

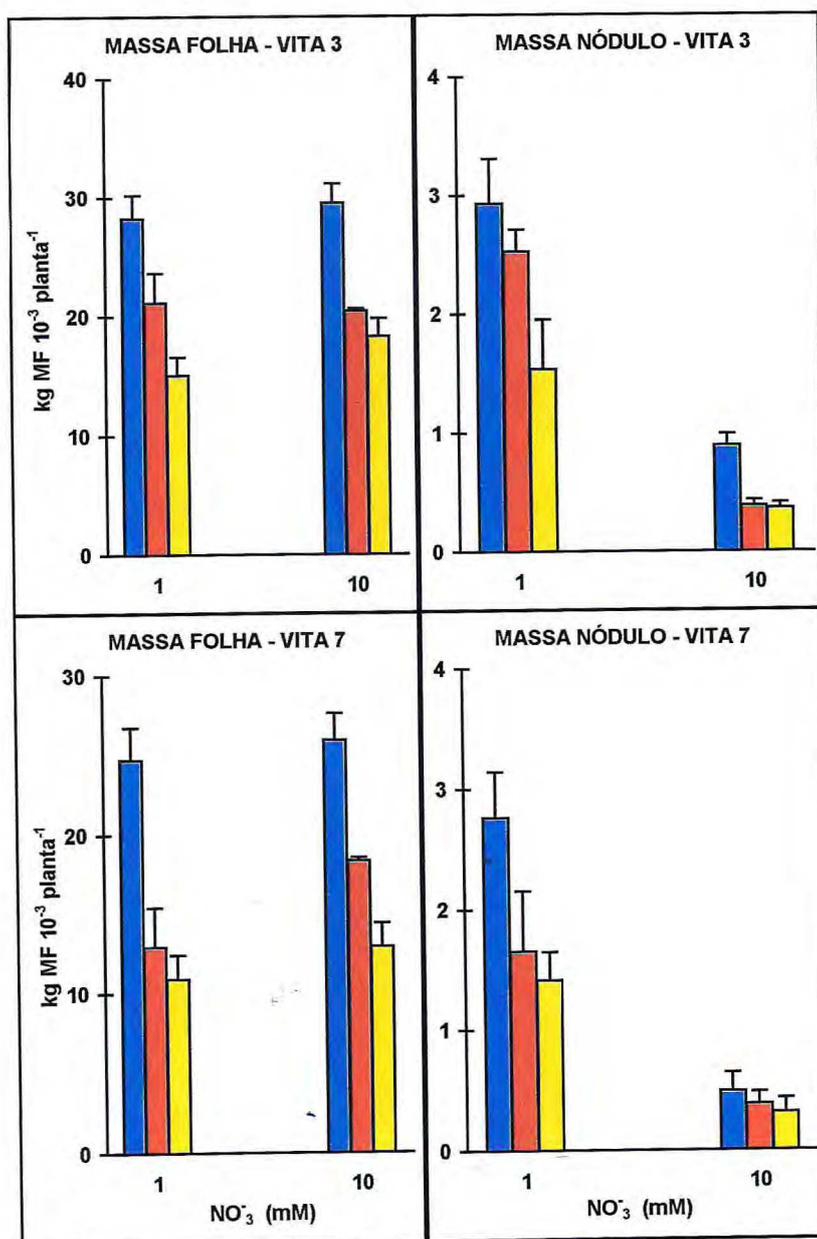


Figura 3 – Massa fresca de folhas e de nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO_3^- na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale a presença de 50mM.L^{-1} de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L^{-1} de NaCl e que receberam adição de 200mM.L^{-1} de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.



Foto 1. Detalhes dos sintomas visuais observados nas folhas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, submetido à salinidade (NaCl), na concentração de 400 mmol.L⁻¹.



Foto 2. Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de dois níveis de nitrato (1 mM e 10 mM), na ausência de salinidade (NaCl), aos 25 DAE (dias após emergência).



Foto 3 – Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivares Vita 3 e Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de nitrato (10 mM) e na ausência de salinidade (NaCl), aos 30 DAE (dias após emergência).

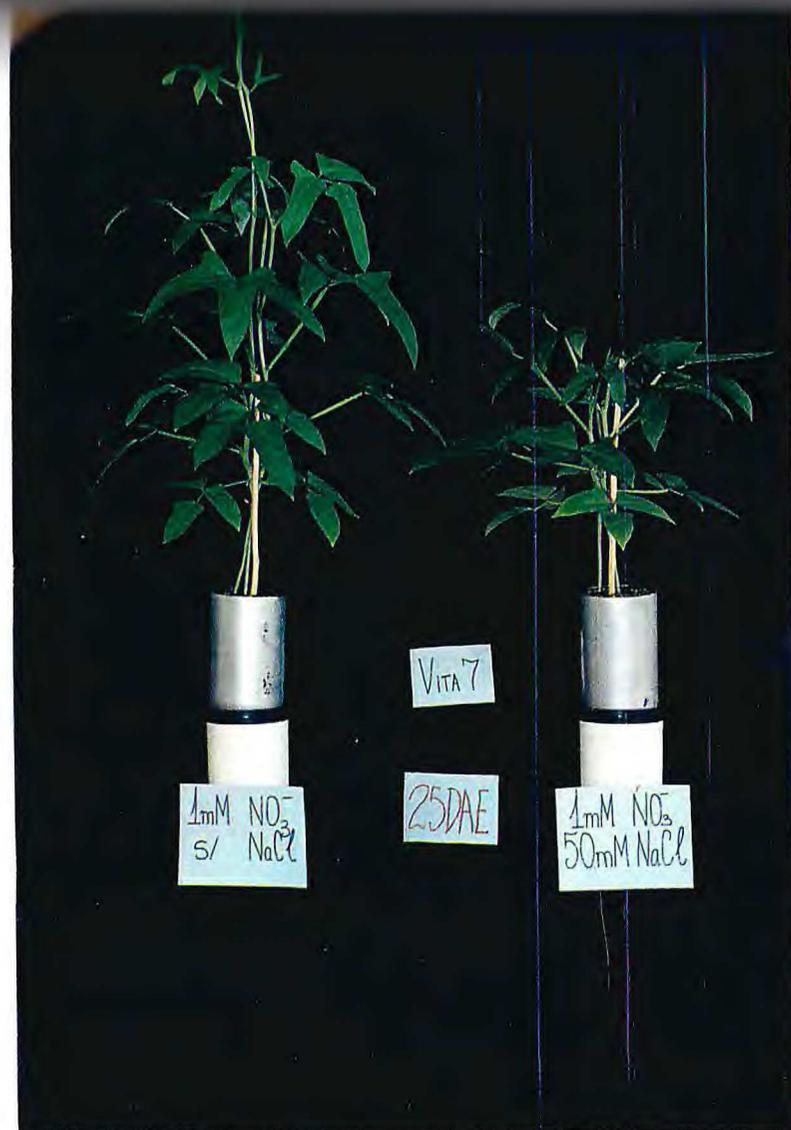


Foto 4. Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência (0 mM) e na presença (50 mM) de salinidade (NaCl), supridas com 1 mM de nitrato, aos 25 DAE (dias após emergência).



Foto 5. Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7 inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na presença de dois níveis de nitrato (1 mM e 10 mM) e salinidade (0 e 50 mM NaCl), aos 25 DAE (dias após emergência).



Foto 6. Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 7, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência (0 mM) e na presença (200 mM) de salinidade (NaCl), supridas com 10 mM de nitrato, aos 30 DAE (dias após emergência).



Foto 7. Comparação do crescimento de plantas de feijão-de-corda, cultivar Vita 3, inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., na ausência (0 mM) e na presença (200 mM) de salinidade (NaCl), supridas com 10 mM de nitrato, aos 30 DAE (dias após emergência).

3.2 Efeitos da salinidade sobre a atividade dos nódulos relacionada com a fixação de N₂

A integridade e a atividade dos nódulos podem ser determinadas através de diversas maneiras. De um modo geral, por meio de sua aparência externa (coloração, rigidez, presença de leghemoglobina – cor avermelhada no seu interior, sinais de senescência etc) ou de seus constituintes bioquímicos. Quanto ao primeiro critério, conforme relatado anteriormente, os nódulos não apresentaram qualquer aspecto de anomalia como efeito dos tratamentos com NaCl, nas duas cultivares. Como estimativa de sua atividade, a concentração de proteínas solúveis apresentou um ligeiro declínio em função dos níveis de NaCl, no Experimento I (Figura 5). Na concentração de 400mM.L⁻¹, os valores foram reduzidos para cerca de 70% em relação ao controle, tanto na ausência com na presença de Ca⁺². A presença desse cátion não teve influência na concentração de proteínas. Por outro lado, a concentração de aminoácidos totais livres (N- α amino) variou inversamente, aumentando cerca de 30% no maior nível de NaCl (Figura 5). Ao contrário, a atividade de glutamina sintetase e a concentração de leghemoglobina não foram afetadas pela presença de NaCl e praticamente também não o foram pelo Ca⁺² (Figura 6).

A eletroforese de proteínas totais dos nódulos em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes por SDS-PAGE, mostrou que os tratamentos com 200mM.L⁻¹ e 400mM.L⁻¹ de NaCl provocaram redução na intensidade de algumas bandas protéicas, inclusive uma discreta diminuição na banda de massa molecular aparente próxima a 16kDa, a qual deve corresponder a uma das seis isoformas da leghemoglobina (Figura 7). Por outro lado, a concentração de amônia livre não foi alterada pela presença do NaCl, sugerindo que os tratamentos salinos não devem ter induzido o processo de senescência nos nódulos (Figura 8). O acréscimo na concentração de prolina (Figura 8) foi relacionado com o aumento na concentração dos aminoácidos totais livres (Figura 5) e não pode, necessariamente, indicar um mecanismo de ajustamento osmótico.

No Experimento II, a concentração de proteínas dos nódulos das duas cultivares tratadas com 50mM.L^{-1} foi ligeiramente reduzida após os 27 dias de tratamento (Figura 9). O choque salino com 200mM.L^{-1} também induziu pequena redução na concentração das proteínas solúveis. A concentração dos aminoácidos livres totais apresentou uma ligeira tendência de queda na cultivar Vita 3, enquanto que em Vita 7 não se observou uma tendência nítida de alteração (Figura 9). A atividade de glutamina sintetase também não foi alterada pelos tratamentos com NaCl no Experimento II, enquanto que a concentração de leghemoglobina foi reduzida por efeito do NaCl (Figura 10). Esse efeito foi mais evidente na cultivar Vita 3 inoculada, na presença de baixo nível de nitrato. É interessante observar que as plantas tratadas com alto nível de nitrato apresentaram concentração relativamente alta de leghemoglobina, evidenciando uma boa efetividade desses nódulos. A concentração de ureídeos nos nódulos também foi reduzida pelo tratamento com 50mM.L^{-1} nas duas cultivares (Figura 11). Ao contrário, o tratamento com 200mM.L^{-1} provocou aumentos de concentração de ureídeos, particularmente na cultivar Vita 7.

Os resultados para os aumentos na concentração de ureídeos na cultivar Vita 7 foram corroborados em parte com os do Experimento I. Pela Figura 11, é possível observar que os níveis de 50mM.L^{-1} e 100mM.L^{-1} de NaCl provocaram decréscimos na concentração de ureídeos nos nódulos, independentemente da presença ou ausência de Ca^{+2} . Entretanto, nos níveis de 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} , observou-se grande acúmulo desses compostos, na ordem de 160% comparado com o controle (Figura 11). É interessante verificar que no xilema a concentração de ureídeos foi decrescente em função do nível de NaCl (Figura 11). No nível mais elevado de NaCl, a concentração de ureídeos representou somente 5% do tratamento controle. Como verificado nos nódulos, observa-se uma tendência de se encontrar valores menores de concentrações de ureídeos no xilema no tratamento com adição de Ca^{+2} , dentro de cada nível de NaCl, particularmente nos níveis mais baixos. Nesse caso, a presença do Cl^- como ânion acompanhante do Ca^{+2} (CaCl_2) e/ou a maior condutividade elétrica (salinidade) desse tratamento podem ter contribuído para essa e outras respostas aparentemente conflitantes.

Quando os resultados do Experimento I são analisados em conjunto, é possível inferir que os decréscimos na massa dos nódulos, provocados pelo NaCl, foram proporcionais aos de concentração de proteínas solúveis (Figuras 1 e 5) e inversamente relacionados com as concentrações de aminoácidos livres e ureídeos (Figuras 5 e 11). Apesar da concentração de leghemoglobina e a atividade de glutamina sintetase (expressos na base de massa de nódulos) não terem sido afetadas pelo NaCl no Experimento I (Figura 6), é provável que a diminuição na quantidade de N fixado (gN/planta) – (Figura 12) tenha sido relacionada com a redução no transporte de ureídeos para o xilema devido ao seu acúmulo no nódulo (Figura 11), que associado às reduções no fluxo transpiratório (Figura 2) podem ter contribuído na restrição ao suprimento de nitrogênio para a parte aérea das plantas.

