EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOJA E CAUPI
INOCULADOS COM AS ESTIRPES SR E SEMIA-587 DE

Bradyrhizobium japonicum

MAELI MELOTTO

Bióloga

Orientador: Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

M528e Melotto, Maeli
Eficiência simbiótica na fixação de nitrogênio em
soja e caupi inoculados com as estirpes SR e
Semia-587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Piracicaba,
1993.
111p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Caupi - Inoculação 3. Nitrogênio em caupi - Fixação 4. Nitrogênio em soja - Fixação 5. Soja - Inoculação I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.34

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOJA E CAUPI
INOCULADOS COM AS ESTIRPES SR E SEMIA-587 DE
Bradyrhizobium japonicum

MAELI MELOTTO

Aprovada em: 19/11/93

Comissão Julgadora:

Dr. Álvaro A. T. Vargas

BIOAGRI-Biotecnologia Agrícola S/C LTDA.

Prof. Dr. Márcio R. Lambais

ESALQ/USP

Profa. Dra. Siu Mui Tsai

CENA/USP

Dr. Álvaro A. T. Vargas

Orientador

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores e funcionários das Seções de Microbiologia do Solo, Fitopatologia e Biologia Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da USP, que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos os colegas de pós-graduação que tornaram estes anos inesquecíveis e compensadores.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO DE LITERATURA.....	 3
2.1. A fixação simbiótica de nitrogênio e a evolução de hidrogênio.....	 3
2.2. Glutamina sintetase - principal via de assimilação de amônio.....	 11
2.3. Ureídeos - biossíntese, transporte e catabolismo..	16
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 24
3.1. Condições experimentais.....	24
3.2. Material vegetal e estirpe de <i>Bradyrhizobium</i>	25
3.3. Delinamento experimental.....	26
3.4. Condução do experimento.....	26
3.5. Coleta e preparo das amostras.....	27
3.6. Análise dos gases por cromatografia.....	28

3.6.1. Determinação da liberação de hidrogênio.....	28
3.6.2. Determinação da atividade da nitrogenase...	29
3.7. Obtenção dos extratos de nódulos.....	30
3.7.1. Determinação da atividade da glutamina sintetase.....	31
3.7.2. Determinação da concentração de proteínas..	32
3.8. Determinação da atividade da alantoinase em discos foliares.....	33
3.9. Determinação do teor de nitrogênio.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Atividade de redução do acetileno x liberação de hidrogênio x eficiência relativa (ER).....	35
4.2. Eficiência nodular.....	47
4.3. Desenvolvimento de nódulos.....	51
4.4. Concentração de proteínas solúveis em nódulos.....	57
4.5. Acúmulo de fitomassa.....	61
4.6. Porcentagem e conteúdo de nitrogênio na parte aérea.....	65
4.7. Atividade de glutamina sintetase e sua relação com a atividade da nitrogenase.....	70
4.8. Atividade de alantoinase.....	78

5. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÊNDICES.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribuição da atividade de redução de acetileno específica em <i>Vigna unguiculata</i>	39
2. Distribuição da atividade de redução de acetileno em <i>Vigna unguiculata</i>	40
3. Liberação de hidrogênio em <i>Vigna unguiculata</i> , ao longo do tempo.....	41
4. Eficiência relativa (ER) da nitrogenase em <i>Vigna unguiculata</i> , ao longo do tempo.....	42
5. Distribuição da atividade de redução de acetileno específica em <i>Glycine max</i>	43
6. Distribuição da atividade de redução de acetileno em <i>Glycine max</i>	44

7. Eficiência relativa (ER) da nitrogenase em <i>Glycine max</i> , ao longo do tempo.....	45
8. Liberação de hidrogênio em <i>Glycine max</i> , ao longo do tempo.....	46
9. Eficiência nodular em plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , ao longo do tempo.....	49
10. Eficiência nodular em plantas de <i>Glycine max</i> , ao longo do tempo.....	50
11. Variação sazonal no número de nódulos em <i>Vigna</i> <i>unguiculata</i>	53
12. Variação sazonal do peso de matéria fresca de nódulos em <i>Vigna unguiculata</i>	54
13. Variação sazonal no número de nódulos em <i>Glycine max</i> ..	55
14. Variação sazonal do peso de matéria fresca de nódulos em <i>Glycine max</i>	56

15. Variação sazonal da concentração de proteínas solúveis em nódulos de <i>Vigna unguiculata</i>	59
16. Variação sazonal da concentração de proteínas solúveis em nódulos de <i>Glycine max</i>	60
17. Acúmulo de fitomassa da parte aérea de <i>Vigna unguiculata</i>	63
18. Acúmulo de fitomassa da parte aérea de <i>Glycine max</i>	64
19. Variação sazonal da porcentagem de nitrogênio na parte aérea de <i>Vigna unguiculata</i>	66
20. Variação sazonal do conteúdo de nitrogênio total na parte aérea de <i>Vigna unguiculata</i>	67
21. Variação sazonal da porcentagem de nitrogênio na parte aérea de <i>Glycine max</i>	68
22. Variação sazonal do conteúdo de nitrogênio total na parte aérea de <i>Glycine max</i>	69

23. Distribuição da atividade da glutamina sintetase em <i>Vigna unguiculata</i>	74
24. Distribuição da atividade específica da glutamina sintetase em <i>Vigna unguiculata</i>	75
25. Distribuição da atividade da glutamina sintetase em <i>Glycine max</i>	76
26. Distribuição da atividade específica da glutamina sintetase em <i>Glycine max</i>	77
27. Distribuição da atividade da alantoinase em folhas em <i>Vigna unguiculata</i>	80
28. Distribuição da atividade da alantoinase em folhas em <i>Glycine max</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Reações de síntese de ureídeos.....	18
2. Coeficientes de correlação entre GS e ARA observados em diferentes simbioses.....	72
3. Equações de regressão e seus coeficientes de correlação entre a atividade específica da nitrogenase e a atividade específica da glutamina sintetase, obtidos a partir de 4 repetições.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
FBN	fixação biológica de nitrogênio
MgATP	magnésio-adenosina trifosfato
Hup	hydrogen uptake
Hup ⁺	hydrogen uptake positive
ATP	adenosina trifosfato
Hup-hr	hydrogen uptake host-regulated
Hup ⁻	hydrogen uptake negative
GS	glutamina sintetase
GOGAT	glutamina 2-oxoglutarato amino transferase
GDH	glutamato desidrogenase
K _M	constante de Michaelis-Mentem
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
IMP	inosina monofosfato
DAE	dias após a emergência
ER	eficiência relativa
PMS	peso da matéria seca
PMF	peso da matéria fresca
ARA	atividade de redução de acetileno
PEP	fosfoenolpiruvato

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOJA E CAUPI
INOCULADOS COM AS ESTIRPES SR E SEMIA-587 DE
Bradyrhizobium japonicum

Autor: Maeli Melotto

Orientador: Álvaro Augusto Teixeira Vargas

RESUMO

As possíveis relações entre características fisiológicas e as enzimas glutamina sintetase e alantoinase com a fixação biológica de nitrogênio e expressão Hup (hydrogen uptake) foram estudadas neste trabalho. Plantas de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e soja (*Glycine max* L. Merril) inoculadas com as estirpes SR (Hup⁺) e SEMIA-587 (Hup-hr) de *Bradyrhizobium japonicum* foram cultivadas em solução nutritiva livre de nitrogênio combinado, em casa-de-vegetação.

Caupi inoculado com a estirpe SR, apresentou menor liberação de hidrogênio, peso de matéria fresca de nódulos, atividade de redução de acetileno e alantoinase nas folhas do que quando

inoculado com SEMIA-587. Nos outros parâmetros estudados as estirpes se comportaram de maneira semelhante.

Soja inoculada com a estirpe SR apresentou maiores valores de acúmulo de fitomassa e nitrogênio na parte aérea, eficiência nodular, atividade específica de redução de acetileno e menor peso de matéria fresca de nódulos em relação à soja inoculada com a estirpe SEMIA-587.

Em todas as simbioses estudadas a eficiência relativa da nitrogenase esteve ao redor de 0,97, indicando que as diferenças observadas não são consequência direta dos benefícios da hidrogenase. No entanto, é possível que o fenótipo Hup^+ esteja associado geneticamente a características fisiológicas que contribuem para a maior eficiência simbiótica.

Foi observado que a atividade de glutamina sintetase tem pouca relação com a atividade específica da nitrogenase, indicando a pequena integração destes processos nas simbioses em questão.