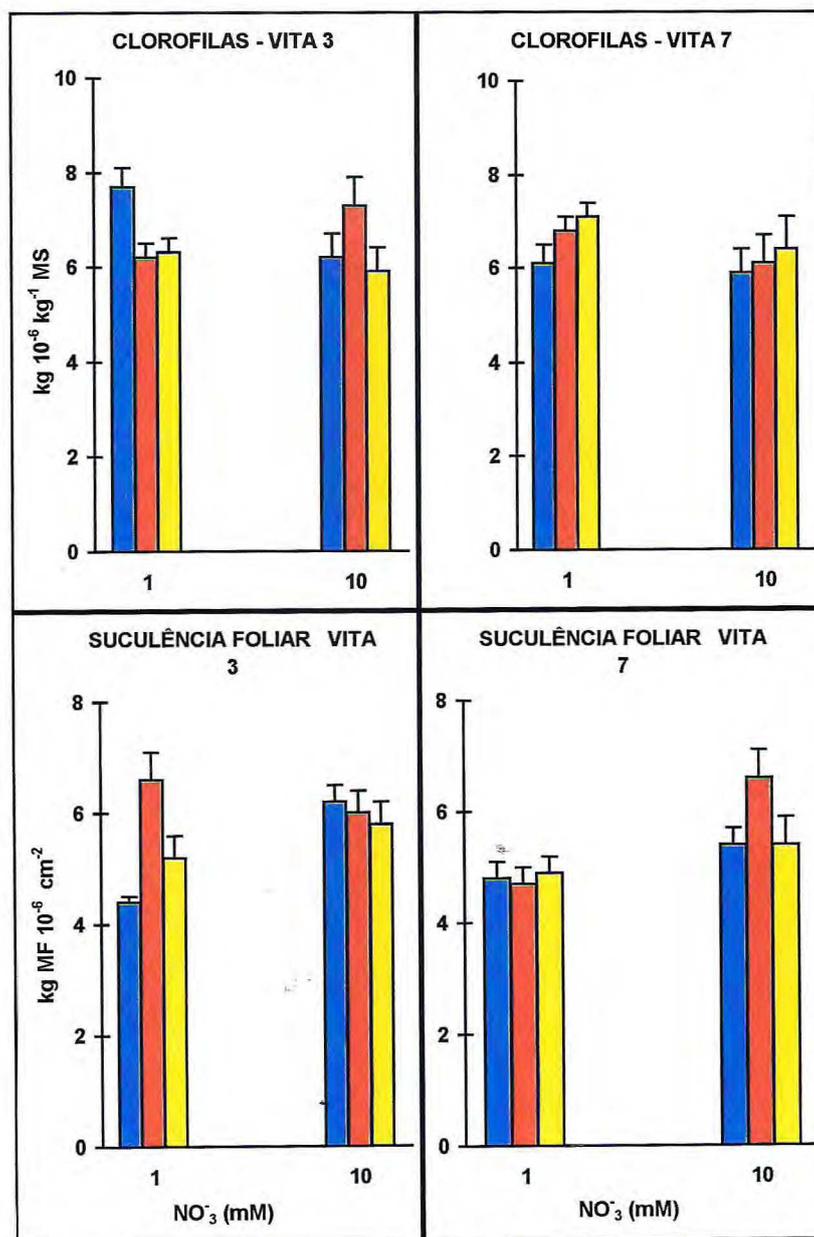


Figura 4 – Concentração de clorofilas totais e suculência foliar das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO_3^- na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale à presença de 50mM.L^{-1} de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às para as plantas pré-cultivadas com 50mM.L^{-1} de NaCl e que receberam adição de 200mM.L^{-1} de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

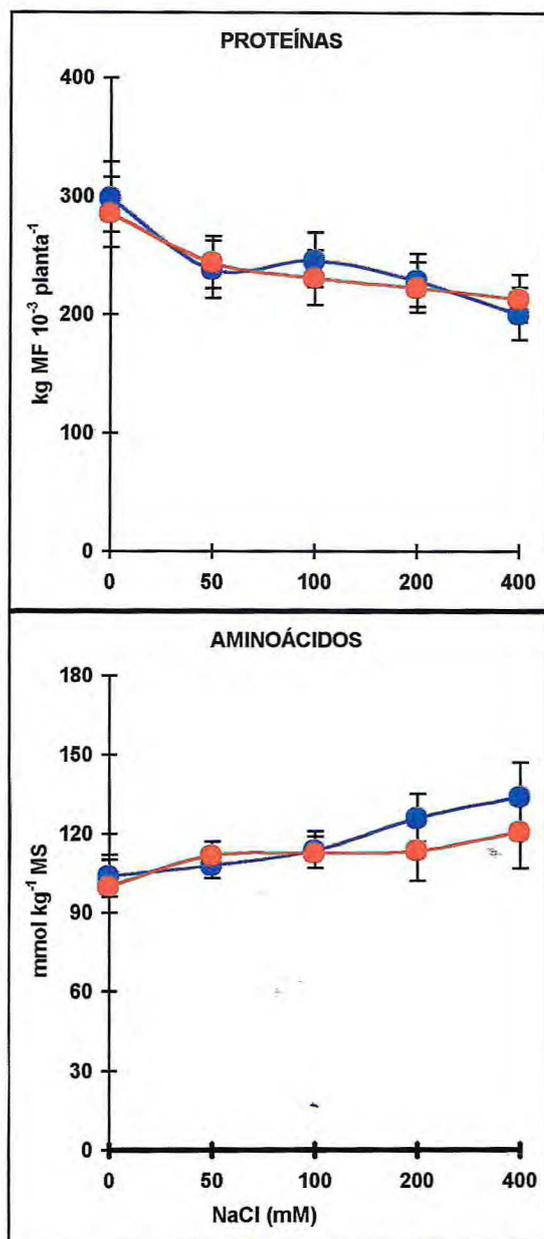


Figura 5 – Concentração de proteínas solúveis e de aminoácidos livres totais (N- α amino) em nódulos de plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca²⁺ (CaCl₂) e ●---● refere-se à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca²⁺, nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

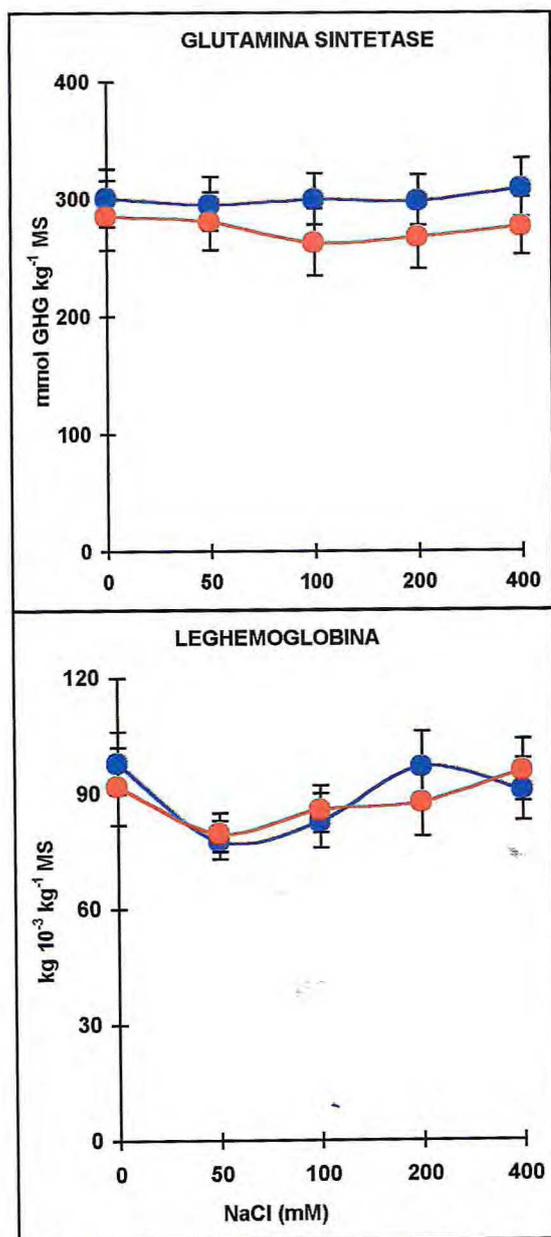


Figura 6 – Atividade de glutamina sintetase e concentração de leghemoglobina em nódulos de plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca⁺² (CaCl₂) e ●---● equivale à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca⁺², nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

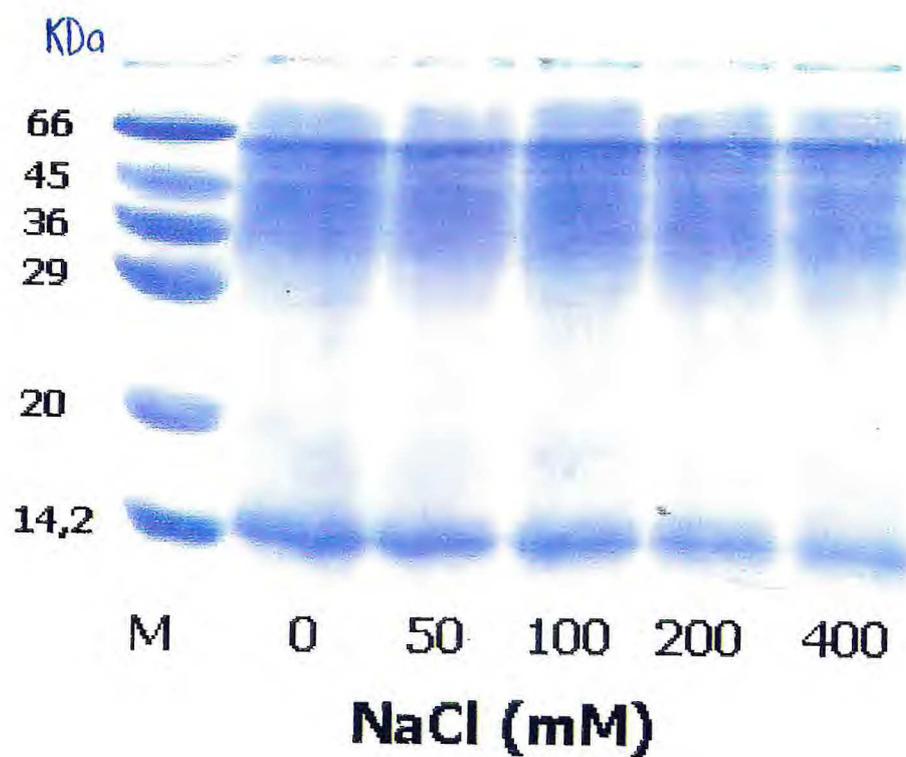


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, da farinha de nódulos de feijão-de-corda submetidos a diferentes níveis de salinidade (NaCl). M corresponde aos marcadores de massa molecular.

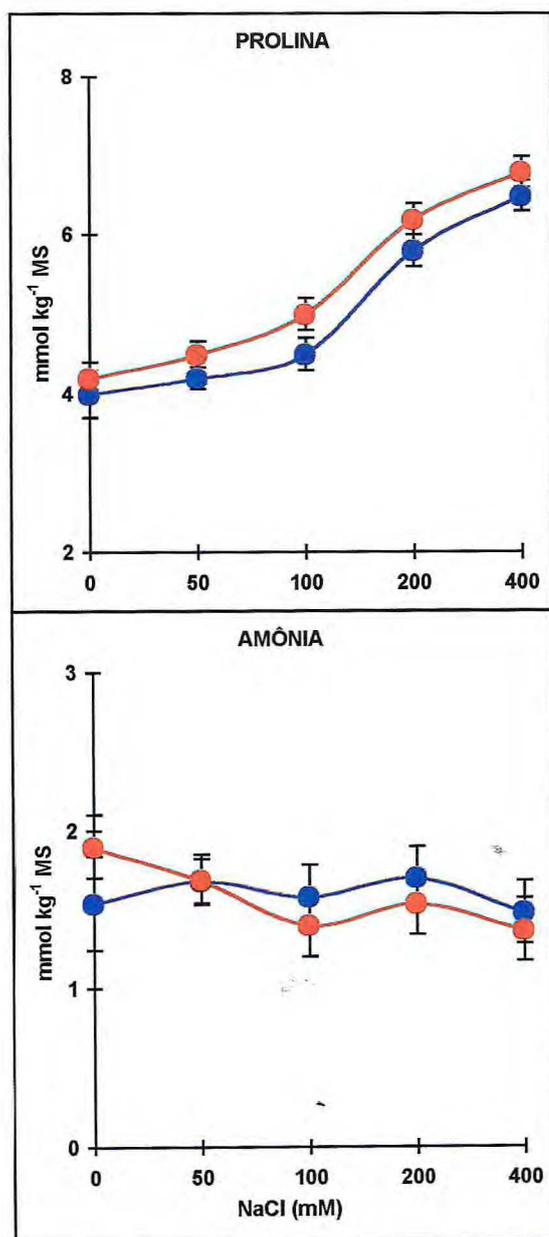


Figura 8 – Concentração de prolina e de amônia livre em nódulos de plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca²⁺ (CaCl₂) e ●---● refere-se à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca²⁺, nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

3.3. Efeitos da salinidade sobre o metabolismo de nitrogênio nas folhas

A porcentagem de nitrogênio total nos caules (dados não apresentados) e nas folhas (Figura 12) no Experimento I não foi alterada significativamente, nem pelos níveis de NaCl, nem pela presença ou ausência de Ca^{+2} . Dessa maneira, o conteúdo de nitrogênio na planta (gN/planta) – (Figura 12), em grande parte oriunda da fixação de nitrogênio pelos nódulos, variou de maneira semelhante ao conteúdo de fitomassa de caules (dados não apresentados) e ao de folhas (Figura 1). Assim, os efeitos do NaCl foram proporcionais nas reduções nos conteúdos de fitomassa da planta (uma estimativa da capacidade fotossintética) e sobre o conteúdo de nitrogênio na planta (estimativa da fixação de nitrogênio). Por outro lado, no Experimento II, quando o NaCl foi adicionado desde a inoculação, na presença de baixo nível de nitrato, a cultivar Vita 3 mostrou uma resposta diferente em relação ao Experimento I, realizado com Vita 7 (Figura 12). Neste caso, as plantas que receberam 50mM.L^{-1} de NaCl apresentaram menor porcentagem de nitrogênio nas folhas. No caso de Vita 7, observou-se apenas um ligeiro decréscimo na porcentagem de nitrogênio, porém dentro da dispersão do desvio padrão. É interessante observar que nas plantas inoculadas na presença de alto nível de nitrato, a porcentagem de nitrogênio não foi alterada pela presença do NaCl (Figura 12).

As duas cultivares não apresentaram um padrão de resposta da atividade da redutase de nitrato nas folhas consistente com o esperado (Figura 13). Para ambas cultivares crescidas na presença de um nível baixo de nitrato (1mM.L^{-1}), o qual corresponde a uma concentração de apenas 14ppm de nitrato no substrato nutritivo, observou-se maior atividade da enzima – cerca de 3 vezes - nas plantas tratadas com 50mM.L^{-1} , em relação ao controle (Figura 13). A adição do choque salino com 200mM.L^{-1} induziu redução na atividade da redutase de nitrato, particularmente em Vita 3. Por outro lado, quando as plantas foram cultivadas em presença de alto nível de nitrato, observou-se maior atividade de redutase de nitrato (cerca de 3 vezes), em relação às cultivadas em baixo nível de nitrato. É interessante observar que a atividade de

redutase de nitrato em Vita 7, cultivada em presença de alto nível de nitrato, não foi afetada pelo NaCl (Figura 13). Infelizmente, esse tipo de resposta não garantiu nenhuma tolerância ao estresse salino, em termos da redução no crescimento das folhas (Figura 2), como poderia ser pensado. As concentrações de nitrato nas folhas não guardaram relação estreita com a atividade da redutase de nitrato (Figura 13). Como esperado, as concentrações foram maiores nas plantas cultivadas sob alto nível de nitrato. Nas duas cultivares, o tratamento com choque salino levou a um grande acúmulo de nitrato nas folhas das plantas cultivadas sob alto nível de nitrato, particularmente em Vita 3. A concentração das proteínas solúveis das folhas das plantas do Experimento I apresentou uma resposta ao NaCl interessante (Figura 14). Nos níveis mais elevados (200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}), observou-se um nítido incremento nas proteínas, chegando em torno de 200%. (Figura 14). É interessante observar que a principal sub-unidade da rubisco, a proteína de maior concentração na folha, correspondente à massa molecular de 160kDa, teve sua concentração grandemente diminuída conforme mostra o perfil da eletroforese em SDS-PAGE (Figura 15). A atividade da glutamina sintetase nas folhas mostrou uma tendência semelhante à de proteínas solúveis, particularmente no tratamento com o nível mais alto de Ca^{+2} (Figura 14).

As concentrações de proteínas solúveis nas folhas das duas cultivares, nos diversos tratamentos do Experimento II, apresentaram um padrão de resposta diferente das concentrações do Experimento I. Em geral, os tratamentos com NaCl provocaram reduções na concentração de proteínas, nas duas cultivares (Figura 14). Esses resultados reforçam a idéia que os efeitos do NaCl no Experimento I (curta duração) foram diferentes daqueles do Experimento II (nível moderado de NaCl durante longa duração seguido de um choque salino). No primeiro caso, os níveis mais elevados de NaCl devem ter provocado intensa degradação de proteínas, associada com o início do processo de senescência induzido pela toxicidade do NaCl. No segundo caso, a despeito do nível moderado de NaCl ter reduzido significativamente o crescimento, não foram observados efeitos tóxicos do NaCl, mesmo quando na presença do choque salino com 200mM.L^{-1} .

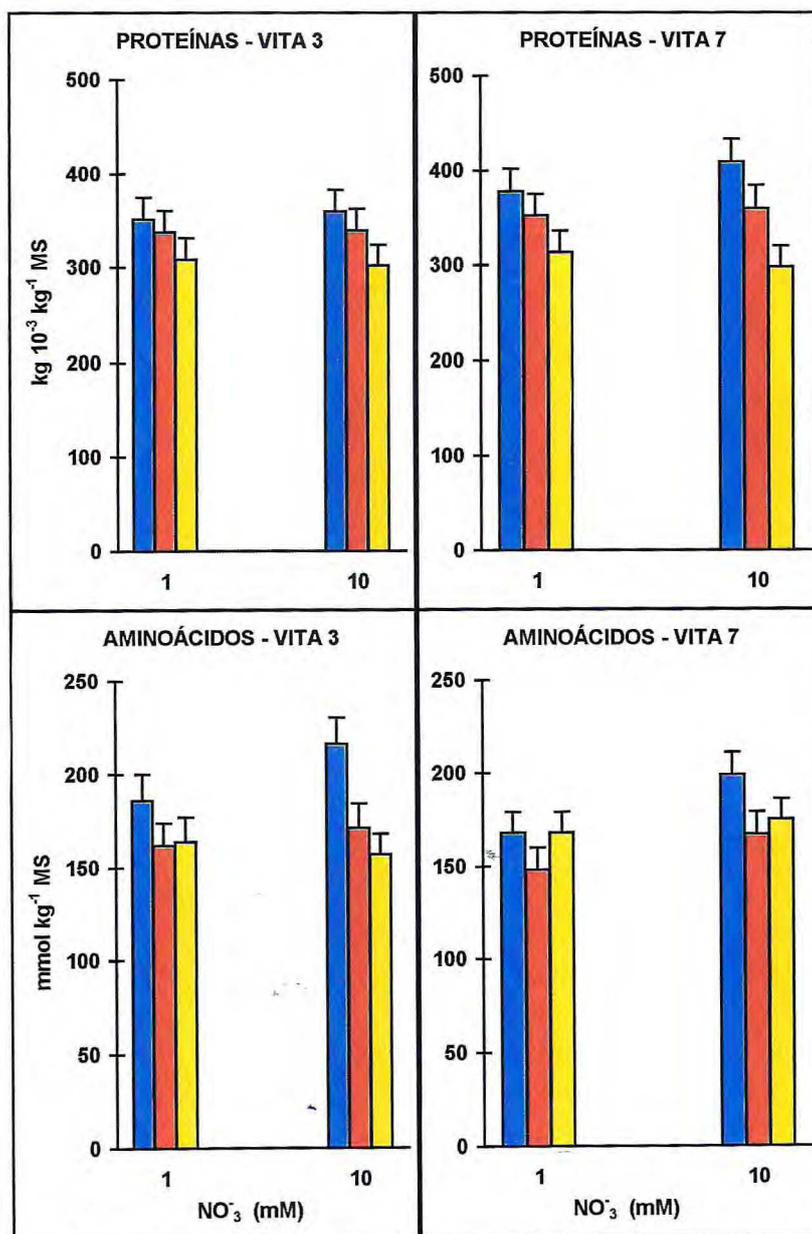


Figura 9 – Concentração de proteínas solúveis e concentração de aminoácidos livres totais ($\text{N-}\alpha$ -amino), em nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO_3^- na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale a presença de 50mM.L^{-1} de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L^{-1} de NaCl e que receberam adição de 200mM.L^{-1} de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

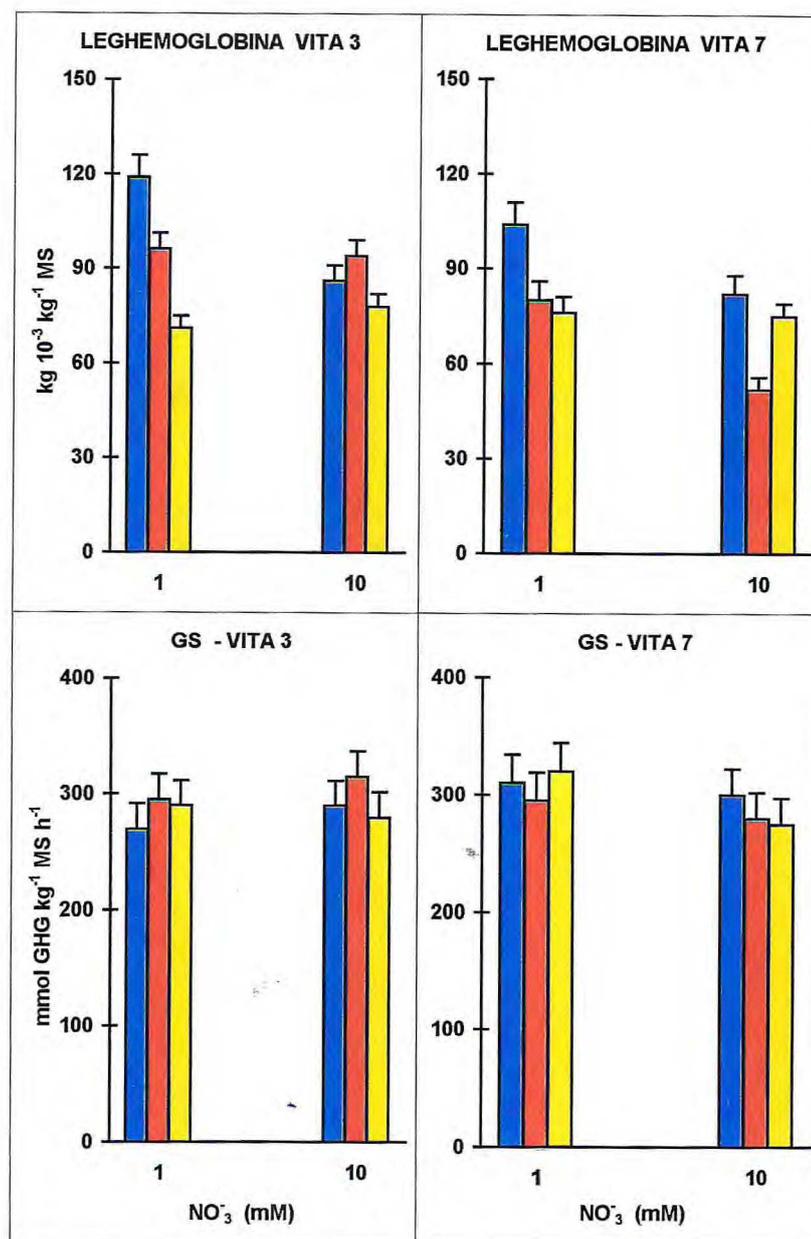


Figura 10 – Concentração de leghemoglobina total e atividade da glutamina sintetase em nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO₃ na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale a presença de 50mM.L⁻¹ de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L⁻¹ de NaCl e que receberam adição de 200mM.L⁻¹ de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

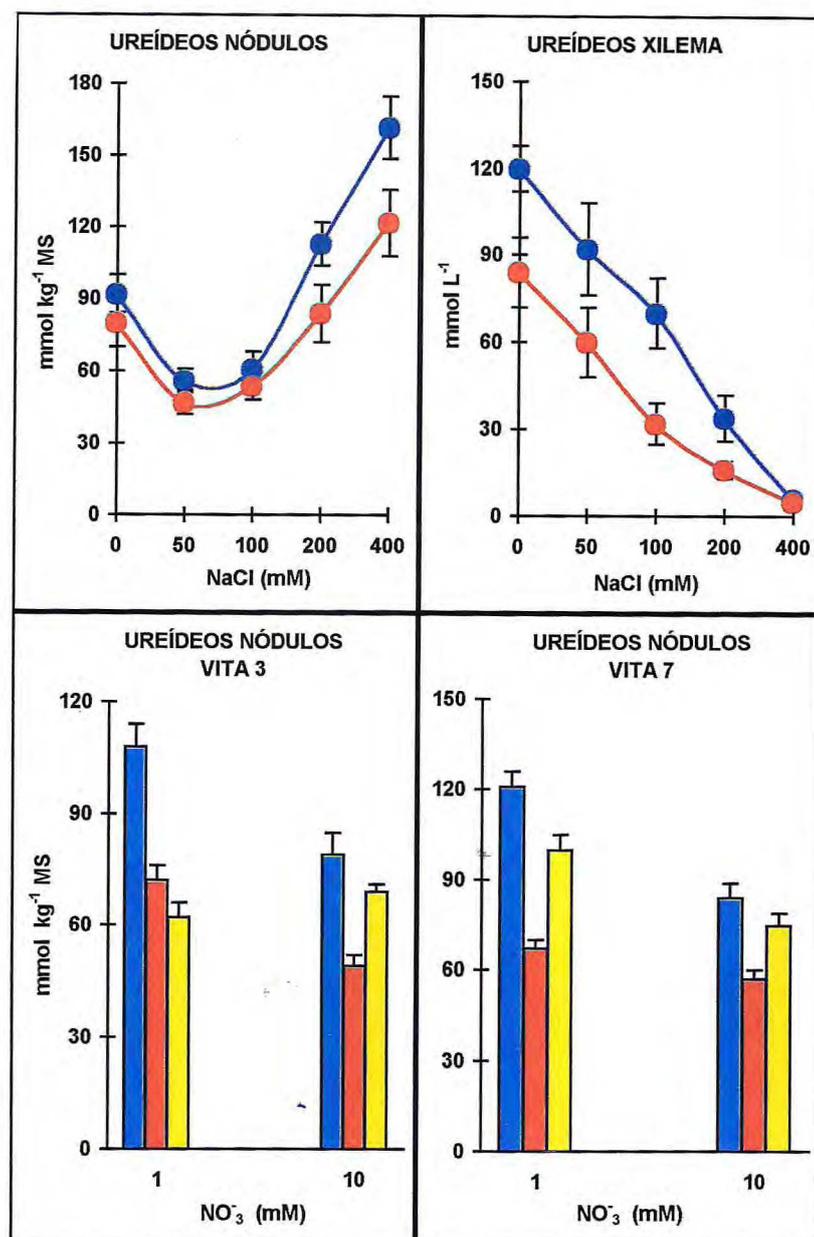


Figura 11 – Concentração de ureídeos em nódulos e seiva do xilema; ●---● corresponde ao tratamento na ausência de Ca⁺² (CaCl₂) e ●---● equivale à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca⁺², nos quatro dias (acima). Concentração de ureídeos em nódulos das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO₃⁻ na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale à presença de 50mM.L⁻¹ de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L⁻¹ de NaCl e que receberam adição de 200mM.L⁻¹ de NaCl durante quatro dias (abaixo). As barras indicam o desvio padrão.

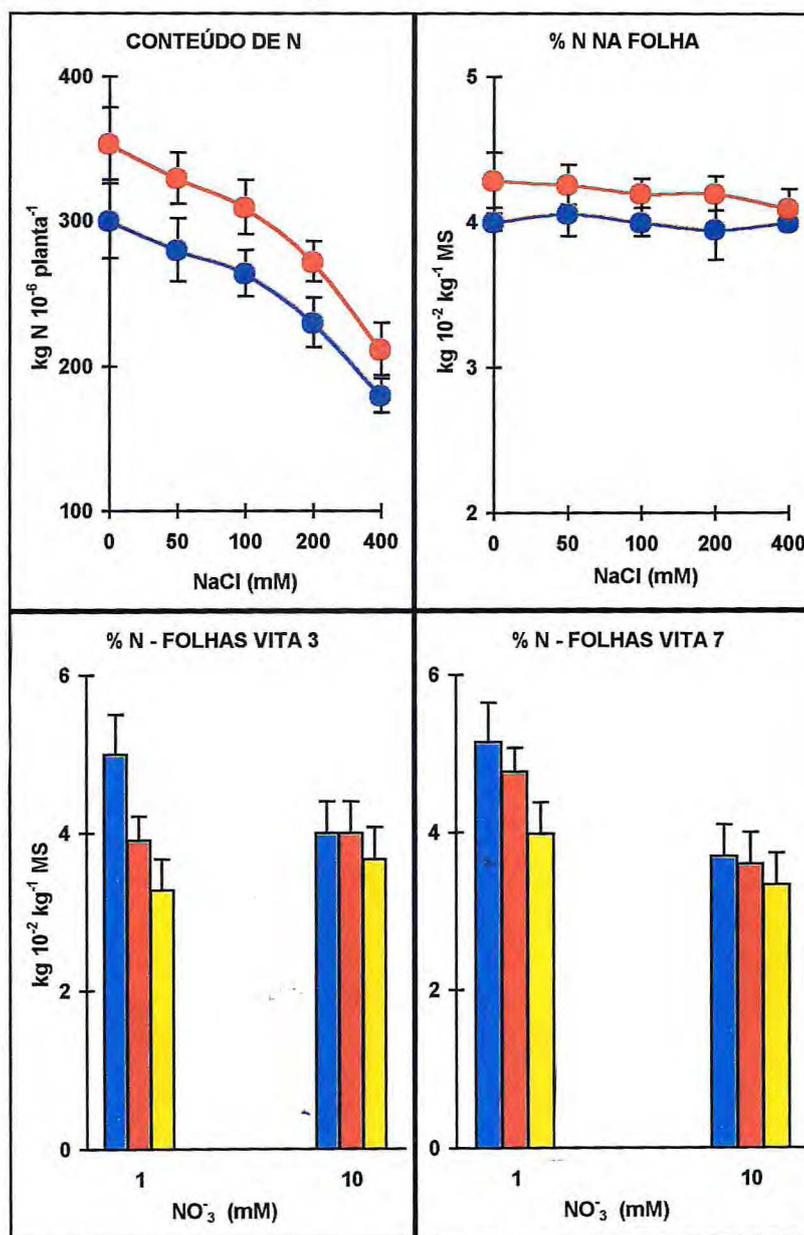


Figura 12 – Conteúdo total de N e %N na folha; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca^{+2} (CaCl_2) e ●---● equivale à presença de 10 de Ca^{+2} , nos quatro dias (acima). % N na folha das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO_3^- na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale à presença de 50mM.L^{-1} de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L^{-1} de NaCl e que receberam adição de 200mM.L^{-1} de NaCl durante quatro dias (abaixo). As barras indicam o desvio padrão.