SYMBIOTIC EFFICIENCY ON NITROGEN FIXATION IN SOYBEAN AND COWPEA
INOCULATED WITH THE STRAINS SR AND SEMIA-587 OF

Bradyrhizobium japonicum

Author: Maeli Melotto

Adviser: Álvaro Augusto Teixeira Vargas

SUMMARY

Possible relationships between the physiological characteristics and the enzymes glutamine synthetase and allantoinase with biological nitrogen fixation and Hup (hydrogen uptake) expression were studied. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants inoculated with the strains SR (Hup⁺) and SEMIA-587 (Hup-hr) of *Bradyrhizobium japonicum* were grown in nitrogen free nutrient solution, under greenhouse conditions.

The symbioses cowpea x SEMIA-578 showed higher nitrogenase and allantoinase activities, hydrogen evolution and nodule weigh than cowpea x SEMIA-587. The other parameters studied, showed no statistical differences.

Soybean inoculated with strain SR showed higher plant dry weigh, nitrogen content, nodule efficiency, and specific nitrogenase activity than soybean inoculated with strain SEMIA-587. Also, soybean x SR showed lower nodule weigh than soybean x SENIA-587.

In the symbioses studied, the relative efficiency of nitrogenase was about 0.97, indicating that differences observed can not be atributed only to differences in hydrogenase activity. However, it is possible that the phenotype Hup⁺ was associated genetically with physiological characteristics which contributed to increasing the symbiotic efficiency.

It was observed that glutamine synthetase activity has little relationship with specific nitrogenase activity, indicating a lack of interaction between these processes in the symbioses studied.

1. INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) é uma cultura muito importante às regiões norte e nordeste do Brasil, por ser a principal fonte de proteína daquela população. Mostrando uma boa adaptação às condições de altas temperaturas e estresse hídrico, o caupi vem sendo um substituto para o feijão tradicional, que normalmente não se desenvolve bem naquelas regiões, devido as condições adversas de solo e clima.

Por outro lado, a soja (*Glycine max* L. Merrill) destaca-se como uma cultura de importância econômica devido ao grande volume de exportação.

Estas leguminosas, associadas à bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, são capazes de reduzir o nitrogênio que é extremamente abundante na atmosfera (cerca de 78%) a amônio. Esta característica permite uma diminuição do custo da produção e uma economia de combustíveis fósseis utilizados para a produção de fertilizantes nitrogenados.

Os estudos da fisiologia dessas interações simbióticas são necessários a fim de maximizar a produção de sementes. Além do

que, o entendimento bioquímico destes processos é indispensável a qualquer programa de melhoramento genético.

Durante a fixação biológica do nitrogênio (FBN), através da enzima nitrogenase, ocorre obrigatoriamente a redução de prótons e consequente perda de energia. Contudo, a liberação do hidrogênio produzido pode ser evitada através de sua oxidação pela enzima hidrogenase.

Têm sido postulado que a atividade da hidrogenase é benéfica à FBN. No entanto, a atividade da hidrogenase é responsável pela recuperação de uma pequena parte (10,7%, aproximadamente) da energia gasta na redução de prótons. Então, outras características importantes à eficiência simbiótica, devem estar ligadas ao fenótipo Hup^+ (Hydrogen uptake - positive).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo conhecer as atividades da enzima glutamina sintetase (GS), principal responsável pela assimilação do nitrogênio fixado, a distribuição do nitrogênio transportado à parte aérea através da enzima allantoinase e as características fisiológicas ligadas à eficiência simbiótica na presença da enzima hidrogenase.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A fixação simbiótica de nitrogênio e a liberação de hidrogênio.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) se faz principalmente através da enzima nitrogenase (EC 1.7.99.2) localizada no bacteróide em nódulos formados nas raízes de leguminosas. O complexo nitrogenase é formado por dois componentes proteicos, a MoFe-proteína e a Fe-proteína. Informações detalhadas podem ser encontradas em revisões feitas por EISBRENNER & EVANS (1983) e SPRENT & SPRENT (1990).

A transferência de elétrons através do sistema da nitrogenase começa com as moléculas de ferredoxina e flavodoxina, que têm sido consideradas como efetivas doadoras de elétrons para o componente Fe-proteína. Esta se liga ao MgATP, resultando em uma mudança conformacional e um abaixamento do potencial redox que são suficientes para reduzir a MoFe-proteína da nitrogenase. Elétrons são

transferidos da MoFe-proteína reduzida para substratos como nitrogênio e prótons que são reduzidos a amônia e hidrogênio molecular, respectivamente (SPRENT & SPRENT, 1990).