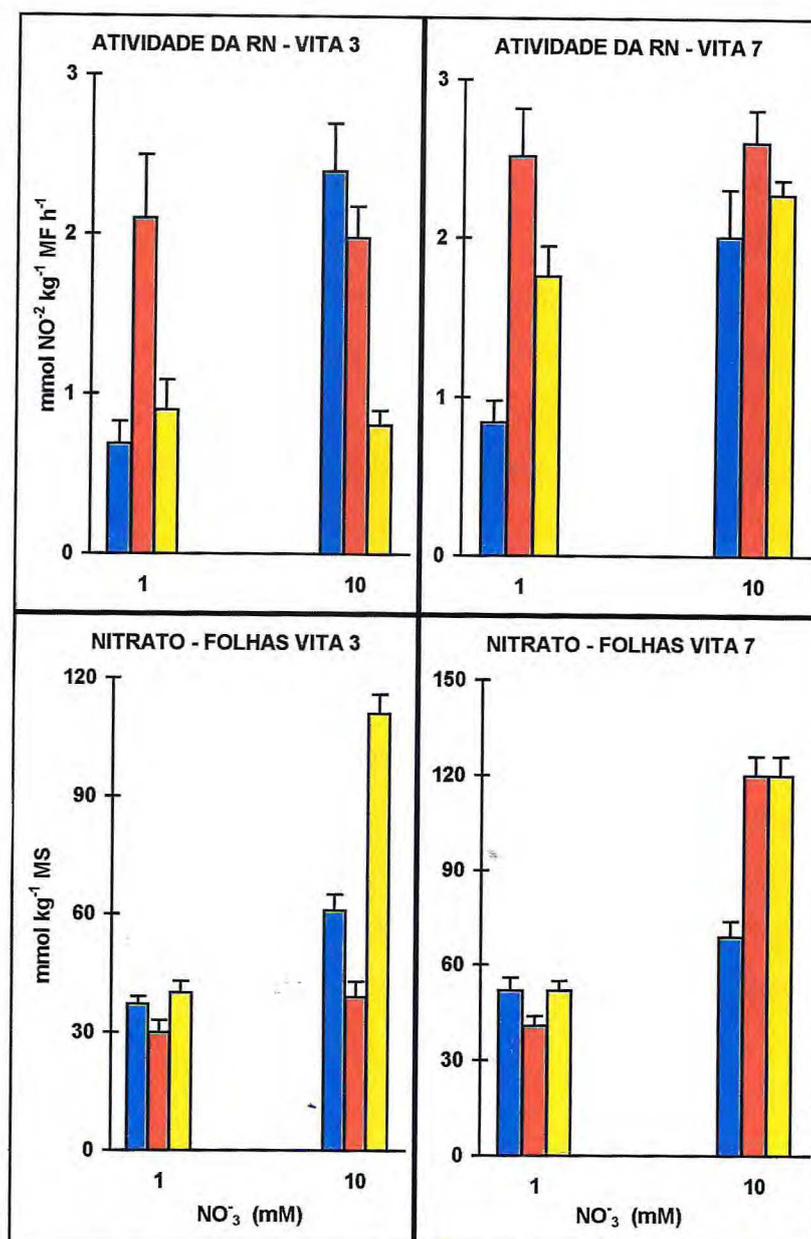


Figura 13 – Atividade de redutase de nitrato e concentração de nitrato em folhas das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO_3^- na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale à presença de 50mM.L^{-1} de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L^{-1} de NaCl e que receberam adição de 200mM.L^{-1} de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

3.4. Efeitos da salinidade sobre o acúmulo de solutos envolvidos com o ajustamento osmótico

A concentração de prolina nas folhas das plantas tratadas com os níveis mais elevados de NaCl aumentou intensamente (Figura 16). Na concentração de 400mM.L^{-1} , na presença de 10mM.L^{-1} de Ca^{+2} , o conteúdo de prolina aumentou 20 vezes, enquanto que na ausência de cálcio o aumento foi de 13 vezes, em relação ao controle. Simultaneamente, observou-se um incremento de 2,5 vezes na concentração de amônia livre no nível de 200mM.L^{-1} de NaCl (Figura 16). É interessante observar que, ao contrário da prolina, não houve efeito do nível de 400mM.L^{-1} sobre a concentração de amônia, em relação à concentração de 200mM.L^{-1} . Na realidade, a tendência dos resultados foi para uma saturação na produção de amônia e uma elevação progressiva na concentração de prolina (Figura 16). Por outro lado, no Experimento II, o acúmulo de prolina, nas duas cultivares, ocorreu somente após o choque salino de 200mM.L^{-1} de NaCl, sendo que esse acúmulo verificou-se somente no tratamento com alto nível de nitrato (Figura 17). Entretanto, a cultivar Vita 3 apresentou um ligeiro decréscimo na concentração de amônia nas folhas por efeito do NaCl, enquanto que em Vita 7 as concentrações permaneceram inalteradas (Figura 17).

As concentrações de aminoácidos livres e ureídeos nas folhas (Figura 16), em função dos níveis de NaCl, apresentaram a mesma tendência observada para amônia (Figura 16), proteínas solúveis (Figura 14) e atividade de glutamina sintetase (Figura 14), exibindo uma tendência de saturação entre os níveis de 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} . Analisados em conjunto, esses resultados apontam para a ocorrência de um incremento no catabolismo de proteínas de alta massa molecular, particularmente rubisco, originando proteínas menores, peptídeos e aminoácidos livres. Por outro lado, parte do aumento da concentração desses solutos deve ser creditada à diminuição na intensidade de síntese de proteínas devido às reduções no crescimento das folhas (cerca de 40%), em função dos níveis mais elevados de NaCl (Figura 1).

Ao contrário do observado nas folhas, os nódulos das plantas tratadas com níveis elevados de NaCl não mostraram acumulação significativa de proteínas solúveis e aminoácidos livres (Figura 5), amônia e prolina livres (Figura 8). Isso reforça a idéia que o acúmulo desses compostos nas folhas foi, provavelmente, resultante dos intensos efeitos tóxicos do NaCl nas folhas, acarretando uma aceleração no catabolismo das proteínas e diminuição na síntese protéica. Dessa maneira, resta esclarecer se o acúmulo desses compostos envolvidos com o ajustamento osmótico foi efetivo para proteção ou atenuação do estresse ou se simplesmente são produtos das alterações metabólicas induzidas pelos elevados níveis de salinidade. Neste contexto, crescem em importância a origem metabólica e a efetividade da prolina no ajustamento osmótico das folhas.

Os tratamentos com os níveis mais elevados de NaCl promoveram concentrações elevadas de Na^+ nas folhas (Figura 18). A 400mM.L^{-1} , as concentrações de Na^+ foram em torno de 5%, com base na massa seca. Entre os níveis de 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} de NaCl observaram-se incrementos na ordem de 20%, para ambos os níveis de Ca^{+2} . As concentrações de Cl^- nas folhas mostrou uma tendência similar, sendo que nesse caso, não ocorreram diferenças entre os níveis de 200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1} de NaCl. Na concentração mais elevada de NaCl, os teores de Cl^- foram da ordem de 5% da massa seca. Entretanto, na base de mol por massa seca houve uma tendência de acumular mais Na^+ do que Cl^- na folha (Figura 18). A presença de 10mM.L^{-1} de Ca^{+2} não afetou as concentrações dos dois íons salinos. Por outro lado, a concentração de Ca^{+2} foi aumentada por efeito dos dois níveis mais elevados de NaCl. Entretanto, a presença de 10mM.L^{-1} de Ca^{+2} durante os quatro dias do experimento não alterou a própria concentração do cálcio no tecido das folhas (Figura 18). A concentração de K^+ nas folhas aumentou em cerca de 45% por efeito dos níveis mais elevados de NaCl (Figura 18).

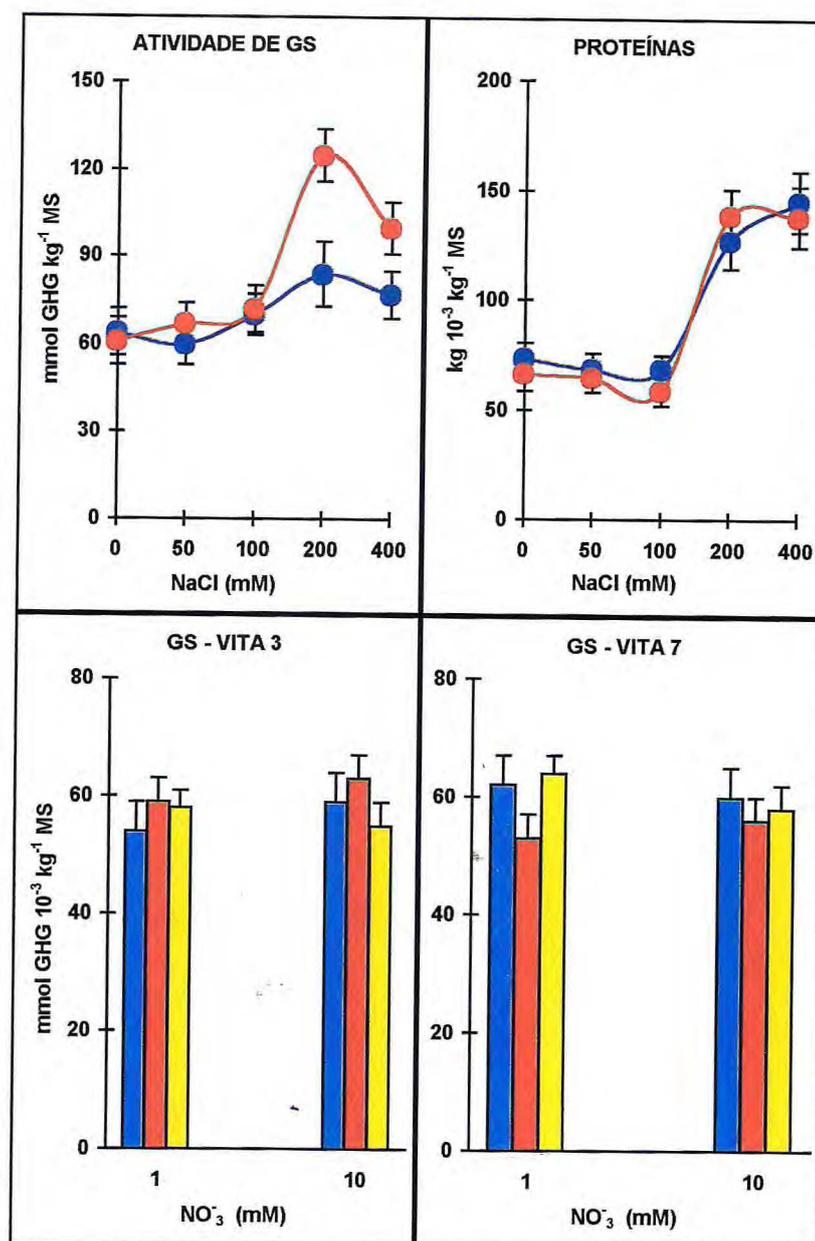


Figura 14 – Atividade de glutamina sintetase e concentração de proteínas solúveis em folhas; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca⁺² (CaCl₂) e ●---● equivale à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca⁺², nos quatro dias (acima). Atividade de glutamina sintetase em folhas das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO₃⁻ na solução nutritiva. ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale à presença de 50mM.L⁻¹ de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L⁻¹ de NaCl e que receberam adição de 200mM.L⁻¹ de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

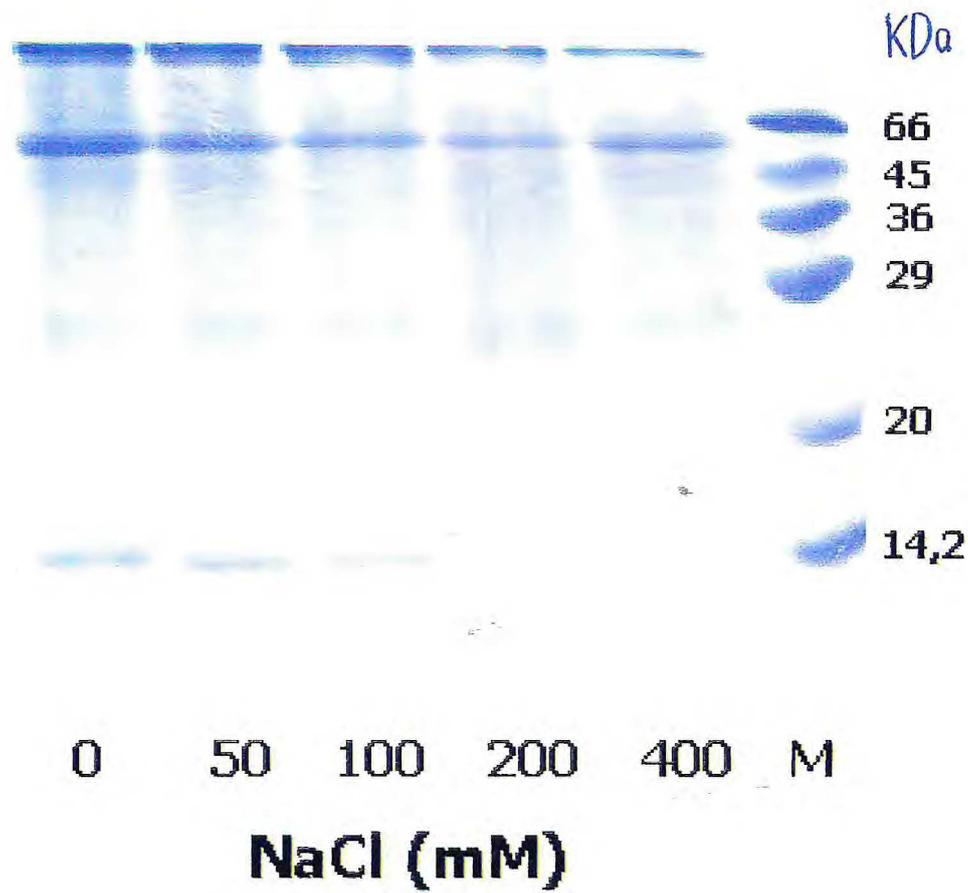


Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, da farinha de folhas de feijão-de-corda submetidos a diferentes níveis de salinidade (NaCl). M corresponde aos marcadores de massa molecular.

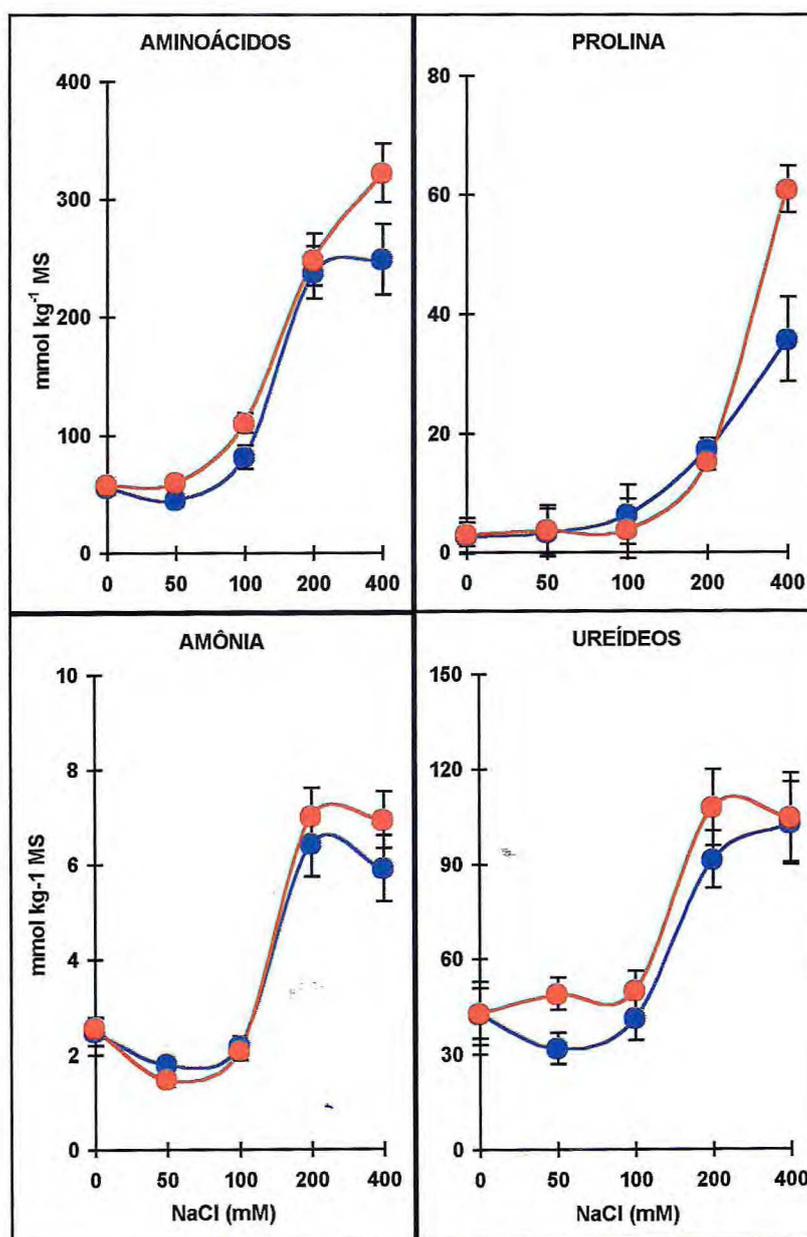


Figura 16 – Concentração de aminoácidos livres totais, prolina, amônia e ureídeos em folhas de plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca^{+2} (CaCl_2) e ●---● equivale à presença de 10 mM.L^{-1} de Ca^{+2} , nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

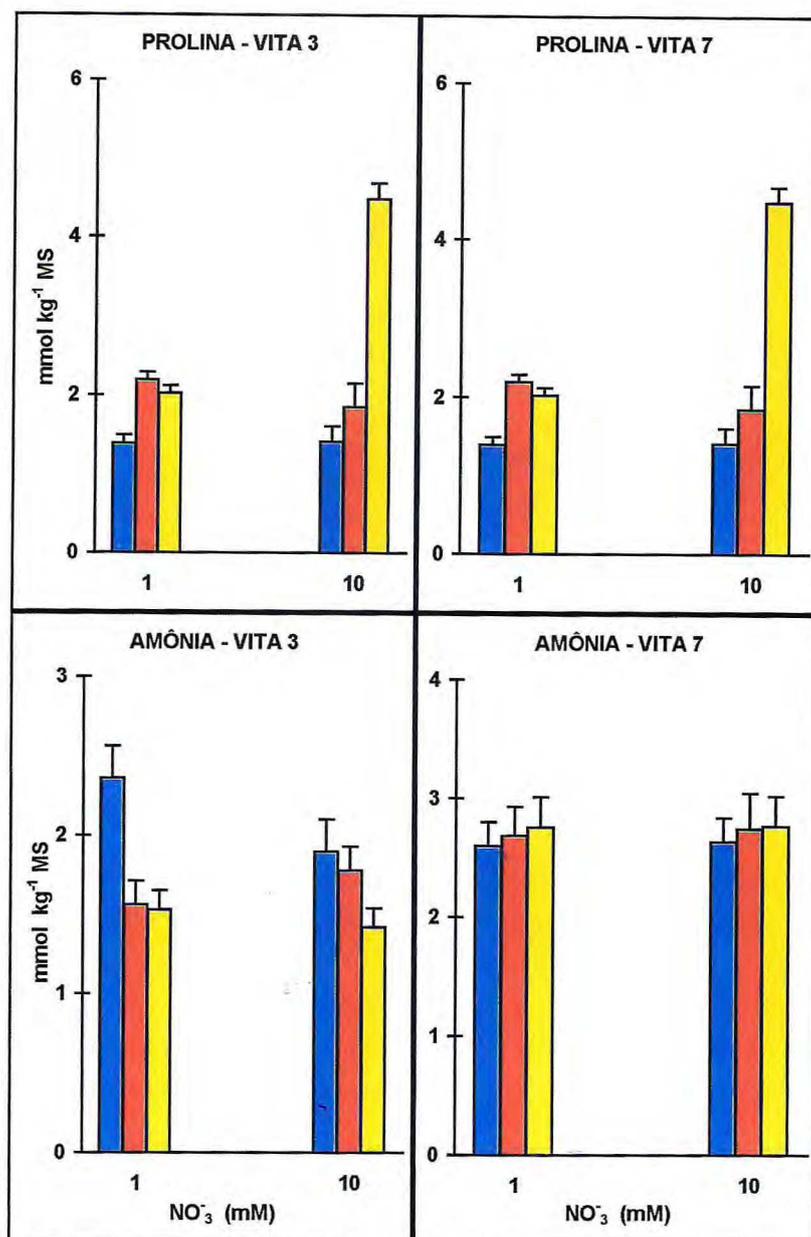


Figura 17 – Concentração de prolina e concentração de amônia em folhas das cultivares Vita 3 e Vita 7 de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl e a dois níveis de NO₃⁻ na solução nutritiva; ■---■ corresponde ao tratamento na ausência de NaCl (controle), ■---■ equivale à presença de 50mM.L⁻¹ de NaCl desde a inoculação e ■---■ refere-se às plantas pré-cultivadas com 50mM.L⁻¹ de NaCl e que receberam adição de 200mM.L⁻¹ de NaCl durante quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

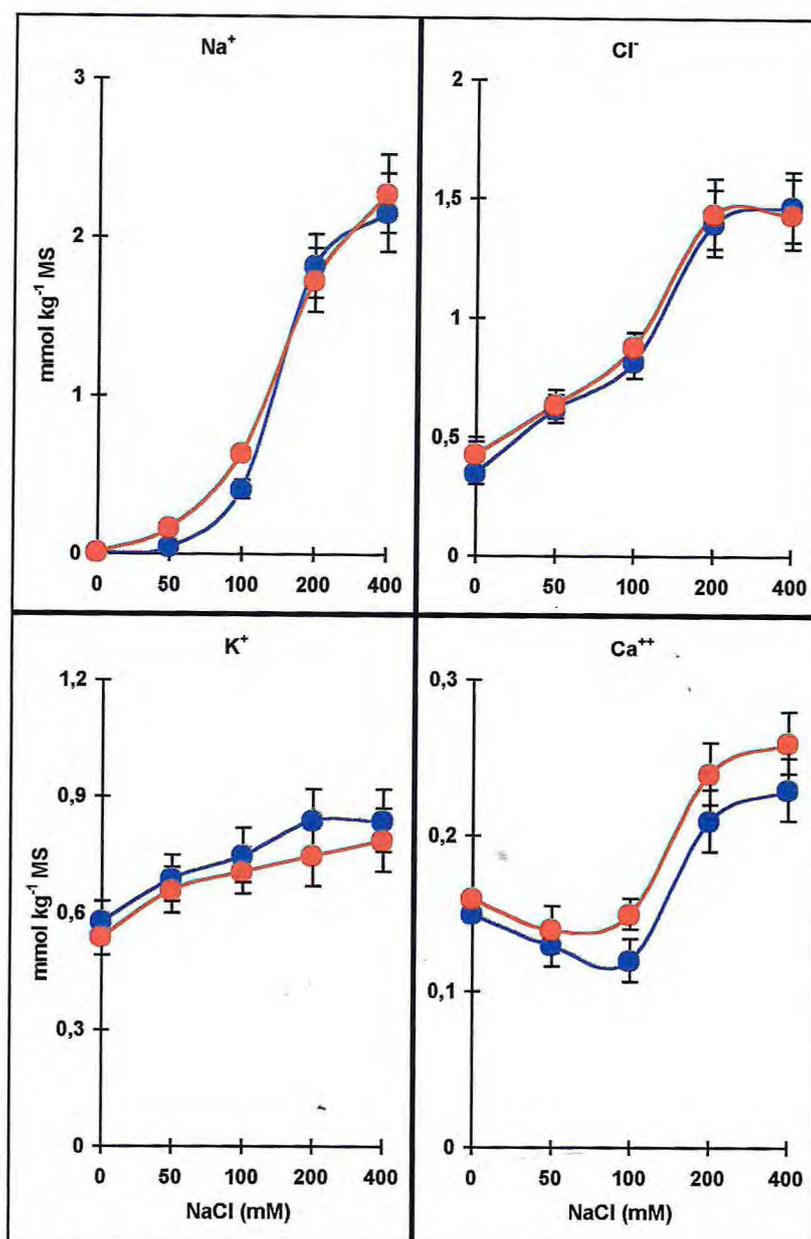


Figura 18 - Concentração de Na⁺, Cl⁻, K⁺ e Ca²⁺ em folhas de plantas de feijão-de-corda, aos 27 dias de idade, submetidas a diferentes níveis de NaCl, durante quatro dias consecutivos de tratamento; ●---● corresponde ao tratamento com ausência de Ca²⁺ (CaCl₂) e ●---● equivale à presença de 10mM.L⁻¹ de Ca²⁺, nos quatro dias. As barras indicam o desvio padrão.

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A estratégia experimental adotada no Experimento I permitiu estabelecer comparações entre algumas alterações metabólicas induzidas pelo NaCl em folhas e nódulos de feijão-de-corda, particularmente em relação ao crescimento e perturbações no metabolismo do nitrogênio. Inicialmente, foi possível separar os efeitos da salinidade sobre a sobrevivência do rizóbio e do processo inicial da nodulação daqueles relacionados diretamente com o metabolismo e crescimento dos nódulos. A partir da indução do estresse através de níveis crescentes de NaCl, num período de curta duração, também foi possível estabelecer relações entre a susceptibilidade relativa de folhas e nódulos à salinidade.

No Experimento II, foi possível verificar os efeitos acumulativos de um nível moderado de NaCl (50mM.L^{-1}), aplicado desde o plantio e inoculação das sementes, em duas cultivares dotadas de diferentes potenciais para tolerar o estresse hídrico (COSTA, 1999). Verificou-se, também, o efeito de dois níveis de nitrato no substrato nutritivo, procurando-se simular duas situações de importância prática para as condições de cultivo no campo: (1) uma concentração de nitrato extremamente baixa (1mM.L^{-1}), incapaz de inibir a nodulação e fixação de nitrogênio (que na maioria das leguminosas pode até promover um efeito benéfico) e outra extrema (concentração elevada – 10mM.L^{-1}), capaz de inibir intensamente a nodulação (SILVEIRA *et al.*, 1998). Essas duas condições são comuns para as condições de cultivo das leguminosas, as quais podem depender e utilizar uma ou ambas das principais formas de N disponíveis nos solos, NO_3^- e N_2 .