O sítio catalítico para as reduções de nitrogênio e prótons não é o mesmo, uma vez que o aumento na pressão parcial de nitrogênio não diminui a liberação de hidrogênio e o monóxido de carbono inibe a fixação de nitrogênio mas não a redução de prótons (EISBRENNER & EVANS, 1983).

O potencial de fixação de nitrogênio atmosférico em sistemas simbióticos é diminuído pelo desvio de elétrons do nitrogênio para prótons, ocasionando liberação de hidrogênio molecular no ambiente (RASCHE & ARP, 1989). Por este desvio de elétrons, que seriam destinados à redução do nitrogênio, estima-se uma perda de 25% da capacidade de fixação do nitrogênio (NEVES & RUMJANECK, 1992).

Em uma série de experimentos realizados por diversos autores tem sido observado que vários fatores influenciam a liberação de hidrogênio durante a FBN. Entre eles podemos citar: a planta hospedeira, e por consequência qualquer fator ambiental que interfira no seu desenvolvimento (GARG *et alii*, 1985), e a própria estirpe em questão (LA FAVRE & FOCHT, 1983). Este ponto será retomado nesta revisão.

O hidrogênio liberado pode ser reciclado por um sistema enzimático, ligado à membrana de bactérias aeróbicas, denominado hidrogenase (HYMAN & ARP, 1987). Este sistema foi descoberto primeiramente em *Azotobacter vinelandii* por LEE & WILSON (1943).

A atividade da hidrogenase varia de acordo com o estágio fisiológico da planta (KALIA *et alii*, 1985). Por um lado, essa atividade pode reciclar todo o hidrogênio, e, por outro, ter uma atividade insuficiente quando a fixação de nitrogênio é intensa, por exemplo. Por possuir a hidrogenase ativa, algumas estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são chamadas Hup⁺ (hydrogen uptake - positive) (KEYSER *et alii*, 1982).

A oxidação do hidrogênio pela hidrogenase não é direta. Ocorre uma transferência de elétrons do hidrogênio ao oxigênio, passando por parte da cadeia respiratória. Provavelmente pelas moléculas ubiquinona, citocromos *b* e *c* (EISBRENNER & EVANS, 1983).

Para cada molécula de nitrogênio reduzida há a produção de uma molécula de hidrogênio. Somando-se as duas reações de redução têm-se um custo teórico de 28 moléculas de ATP, se cada par de elétrons gerar 3 moléculas de ATP na cadeia respiratória (NEVES & RUMJANECK, 1992). Abaixo temos as reações simultaneamente catalizadas pela nitrogenase.

Se para cada hidrogênio oxidado pela hidrogenase há a formação de 2 a 3 ATPs (MICHIN *et alii*, 1981), e para sua produção são usados o equivalente a 7 moléculas de ATP, ocorre aqui a recuperação

de no máximo 10,7% das moléculas (SPRENT, 1984). Neste sentido, os benefícios da atividade da hidrogenase são muito pequenos. Deve haver então, outras funções para a atividade Hup, que não somente a recuperação da energia desperdiçada pela nitrogenase.

Se o hidrogênio for reciclado eficientemente, os microrganismos que expressam atividade da hidrogenase (Hup⁺) têm algumas vantagens:

1) em nódulos de leguminosas, o oxigênio além de ser um substrato respiratório, é também importante na síntese de ureídeos. Portanto, o fluxo de oxigênio para a fosforilação oxidativa que é necessária à FBN, nas células infectadas deve ser muito alto (GIBSON, 1990; LAYZELL *et alii*, 1990). Este fluxo é proporcionado pela molécula de leghemoglobina (BERGERSEN, 1980). Ao mesmo tempo, a concentração de oxigênio deve ser mantida em baixos níveis pois provoca danos irreversíveis a nitrogenase (LA FAVRE & FOCHT, 1985). Neste caso, a enzima hidrogenase contribui para manter um baixo nível de oxigênio ligando-o à molécula de hidrogênio.

2) proteção da nitrogenase contra o próprio hidrogênio que também inibe a sua atividade (EISBRENNER & EVANS, 1983). O hidrogênio por ser um inibidor da FBN, pode ser um fator significativo na diminuição da eficiência simbiótica em nódulos de leguminosas (RASCHÉ & ARP, 1989).