Há muito tempo existem grandes controvérsias sobre as relações funcionais que ocorrem entre nódulos e folhas das leguminosas. É fato incontestado que as folhas suprem nódulos e raízes com fotossintatos, enquanto que os nódulos fornecem N e outros nutrientes para o crescimento da parte aérea das plantas (SILVEIRA, 1987). Ocorrem controvérsias quanto aos mecanismos fisiológicos que regulam e controlam tais relações. Quando plantas de soja foram submetidas a um déficit hídrico discreto, observou-se enorme decréscimo na atividade de redução do acetileno (atividade da nitrogenase) dos nódulos (70%), enquanto que a fotossíntese foi reduzida somente em 5% (DURAND *et al.*, 1987). Além disso, os nódulos estressados apresentaram níveis de sacarose e carboidratos compatíveis com a sua atividade normal. Na realidade, diversos trabalhos com estresse hídrico de plantas noduladas têm mostrado que a atividade dos nódulos é bem mais sensível do que a fotossíntese (OBATON *et al.*, 1995; SERRAJ & SINCLAIR., 1997).

Os trabalhos com deficiência hídrica têm demonstrado que as leguminosas tropicais, como o feijão-de-corda, quando dependem totalmente do nitrogênio oriundo da fixação simbiótica, são mais sensíveis à seca do que as leguminosas de clima temperado (SINCLAIR & SERRAJ, 1995, SERRAJ & SINCLAIR, 1997). Uma hipótese lançada recentemente aponta para o grande acúmulo de ureídeos na parte aérea dessas espécies sob estresse, como o fator preponderante na limitação do crescimento (SERRAJ & SINCLAIR, 1997). Sob condições controladas, observou-se, recentemente, em soja, que a introdução no xilema de ureídeos exógenos provocava inibição na atividade de nitrogenase (SERRAJ & SINCLAIR, 1997). Os autores concluíram que o efeito dos ureídeos pode ser indireto, envolvendo a síntese de algum outro composto regulador, possivelmente a asparagina. Outra corrente de pesquisadores tem observado que o déficit hídrico provoca alterações na permeabilidade ao O₂ através das células do córtex, associadas com a diminuição na concentração de leghemoglobina no nódulo (GUERIN *et al.*, 1990).

No caso do estresse salino, os resultados são mais escassos e conflitantes. Inicialmente, ainda não estão esclarecidos os efeitos e mecanismos

de ação da salinidade sobre as diferentes fases do processo simbiótico, sobrevivência do rizóbio, processo de infecção das raízes, estágio de nodulação, crescimento e metabolismo do nódulo. A outra dificuldade está relacionada com as diferentes metodologias de introdução da salinidade nos experimentos. De qualquer maneira, vários autores têm demonstrado que as fases iniciais de sobrevivência e infecção do rizóbio são mais tolerantes à salinidade do que as fases seguintes de desenvolvimento e crescimento dos nódulos (RUSSEL, 1976; TU, 1981; VELAGALETI *et al.*, 1990). Por outro lado, existe grande variabilidade genética de rizóbio e espécie vegetal para a salinidade, além da interação decorrente dos simbiossiontes envolvidos (CORDOVILLA *et al.*, 1995).

No presente estudo, os efeitos da salinidade, tanto sob curta duração (4 dias), quanto em longa duração (31 dias), foram aproximadamente proporcionais para os crescimentos (acúmulo de fitomassa) de nódulos e folhas. Apesar do rizóbio e nódulos estarem diretamente em contato com o NaCl, observou-se uma tendência das folhas de mostrarem maior sensibilidade à salinidade do que os nódulos, particularmente na presença dos níveis mais elevados de NaCl (200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}) – Figuras 1 e 2. Por outro lado, quando um nível moderado de NaCl (50mM.L^{-1}) foi aplicado desde o plantio e inoculação, observou-se que a cultivar Vita 3 mostrou maior tolerância à salinidade do que a Vita 7, quando ambas foram inoculadas na presença de um nível muito baixo de nitrato. Esses resultados são semelhantes aos obtidos quando essas duas cultivares foram submetidas a um estresse hídrico moderado (COSTA, 1999).

A presença de uma concentração elevada de Ca^{+2} (10mM.L^{-1}) promoveu uma proteção ao NaCl quanto à perda de massa fresca somente nas folhas (cultivar Vita 7), por mecanismos não elucidados neste estudo, já que esse tratamento não promoveu um ajustamento osmótico diferencial, nem menor acumulação dos íons Na^+ e Cl^- nas folhas. Entretanto, visualmente as folhas desse tratamento mostraram menor perda de turgescência, fato que talvez pudesse explicar a maior massa fresca das folhas tratadas com Ca^{+2} devido aos efeitos positivos desse cátion sobre a permeabilidade das membranas,

favorecendo a retenção de água e eletrólitos (BLISS *et al.*, 1984). No caso dos nódulos, os efeitos do Ca^{+2} não foram tão evidentes como nas folhas, talvez devido ao maior contato das raízes com o Ca^{+2} residual retido na vermiculita do tratamento com baixo nível desse nutriente.

Como era esperada, a presença de 10mM.L^{-1} de nitrato provocou uma intensa inibição na nodulação das duas cultivares. Por outro lado, a fonte de nitrogênio através da fixação simbiótica promoveu um maior "status" de nitrogênio nas plantas das duas cultivares crescidas na ausência de NaCl, quando comparada com o tratamento com 10mM.L^{-1} de nitrato (Figura 12). Tendo em vista que a produção de fitomassa foi semelhante nos dois níveis de nitrato (Figura 3), pode-se inferir que a fixação simbiótica de N_2 , nas duas cultivares, foi tão eficiente quanto a utilização de nitrogênio proveniente do nitrato. É interessante observar que os tratamentos com 50mM.L^{-1} e 200mM.L^{-1} de NaCl provocaram diminuição na porcentagem de nitrogênio das folhas das duas cultivares (principalmente em Vita 3), somente quando da presença do nível muito baixo de nitrato (Figura 12). Dessa maneira, as duas cultivares utilizaram com eficiência similar as duas fontes de nitrogênio. Entretanto, as cultivares mostraram respostas diferentes ao estresse salino quanto ao nível de nitrato: Vita 3 mostrou maior tolerância na presença do nível baixo de nitrato (utilização do nitrogênio a partir da fixação do nitrogênio), enquanto que Vita 7 foi ligeiramente mais tolerante na presença de 10mM.L^{-1} de nitrato (utilização do nitrogênio principalmente a partir da assimilação do nitrato).

Os trabalhos da literatura consultada são escassos quanto aos efeitos relativos da salinidade sobre o crescimento de nódulos e folhas. Os efeitos negativos do estresse salino sobre a fixação simbiótica de nitrogênio podem ser diversos, envolvendo desde a sobrevivência do rizóbio até falhas no processo de infecção das raízes (SINGLETON & BOHLOOL, 1984). Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado que a iniciação do nódulo e o estabelecimento da planta são mais sensíveis ao estresse osmótico (RUSSEL, 1976; TU, 1981; VELAGALETI *et al.*, 1990). Quanto ao processo de fixação simbiótica de

nitrogênio, as leguminosas têm mostrado respostas diferentes ao estresse salino (LAUTER *et al.*, 1981; RAÍ & PRASAD, 1983; VELAGALETI & MARSH, 1989; CORDOVILLA *et al.*, 1995). Em *Vicia faba* tratada com 100mM.L⁻¹ de NaCl, observou-se redução de 30% na efetividade de infecção (YOUSEF & SPRENT, 1983; ZAHRAN & SPRENT, 1986). Em outro estudo, as massas secas de nódulo e da parte aérea foram reduzidas em 50% na presença de 75mM.L⁻¹ de NaCl (CORDOVILLA *et al.*, 1995).

Trabalho com diferentes níveis de NaCl (0, 50mM.L⁻¹, 75mM.L⁻¹ e 100mM.L⁻¹) em *Vicia faba*, uma leguminosa considerada tolerante à salinidade (CORDOVILLA *et al.*, 1995), mostraram que 50mM.L⁻¹ aplicados durante quatro semanas, provocaram menor redução na massa seca de nódulos comparada com a da parte aérea das plantas. Outras espécies tratadas com níveis similares de NaCl (*Cicer arietinum* e *Vigna radiata*) mostraram maior sensibilidade para o crescimento dos nódulos (HAFEEZ *et al.*, 1988; ELSHEIKH & WOOD, 1990). No presente estudo, a massa dos nódulos de Vita 3 e Vita 7 foram reduzidas somente em 24% e 40%, respectivamente, quando tratadas com 50mM.L⁻¹ de NaCl. Esses resultados mostram que o processo global de nodulação em feijão-de-corda se mostrou bastante tolerante à salinidade, quando comparado com os resultados de outras leguminosas.

Com relação à tolerância ao estresse salino em função das fontes de nitrogênio para as leguminosas, nenhum trabalho foi encontrado na literatura. No caso do déficit de água, diversos trabalhos têm demonstrado que as plantas que dependem do nitrogênio são mais sensíveis ao estresse do que as supridas com nitrato (OBATON *et al.*, 1982; OBATON *et al.*, 1995; PURCELL & KING, 1996). Plantas de soja supridas com KNO₃ foram mais tolerantes ao estresse hídrico do que as dependentes da fixação de N₂ (PURCELL & KING, 1996). No caso do feijão-de-corda, estudos anteriores com as mesmas cultivares (Vita 3 e Vita 7) utilizadas no presente estudo, sob condições ambientais semelhantes, quando submetidas a um estresse hídrico moderado, não foi evidenciado um efeito benéfico em termos do suprimento de nitrato para as plantas noduladas (COSTA, 1999).

Medidas relacionadas com a atividade dos nódulos de feijão-de-corda (concentração de proteínas, concentração de leghemoglobina, atividade de glutamina sintetase, concentração de aminoácidos livres e amônia) mostraram que os diferentes tratamentos com NaCl tiveram pouco efeito sobre a integridade dos nódulos, particularmente quanto a indução de senescência e necrose. Ao contrário, o estresse salino provocou nitidamente início dos processos de senescência, clorose e necrose em parte das folhas, quando as plantas foram submetidas a níveis muito elevados de NaCl (200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}). Esses efeitos foram corroborados pelos grandes incrementos nas concentrações de proteínas solúveis, aminoácidos livres, amônia e decréscimos nas concentrações de clorofilas. Destaque-se que os níveis mais elevados de NaCl induziram senescência e abscisão foliar. Assim, os decréscimos no conteúdo de nitrogênio (Figura 12) e fitomassa parte aérea foram causados em grande parte pela queda das folhas senescentes.

Quanto aos efeitos do NaCl sobre a atividade de fixação biológica de nitrogênio dos nódulos das plantas, os resultados desse estudo não são conclusivos. O grande acúmulo de ureídeos nos nódulos (Figura 11) e folhas (Figura 16), associados com os pronunciados decréscimos na seiva do xilema (Figura 11) nos níveis mais elevados de NaCl, sugerem que as taxas de fixação de N_2 foram reduzidas pela salinidade. Entretanto, esses efeitos não foram observados nos níveis de 50mM.L^{-1} e 100mM.L^{-1} de NaCl (Figuras 11 e 16), nem no Experimento II (dados não apresentados), fatos que podem limitar a conclusão sobre a extensão com que a salinidade afetou a fixação de nitrogênio nesse estudo. Quando plantas inoculadas de *Vicia faba* foram submetidas até 100mM.L^{-1} de NaCl, observou-se uma grande diminuição na atividade da nitrogenase, a qual foi várias vezes mais expressiva que aquela observada na massa de nódulos e parte aérea das plantas (CORDOVILLA *et al.*, 1995). Entretanto, a atividade da enzima não apresentou uma correlação boa com o conteúdo de nitrogênio fixado, o qual foi melhor correlacionado com a massa dos nódulos.

Outros trabalhos têm demonstrado que a atividade de nitrogenase é

extremamente sensível à salinidade (HAFEEZ *et al.*, 1988; ELSHEIFH & WOOD, 1990; LEIDI *et al.*, 1992). Infelizmente, o método mais adotado para mensuração da atividade dessa enzima, através da redução do acetileno por raízes intactas, está sujeito a uma série de limitações e nem sempre reflete a taxa real de fixação de nitrogênio (SILVEIRA *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 1998a). No presente estudo, o conteúdo de nitrogênio total na parte aérea da planta (Figura 12), o qual correlaciona-se positivamente com a quantidade de nitrogênio fixado das plantas cultivadas na presença de um nível muito baixo de nitrato, foi reduzido somente pela diminuição na massa das plantas, sendo que a porcentagem de nitrogênio (na base de massa seca) foi reduzida discretamente somente nas plantas tratadas com NaCl durante longa duração. Portanto, torna-se difícil avaliar a extensão pela qual os tratamentos com NaCl influenciaram o processo de fixação de nitrogênio, muito embora CORDOVILLA *et al.*, (1995) concluírem que esse processo fora intensamente reduzido pelo NaCl em *Vicia faba*.

Alguns trabalhos têm mostrado que a porcentagem de nitrogênio nas plantas noduladas é reduzida mais intensamente pelo estresse salino do que o acúmulo de fitomassa (WAHAB & ZAHRAN, 1981; CORDOVILLA *et al.*, 1995), enquanto que outros não têm observado qualquer alteração no conteúdo de nitrogênio (SINGLETON, 1983; WEIL & KHALIL, 1986). Uma maior redução no acúmulo de fitomassa em relação ao acúmulo de nitrogênio, indica que o processo de fotossíntese ou fluxo de carbono foi mais afetado do que a fixação de nitrogênio (SILVEIRA, 1987; SILVEIRA *et al.*, 1989). No caso do estresse hídrico, diversos trabalhos têm demonstrado que a fotossíntese é menos afetada do que a assimilação de nitrato (FERRARIO-MÉRY *et al.*, 1998) e do que a fixação de N₂ (DURAND *et al.*, 1987; DJEKOUN & PLANCHON, 1991). Quando nódulos e folhas de *Medicago sativa* foram comparados diante do déficit hídrico, concluiu-se que os primeiros foram mais sensíveis ao estresse (IRIGOYEN *et al.*, 1992).

As enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) representam a principal via de assimilação da amônia proveniente da fixação de

N₂ nos nódulos (SILVEIRA *et al.*, 1998; SILVEIRA *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 1998b). No presente estudo, a atividade de GS nos nódulos não foi alterada pelos diferentes tipos de estresse salino. De maneira diferente, em *Vicia faba* as atividades de GS e GOGAT foram reduzidas pela salinidade (CULLIMORE & BENNETT, 1988; CORDOVILLA *et al.*, 1995). Resultados similares foram obtidos em nódulos de soja (BOURGEAIS-CHAILLOU *et al.*, 1992). Em trabalho recente com plantas noduladas de *Vicia faba* submetidas a níveis crescentes de NaCl, concluiu-se que a atividade de GS foi menos afetada pelo estresse salino do que a atividade de GOGAT (CORDOVILLA *et al.*, 1995). A manutenção da atividade de GS em níveis inalterados nos nódulos de feijão-de-corda, diante do estresse salino, pode indicar uma certa tolerância ao estresse, já que essas mesmas cultivares tiveram a atividade dessa enzima diminuída pelo estresse hídrico, em estudo anterior (COSTA, 1999).