3) produção de ATP e poder redutor vindos da oxidação do hidrogênio, recuperando parte da energia gasta na redução de prótons (BERGERSEN, 1991).

A energia para a nitrogenase pode vir da atividade da hidrogenase e do catabolismo de carboidratos por caminhos distintos. Portanto, a produção de ATP pela hidrogenase parece ser muito mais importante, principalmente em baixos níveis de irradiância, ou em qualquer condição de limitação de substratos de carbono ou outra fonte de energia (ADAMS *et alii*, 1981). Uma possível diminuição da evolução do hidrogênio sob estas condições poderia ocorrer devido a uma alocação mais eficiente de elétrons para a nitrogenase ou devido a maior atividade da hidrogenase (BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1977). A conservação de energia através da reciclagem de hidrogênio pode diminuir a demanda para fotossintatos e, conseqüentemente, contribuir para o aumento na produção de matéria seca, assunto a ser tratado ainda nesta revisão.

Alguns estudos têm demonstrado que a evolução de CO_2 é reduzida em estirpes Hup^+ (HUNGRIA & RUSCHEL, 1989). Estes resultados sugerem que o hidrogênio pode ser usado como fonte de energia, economizando substratos de carbono durante a FBN (DREVON *et alii*, 1982; BREWIN, 1984), se a pressão parcial de oxigênio for adequada (DAKORA & ATKINS, 1990)

Tentando elucidar a influência de substratos de carbono sobre a atividade da hidrogenase, GRAHAM *et alii* (1984) conduziram um experimento com a estirpe SR de *Bradyrhizobium japonicum* que possui a hidrogenase ativa, crescidas quimioautotroficamente. Foi encontrado que há uma repressão da atividade da hidrogenase na presença de carboidratos. Esta repressão pode ser explicada pelo fato de que o

catabolismo de carboidratos aumenta o consumo de oxigênio e este por sua vez, é necessário para induzir a atividade da hidrogenase (VAN BERKUM, 1987). Diferentes substratos de carbono afetam de maneiras diferentes a atividade da hidrogenase (VAN BERKUM & MAIER, 1988).

Na prática, e em termos de produção, são duvidosos os reais benefícios que o sistema enzimático da hidrogenase proporciona aos sistemas simbióticos e têm-se encontrado resultados contraditórios.

THIMMAIAH & LODHA (1986) estudando plantas de *Vigna radiata* (L.) inoculadas com *Bradyrhizobium* que possuem hidrogenase ativa apresentaram maior número de nódulos, maior peso de matéria seca e maior razão de fixação de nitrogênio comparadas com estirpes Hup⁻. CHAKHAL & BRAR (1987) encontraram os mesmos resultados, não observando, porém, diferença alguma quanto à assimilação de amônio no citossol dos nódulos. SAINI *et alii* (1987), trabalhando com sesbânia, também observaram um aumento no conteúdo de nitrogênio e na matéria seca. Da mesma forma HUNGRIA *et alii* (1989) encontraram maiores concentrações de ureídeos na seiva do xilema, maiores conteúdo de nitrogênio nas vagens e índice de colheita em soja inoculada com estirpes mutantes Hup⁺.

Em estudos com *Cajanus cajan* (LA FAVRE & FOCHT, 1985), *Pisum sativum* e *Vicia benghalensis* (CUNNINGHAM *et alii*, 1985) em simbiose com estirpes Hup⁺ e Hup⁻ não foram encontradas diferenças no acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

DREVON *et alii* (1987) têm sugerido que o efeito

negativo da atividade da hidrogenase sobre a fixação de nitrogênio pode ser devido à falta de oxigênio, que é necessário à respiração, e, por consequência, à falta de ATP.

Em meio aeróbico pouco ou nenhum hidrogênio é evoluído, provavelmente por sua rápida oxidação (TRUELSEN & WYNDAELE, 1984) ou pelo aumento na razão respiratória resultando em um intenso *turnover* da MoFe-proteína (EISBRENNER & EVANS, 1983), decrescendo a alocação de elétrons para prótons (GODFROY & DREVON, 1991).