Trabalho recente com plantas noduladas de *Vigna unguiculata* submetidas a níveis de déficit hídrico progressivo têm mostrado que a atividade de GOGAT nos nódulos foi mais sensível ao estresse do que as atividades de GS e glutamato desidrogenase – GDH (FIGUEIREDO *et al.*, 1999). Em outro trabalho, esses autores verificaram que a concentração de ureídeos na seiva do xilema foi drasticamente reduzida pelo estresse hídrico, sendo positivamente correlacionada com a atividade de nitrogenase (FIGUEIREDO *et al.*, 1998). Apesar dessas correlações, os autores observaram que os efeitos relativos do estresse hídrico sobre a acumulação de nitrogênio na parte aérea das plantas foram menos drásticos do que os observados na atividade de nitrogenase. Essas observações reforçam a idéia de que nem sempre a medida da atividade da nitrogenase, através do método da redução do acetileno, reflete a taxa de fixação de nitrogênio.

No presente estudo, observou-se uma drástica redução na concentração de ureídeos no xilema, acompanhado de acúmulo desses compostos nos nódulos e folhas das plantas tratadas com os níveis muito elevados de NaCl. É possível que acumulação dos ureídeos nos nódulos possa ter sido causado, pelo menos em parte, pela diminuição do fluxo de água dos nódulos para o xilema,

causado pelo estresse osmótico. A presença do NaCl, particularmente nos níveis mais elevados, causou uma drástica restrição no fluxo transpiratório, praticamente restringindo a transpiração após 24 horas de tratamento. Tendo em vista que os ureídeos apresentam baixa solubilidade (SERRAJ & SINCLAIR, 1997), é de se esperar uma acumulação dos mesmos nos nódulos e uma diminuição em sua concentração no xilema. O acúmulo desses compostos nas folhas pode ser explicado, em parte, devido à brusca redução no crescimento, com a conseqüente diminuição na atividade das alantoinases das folhas.

Permanece em aberto se a acumulação dos ureídeos em folhas e nódulos de feijão-de-corda, submetido a níveis elevados de NaCl, pode ter exercido um controle, por retro-alimentação negativa, sobre a atividade de nitrogenase como proposto recentemente por SERRAJ & SINCLAIR (1997). Neste caso, haveria uma regulação à longa distância, pelo nível de compostos nitrogenados livres na planta. Os autores acreditam que os ureídeos possam estar envolvidos indiretamente na regulação, sendo a asparagina o modulador mais provável de regulação para a atividade de nitrogenase. Entretanto, no presente trabalho, quando as plantas foram submetidas a níveis mais baixos de NaCl, não se observou acúmulo de ureídeos em nódulos e folhas, a despeito de se verificar reduções nas massas de nódulos e folhas e decréscimo no conteúdo de nitrogênio (mg/planta).

De um modo geral, os efeitos do estresse salino sobre a acumulação de fitomassa em nódulos e folhas foram proporcionais. Associado a isso, verificaram-se efeitos semelhantes do NaCl sobre as concentrações de nitrogênio total nas folhas das duas cultivares de feijão-de-corda inoculadas na presença de um nível muito baixo de nitrato, enquanto que nas plantas supridas com nível elevado de nitrato, a porcentagem de nitrogênio permaneceu inalterada. Esses resultados evidenciam que nas plantas dependentes da fixação de nitrogênio, os efeitos da salinidade reduziram proporcionalmente esse processo e a produção de fitomassa, através da fotossíntese. Entretanto, quando as plantas foram supridas essencialmente com nitrato, os efeitos do estresse salino foram mais drásticos sobre a produção de

fitomassa do que sobre a assimilação do nitrato. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores com plantas de feijão-de-corda não inoculadas e supridas somente com nitrato (MELO, 1999; SILVEIRA *et al.*, 1999).

Quando níveis muito elevados de NaCl (200mM.L^{-1} e 400mM.L^{-1}) foram aplicados nas plantas de feijão-de-corda inoculadas na presença de um nível muito baixo de nitrato, observaram-se grandes alterações no metabolismo do nitrogênio nas folhas. Os grandes incrementos nas concentrações de proteínas solúveis, aminoácidos livres, amônia e aumento na atividade de glutamina sintetase, associados com os decréscimos nas concentrações de clorofilas, indicam claramente a presença do processo de senescência foliar. Resultados semelhantes foram obtidos com plantas de cajueiro submetidas a níveis mais baixos de NaCl (VIÉGAS, 1999). Essa senescência induzida pelo NaCl foi acompanhada de um intenso acúmulo de prolina nas folhas, tanto no presente estudo quanto em cajueiro.

Apesar de diversos trabalhos da literatura relatarem que o acúmulo de prolina deva estar associado ao ajustamento osmótico e proteção de estruturas protéicas (RAJENDRAKUMAR *et al.*, 1995; SARADHI *et al.*, 1995; IYER & CAPLAN, 1998), os resultados com plantas de cajueiro submetido ao estresse salino têm sugerido que esse acúmulo pode ser reflexo das profundas alterações no metabolismo das proteínas e aminoácidos (VIÉGAS *et al.*, 1999). Os resultados deste estudo reforçam essa hipótese, pois a acumulação de prolina somente foi expressiva nos tratamentos com níveis muito elevados de NaCl. Além disso, o aumento na concentração desse aminoácido foi relacionado, dentro de limites, com os incrementos nas concentrações de outras formas nitrogenadas. É óbvio que a acumulação de prolina é várias vezes mais expressiva do que a de outros compostos nitrogenados, sugerindo que nessas condições de estresse intenso suas vias de acumulação são estimuladas em detrimento de outras.

A acumulação de prolina nas folhas, nos níveis mais elevados de NaCl, foi acompanhada de intenso aumento nas concentrações de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2}

enquanto que a concentração de K^+ aumentou apenas discretamente. Permanece em aberto o quanto essa acumulação de solutos contribuiu para o ajustamento osmótico das folhas de feijão-de-corda. É possível que essas alterações, em parte, tenham sido causadas por efeitos das elevadas concentrações de NaCl no substrato associados com diminuição na permeabilidade das membranas causada pelo estresse salino (VIÉGAS, 1999). Deve ser enfatizado que, sob condições de estresse salino mais moderado, não se observou acúmulo expressivo de prolina nas folhas de feijão-de-corda, semelhante ao observado anteriormente por MELO (1999) e LACERDA (1995).

5. CONCLUSÕES

Os efeitos do estresse salino induzidos pelo NaCl causaram reduções proporcionais na acumulação de fitomassa em nódulos e folhas das duas cultivares de feijão-de-corda.

A concentração de leghemoglobina, a atividade da glutamina sintetase e a concentração de amônia livre não foram alteradas pelo estresse salino. Nos níveis mais elevados de cloreto de sódio, verificou-se grande aumento na concentração de ureídeos nos nódulos, acompanhado de expressiva redução na concentração desses compostos na seiva do xilema.

Nas folhas, os níveis mais elevados de cloreto de sódio provocaram profundas alterações no metabolismo dos compostos nitrogenados. A atividade de glutamina sintetase foi aumentada, paralelamente ao incremento na concentração de proteínas solúveis, aminoácidos totais, amônia livre e ureídeos. A concentração de prolina foi aumentada cerca de 20 vezes no nível mais elevado de NaCl.

Os resultados sugerem que deve existir um balanço funcional coordenado para o crescimento de nódulos e folhas de plantas noduladas de feijão-de-corda submetidas ao estresse salino.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABD-ALLA, M. H.; ABDEL WANAB, A. M. Survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae subject to heat, drought and salinity in soil. *Biologia Plantarum*, v. 37, p.131, 1995.
- APPLEBY, C. A. Leghemoglobin and rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35:443-478, 1984.
- ARAÚJO, J. P. P.; RIOS, G. P. & WATT, E. E. Composição química das sementes de cultivares de caupi, *Vigna unguiculata* (L) Walp. e correlação entre alguns de seus componentes. Resumo da I Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi. Goiânia: EMBRAPA – CNPAF, Circular Técnica. v. 18, 82p., 1984.
- ARAÚJO, J. P. P.; RIOS, G. P.; WATT, E. E.; NEVES, B. P.; FAGERIA, N. K.; OLIVEIRA, I. P.; GUIMARÃES, C. M. & SILVEIRA FILHO, A. Cultura do Caupi, *Vigna unguiculata* (L) Walp: descrição e recomendações técnicas de cultivo. Goiânia, EMBRAPA-CNPAF, 82p. 1984. (EMBRAPA – CNPAF. Circular técnica, 18).
- ASLAM, M.; HUKFFAKER, R. C. & RAINS, D. W. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.*, 76: 321-325, 1984.
- ASPINALL D. & PALEG, L. G. Proline accumulation: Physiological aspects. In: the physiology and biochemistry of drought resistance in plants (PALEG, I. G. & ASPINALL, D., eds.), p. 206-240. Academic Press, New York. 1981.
- AYERS, R. S. & WESTCOT, D. W. A qualidade da água para irrigação. Tradução de GHEYI, J.F.; MEDEIROS, J.F. & DAMASCENO, F.A.V. Campina Grande, UFPB, 218p. 1991.

- AZAIZEH, H.; GUNSE, B; & STEUDLE, E. Effects of NaCl and CaCl₂ on water transport across root cell of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 99:886-894, 1992.
- BLISS, R. D.; PLATT-ALOIA, K. A. & THOMSON, W. N. Changes in plasmalemma organization in cowpea radicle during inhibition in water and NaCl solutions. *Plant Cell and Environm.*, 7:601-606, 1984b.
- BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E. & JENSEN R. G. Adaptations to environmental stress. *The Plant Cell*. 7:1109-1111, 1995.
- BOURGEAIS-CHAILLOU, P.; PÉREZ-ALFOCEA, F. & GUERRIER, G. Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl stress. *J. Exp. Bot.*, 254, 1125-1233, 1992.
- BOYER, J. S. Effects of osmotic water stress on metabolic rates of cotton plants with open stomates. *Plant Physiol.*, 40:229-234, 1965.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analitic Biochem.*, 722:248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Coordenadoria de Assuntos Econômicos. Aptidão pedoclimática – zoneamento por produto. Rio de Janeiro, 2v. 1984.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. 2: 48-54, 1997.
- BRUNGOLI, E. & LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt tolerant (*Gossypium hirsitium* L.) and salt- sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. *Plant Physiology*, 95: 628-635, 1991.
- CANO, E. A.; BOLARIN, M. C.; PEREZ-ALFOCEA, F. & CARO, M. Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. *J. Hortic. Sci.*, 66:621-628, 1991.

- CARTER, D. L. Problems of salinity in agriculture. In: POLJAKOFF-MAYBER, A. & GALE, J., eds. Plants in saline environments. New York. Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag, p.25-35, 1975.
- CAWSE, P. A. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analytic*, 92: 311. 1967.
- CHAPMAN, V. J. The salinity problem in general, its importance and distribution with special reference to natural halophytes. In: POLJAKOFF-MAYBER, A. & GALE, J., eds. Plants in saline environments. New York.. Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag, p.7-24, 1975.
- CHESSEMAN, J. M. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.*, 87:547-550, 1988.
- CORDOVILLA, M. P.; LIGERO, F. & LLUNCH, C. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil*, 172, 289-297, 1995.
- COSTA, R. C. L. Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda *Vigna unguiculata*, (Walp) L., submetidas ao estresse hídrico. Fortaleza, UFC. 255p, 1999. (Tese de doutorado).
- CRONQUIST, A. Outline of classification of *Magnoliophita*. The evolution and classification of flowering plants. USA: The New York, p.503-514, 1988.
- CULLIMORE, J. V. & BENNETT, M. J. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from roots nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. *Plant Physiol.*, 132, 387-393, 1988.
- DAKORA, F. D. A functional relationship between leghemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of two proteins in legume root nodules. *Annals of Bot. Company*, 75:49-54, 1995.
- DELWICHE, C. C. Cycling of elements in the biosphere. In: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 15A, p. 212-238, Ed. Springer-Verlag,

Berlin. 1983.

DJEKOUN, A. & PLANCHON, D. Water status effect on dinitrogen fixation and photosynthesis in soybean. *Agron. J.*, 83, 316-322. 1991.

DURAND, M. & LACAN, D. Sodium partitioning within the shoot of soybean. *Physiol. Plantarum*, 91:65-71. 1994.

DURAND, J. L.; SHEEHY, J. E. & MINCHIN, F. R. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potencial in soybeans plants experiencing water deprivation. *J. Exp. Bot.*, 38, 311-321, 1987.

ELSHEIFH, E. A. E. & WOOD, M. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.*, 41, 1263-1269, 1990.

ERDEI, L. & TALEISNIK, E. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiol. Plant.*, 89:381-387, 1993.

FAGERIA, N. K & GHEYI, H. R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In : XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (GHEYI, H. R.; QUEIROZ, J. E. & MEDEIROS, J. F., eds.). p.363-383, UFPB. Campina Grande, 1997.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal. Chem.*, v. 49, p.1080. 1977.

FERRARIO-MÉRY, S.; VALADIER, M. & FOYER, C. H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiol.* 117, 293-302. 1998.

FIGUEIREDO, M. V. B.; VILAR, J. J.; BURITY, H. A. & DE FRANÇA, F. P. Water deficit stress effects on N₂ fixation in cowpea inoculated with different *Bradyrhizobium* strains. *Can. J. Plant Sci.* 78, 577-582. 1998.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A. & DE FRANÇA, F. P. Drought stress response in enzymatic activities of cowpea nodules. *J. Plant Physiol.* 155,

262-268.1999.

FLOWERS, T. J.; GARCIA, A.; KOYARNA, M. & YEO, A. R. Breeding for salt tolerance in crop plants - the role of molecular biology. *Acta Physiol. Plantarum*, 19:427-433. 1997.

GIRMA, F. S. & KRIEG, D. R. Osmotic adjustment in sorghum. I. Mechanisms of diurnal osmotic potential changes. *Plant Physiol.*, 99:577-582, 1992.

GREENWAY, H. & MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31:149-190.1980.

GUERIN, V.; TRINCHANT, J. C. & RIGAUD, J. Nitrogen fixation (C_2H_2 reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol.* 92, 595-601. 1990.

HAAKER, H. Biochemistry and physiology of nitrogen fixation. *BioEssays*, 9:112-117. 1988.

HAFEEZ, F. Y.; ASLAM, Z. & MALIK, K. A. Effects of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* L. *Wilczek. Plant and Soil*, 106, 3-8. 1988.

HAGEMAN, R. H. & HUCKLESBY, D. P. Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in Enzymology*, 17:491-503. 1971.

HARDY, R. W. F. Biological nitrogen fixation: present and future applications. p. 109-117. In: *Agriculture and Environmental Challenges*. Srivastava, J. P. & Aldermans H. eds. Proc. 13th Agric. Sector Symp. Washington, D.C.: The World Bank, 1993.

HOAGLAND, D. R. & ARNON. D. I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Univ. Calif. Berkeley Circ.* 347:139, 1950.

INGRAN, J. & BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Ann. Rev. P. Physiol. Mol. Biol*, 47:377-403. 1996.

- IRIGOYEN, J. J.; EMERICH, D. W. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84, 55-60, 1992
- IYER, S. & CAPLAN, A. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.*, 116: 203-211. 1998.
- JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn., 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co.. p. 235-244, 1984.
- KISHOR, P. B. K.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. & VERMA, S. P. S. Overexpression of Δ^1 - pyrroline - 5 - carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108: 1387-1394. 1995.
- KUZNETSOV, V. V., & SHEVYAKOVA, N. I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiol. Plant.*, 100:320-326, 1997.
- LACERDA, C. F. Efeitos da salinidade no desenvolvimento e composição mineral do feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L) Walp e utilização do Ca^{2+} como meio para minorar tais efeitos. UFC, Fortaleza. Dissertação de Mestrado. 87p. 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature*, 227:689-695. 1970.
- LAROSA, P. C.; RHODES, D.; RHODES, J. C.; BRESSAN, R. A. & CSONKA, L. N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ^1 - pyrroline-5-carboxylate reductase. *Plant physiol.*, 96:245-250, 1991.
- LAUTER, D. J.; MUNNS, D. N. & CLARKIN, K. L. Salt response of chickpea influenced by N supply. *Agric. J.*, 73, 961-966, 1981.

- LEIDI, E. O.; SILBERBUSH, M. S. & SOARES, M. I. M. LIPS. Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plant. *J. Plant Nutr.*, 15, 591-604, 1992.
- LIMA, L. A. Efeitos de sais no solo e na planta. In: XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. (GHEYI, H. R.; QUEIRÓZ, J. E. & MEDEIROS, J. F., eds.). p.113-136. UFPB, Campina Grande. 1997.
- LIU, J. & ZHU, J. K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt hypersensitive mutant of arabidopsis. *Plant Physiol.*, 114:591-596, 1997.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. & OLIVEIRA, S. A. Avaliação do Estado Nutricional das Plantas : Princípios e Aplicações. Piracicaba : POTAFOS. 201p., 1989.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London. 1986.
- MELO, A. R. B. Utilização de nitrato e ajustamento osmótico em plantas de feijão-de corda [(*Vigna unguiculata* L (Walp))] submetidas a diferentes níveis de estresse salino. Tese de Doutorado - UFC. Fortaleza, 1999. 255p.
- MCCREE, K. J. & RICHARDSON, S. G. Stomatal closure vs. Osmotic adjustment: A comparasion of stress responses. *Crop Sci.*, 27:539-543, 1987.
- MUNNS, R. Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. I. Ions in xylem sap. *Plant Cell Environ.*, 11:283-289, 1988.
- MUNNS, R. Physiological process limiting plant growth in saline soils: some dogms and hypothesis. *Plant Cell Environ.*, 16:757-766, 1993.
- NABIL, M. & COUDERT, A. Effects of sodium chloride on growth, tissue elasticity and solute adjustment in two *Acacia nilotica* subspecies. *Physiol. Plant.*, 93: 217-224, 1995.

- NIU, X. ; BRESSAN, R. A. ; HASEGAWA, P. M. & PARDO, J. M. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.*, 109:735-742, 1995.
- NORRIS, D. O. Legume bacteriology in some concepts and methods in subtropical pasture research. Brisbane, CSIRO. P. 102-117. Bulletin 47. 1968.
- OAKS, A. & HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:345-365. 1985.
- OBATON, M.; BERGER, A.; JUNHU, L.; FOURNIER,, C.; PANNE, F. & SALLES, G. Influence du déficit hydrique sur la nutrition azotée du soja (*Glycine max* L. Merr.). In: DREVON, J. J., ed. Facteur limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen. Paris: INRA (Les Colloques N° 77), 31-48, 1995.
- OBATON, M.; MIGUEL, M.; ROBIN, O.; CONEJERO, G.; DOMENACH, A. M. & BARDIN, R. Influence du déficit hydrique sur l'activité, nitrate réductase et nitrogénase chez le soja (*Glycine max* L. Merr.cv. Hodgson). *Comptes rendus hebdomadaire de séances de l'Académie des sciences*, 294, 1007-1012, 1982.
- OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. (Gheyi, H. R.; Queiróz, J. E. & Medeiros, J. F., eds.). p.1-35. UFPB, Campina Grande, 1997.
- OLIVEIRA, J. P. & CARVALHO, A. M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmido e semi-árido do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P. & WATT, E. E. (eds.). *O Caupi no Brasil*. p.63-69. Brasília, IITA/EMBRAPA. 1988.
- PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; REAKASEM, B. & HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. 76 p., 1989.
- PETRUSA, L. M. & WINICOV, I. Proline status in salt-tolerance and salt-sensitive alfafa cell lines and plants in response to NaCl. *P. Physiol. Biochem.*, 35:

303-310, 1997.

- PONTE, N. T. Aspectos do feijão Caupi no Estado do Pará. In: Curso de treinamento para pesquisadore de Caupi, 1, Goiânia. Assuntos. Goiânia, EMBRAPA/CNPAF, 1979.
- PURCELL, L. C. & KING C. A. Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. *J. Plant Nutr.* 19, 969-993, 1996.
- RABE, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. IN: Handbook of Plant and Crop Stress. Ed. Mohammad Passarakli, Marcel Dekker, Inc., New York, p.230-265, 1993.
- RACHIE, K. O. & ROBERTS, L. M. Grain legumes of the lowland tropics. *Acv. Agron.*, 26:2-118, 1974.
- RAI, R. & PRASAD, V. Salinity tolerance of Rhizobium mutants: growth and relative efficiency of symbiotic nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 15, 217-219, 1983.
- RAJENDRAKUMAR, C. S. V.; REDDY, B. V. D. & REDDY, A. R. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 957-963, 1995.
- RENNIE, R. J. Comparison N balance and ¹⁵N isotope dilution to quantify N₂ fixation in field grown legumes. *Agron J.*, 76:785-790, 1984.
- RODRÍGUEZ, H. G.; ROBERTS, J. K. M.; JORDAN, W. R. & DREY, M. C. Growth, water relations and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol.*, 113:881-893, 1997.
- RODRIGUES, J. L. M., MELLOTO, M. & SILVEIRA, J. A. G. Nodulin activities, hydrogenase expression and nitrogen fixation in cowpea inoculated with Hup⁺ and Hup⁻ symbionts. *Braz. J. Plant Physiol.* 10(2), 85-90, 1998.

- RODRIGUES, J. L. M.; MELLOTO, M.; OLIVEIRA, J. T. A. & SILVEIRA, J. A. G. Efficiency of soybean nodules in relation to nodulin activities and hydrogenase expression. *Braz. J. Plant Physiol.* 10(3), 173-78, 1998.
- RUSSEL, J. S. Comparative salt tolerance of some tropical and temperate legumes and tropical grasses. *Austr. J. Exp. Agric. Anim. Husbandry*, 16, 103-109, 1976.
- SALISBURY, F. B. & ROSSI, C. W. *Plant Physiology*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. 1992.
- SANTOS, R.V. & MURAOKA, T. Interações salinidade e fertilidade do solo. In: XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. (GHEYI, H. R.; QUEIRÓZ, J. E. & MEDEIROS, J. F., eds.). p. 289-317. UFPB, Campina Grande, 1997.
- SARADHI, P. P.; ARORA, S. & PRASAD, K. V. S. K. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1-5, 1995.
- SARRUGE, J. R. & HAAG, H. P. *Análise química de plantas*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p., 1974.
- SCHUBERT, K. R.; JENNINGS, N. T. & EVANS, H. J. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. *Plant Physiol.*, 61:398-401, 1978.
- SERRAJ, R. & SINCLAIR, T. R. Variation among soybean cultivars in dinitrogen fixation response to drought. *Agron. J.*, 89, 963-969, 1997.
- SHIHE, F.; BLAKE, T. J. & BLUMWALD, E. The relative contribution of elastic and osmotic adjustments to turgor maintenance of woody species. *Physiol. Plant.*, 90:408-413, 1994.

- SILVEIRA, J. A. G. 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. 1987.
- SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J. L.; RODRIGUES, J. L. M. & OLIVEIRA, J. T. A. Phosfoenolpyruvate Carboxylase and Glutamine Synthetase Activities in Relation to Nitrogen Fixation in Cowpea Nodules. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10(1):19-23, 1998.
- SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B. & VIÉGAS, R. A. Salt-induced decrease on nitrate uptake and assimilation. In: cowpea plants. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11(2), 1999.
- SINCLAIR, T. R. & SERRAJ, R. Dinitrogen fixation sensitivity to drought among grain legume species. *Nature*, 378:344, 1995.
- SINGLETON, P. W. & BOHLOOL, B. B. Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Can. J. Plant Sci.*, 61, 231-239, 1984.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. *Biotechnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas*. MEC, ABEAS, ESAL, FAEPE, Série Agronômica, 236p, 1988.
- SOLOMON, A.; BEER, S.; WAISEL, G.; JONÈS, P. & PALEG, L. G. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. *Physiol. Plant.*, 90:198-204, 1994.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. *Handbook for Rhizobia*. New York. Springer-Verlag. 1994.
- SPICKETT, C. M.; SMIRNOFF, N. & RATCLIFFE, R. G. Metabolic responses of maize roots to hyperosmotic shock. *Plant Physiol.*, 99:856-863, 1992.
- STAMFORD, N. P. & NEPTUNE, A. M. L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares

de *Vigna unguiculata* (L) Walp. Cad. Ômega, Recife, 3(1/2):25-34, 1979.

STEWART, G. R. Proline accumulation: Biochemical aspects. In: The physiology and biochemistry of drought resistance in plants (PALEG, L. G. & ASPINALL, D. eds.), p.243-258. Academic Press, Sydney, 1981.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Plant Physiology. 1st ed. California, The Benjamin/Cumming Publishing Company, California, 559p. 1991.

TALEISNIK, E. & GRUNBERG, K. Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. *Physiol. Plant.*, 92:528-534, 1994.

TEDESCO, M. J. Matéria orgânica e nitrogênio. In: Curso de atualização em fertilidade do solo. IAPAR, ANDA e PPI. Londrina, p. 87-123, 1983.

TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H. & SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do Caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P. & WATT, E. E. (eds.). O Caupi no Brasil. Brasília:IITA/EMBRAPA, cap. 4, p. 99 -126,1988.

TEÓFILO, E. M.; PAIVA, J. B. & NASCIMENTO, L. C. C. Introdução, caracterização e multiplicação de germoplasma de feijão-de-corda, *Vigna sinensis* (L) Savi. Criação e Difusão de Novos cultivares de germoplasma de feijão-de-corda. Convênio BNB/FCPC/UFC/CCA. Relatório de Pesquisa, 6p. 1986.

TU, J. C. Effect of salinity on Rhizobium-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.*. 61, 231-239, 1981.

VELAGALETI, R. R. & MARSH, S. Influence of host cultivars and *Bradyrhizobium* strains on the growth and symbiotic performance of soybean under salt stress. *Plant and Soil*, 119, 133-138, 1989.

VELAGALETI, R. R.; MARSH, S. & KRAMER, D. Genotypic differences in growth and nitrogen fixation among soybean cultivars grown under salt stress. *Trop. Agric.* 67, 169-177, 1990.

- VICENT, J. M. The Prokaryotes. v. 2, cap. 67, p. 818-830, 1974.
- VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J. R. J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E. & PEDROSO, M. H. T. Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas. Boletim Técnico. Instituto de Pesquisas Agronômicas. Secretaria da Agricultura, nº 11, p. 1-52, 1983.
- VIÉGAS, R. A. Assimilação de nitrogênio e acumulação de solutos em plantas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino. 85p., 1999. (Tese de Doutorado).
- VIÉGAS, R. A.; MELO, A. R. B. & SILVEIRA, J. A. G. S. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew in response to NaCl salt shock. Rev. Bras. Fisiol. Veg., 11(1): 21-28, 1999.
- VOGELS, G. D. & VAN DER DRIFT, C. Diferencial analyses of glyoxilate derivatives. Anal. Biochem., New York, 33:143-157, 1970.
- WAHAB, A. M. A. & ZAHRAN, H. H. Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. Biol. Plants, 23, 16-23, 1981.
- WEIL, R. R. & KHALIL, N. A. Salinity tolerance of winged beans as compared to that of soybean. Agron. J., 78, 67-70, 1986.
- WHITHAM, F. H.; BLAYDES, D. F. & DEVLIN, R. M. Experiments in plant physiology. New York, D. Van Nostrand Company, p. 55-58, 1971.
- WILSON, D. O. & REISENAUER, H. M. Determination of leghemoglobin in legume nodules. Anal. Biochem., 6:27-30, 1963.
- WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. Annals Bot., 82: 703-710. 1998.
- YEO, A. R.; LEE, K. S.; IZARD, P.; BOURSIER, P. J. & FLOWERS, T. J. Short and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). J. Exp. Bot., 42(240):881-889, 1991.

YOUSEF, A. N. & SPRENT, J. I. Effect of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and NH_4NO_3 fertilized *Vicia faba* L. plants. J. Exp. Bot., 143, 941-950, 1983.

ZAHARAN, H. H. & SPRENT, J. I. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta, 167, 303-309, 1986

ZIMMERMANN, U. Physics of turgor and osmoregulation. Annu. Rev. Plant Physiol., 29:121-148, 1978.