Para se calcular a eficiência com que a nitrogenase está utilizando a energia disponível para reduzir o nitrogênio, foi criado o termo "eficiência relativa" (SCHUBERT & EVANS, 1976). Esta pode ser calculada experimentalmente como:

$$ER = 1 - \frac{\text{hidrogênio liberado (ar)}}{\text{acetileno reduzido (etileno)}}$$

Se uma grande porcentagem de elétrons é translocada para a redução de prótons, a reação pode ser caracterizada como ineficiente. No entanto, se a estirpe for Hup^+ , pode oxidar todo o hidrogênio produzido, tendo assim alta eficiência relativa. Estirpes Hup^+ podem reduzir a perda do fluxo de elétrons da nitrogenase como hidrogênio de 30 para 4% (MELLOR & VERNER, 1990).

Reciclar o gás hidrogênio pode não recuperar toda a energia que inicialmente a nitrogenase utilizou para produzir o

hidrogênio. Seria mais vantajoso um fluxo de elétrons direto à fixação de nitrogênio em primeiro lugar. Este ponto pode ser responsável pelo igual desempenho de estirpes Hup^+ e Hup^- quanto à fixação de nitrogênio (HUNGRIA & NEVES, 1986).

Contudo, pode-se interpretar que provavelmente há a interferência de outras características que afetam a fixação biológica de nitrogênio (LAYZELL *et alii*, 1990) e esta pode diferir significativamente dependendo da estirpe nodulante (DREVON *et alii*, 1987).

Existe um efeito do genótipo da planta hospedeira sobre a atividade Hup, que tem sido identificado em experimentos feitos com diferentes espécies de leguminosas inoculadas com a mesma estirpe de rizóbio (PHILLIPS *et alii*, 1990). Por uma razão qualquer não conhecida, o fenótipo Hup^+ é reprimido de acordo com o hospedeiro (MURILLO *et alii*, 1989). Sendo assim, um terceiro fenótipo em termos de expressão da atividade da hidrogenase tem sido estabelecido: Hup-hr - hydrogen uptake host-regulated - (VAN BERKUM, 1990).

2.2. Glutamina sintetase - principal via de assimilação de amônia.

O primeiro produto da reação da nitrogenase é a amônia. Esta é imediatamente protonada a íon amônio, e, uma vez excretado pelo bacteróide, é assimilado diretamente em compostos orgânicos no citossol das células hospedeiras (SCHUBERT, 1986; NEVES & HUNGRIA, 1987; ALCANTAR-GONZALES *et alii*, 1990).

Na planta, a amônia também é formada, resultante de outros processos tais como, redução assimilatória do nitrato e nitrito, descarboxilação de glicina durante a fotorrespiração, metabolismo de amidas e ureídeos, proteólise durante a senescência e catabolismo de aminoácidos (KUMAR & ABROL, 1990).

A assimilação da amônia deve ocorrer rapidamente em sistemas simbióticos por três principais motivos: possui efeitos tóxicos provocados por despolarização das membranas (MENGEL & KIRKBY, 1987); reprime a síntese de nitrogenase (SPRENT, 1984) e inibe a respiração dos nódulos (MIFLIN & LEA, 1976). Sendo assim, as reações de assimilação de amônia são importantes não somente porque contribuem nos passos iniciais para a biossíntese de todos aminoácidos e proteínas, mas também por possibilitarem a desintoxicação dos tecidos.

A amônia proveniente das fontes acima citadas é assimilada predominantemente através do ciclo glutamato sintase (KUMAR & ABROL, 1990). Este envolve a incorporação do íon amônio à molécula

de glutamato pela enzima glutamina sintetase (GS - EC 6.3.1.2.), produzindo glutamina. Em um segundo passo, ocorre a transferência do grupo amina da glutamina para 2-oxoglutarato pela glutamato sintase (GOGAT - glutamina 2-oxoglutarato amino transferase - EC 1.4.1.14) produzindo 2 moléculas de glutamato (KUMAR & ABROL, 1990). Uma molécula pode ser reutilizada na síntese de glutamina e a outra na síntese de outros aminoácidos (LEON *et alii*, 1990).

Outras vias enzimáticas têm sido sugeridas, como por exemplo a aaminação do 2-oxoglutarato pela glutamato desidrogenase (GDH - EC 1.4.1.3.) formando glutamato. Mas, várias evidências sugerem a atuação do ciclo da glutamato sintase como principal via de assimilação de amônio, que serão discutidas abaixo.

O K_M da GDH para o NH_4^+ é muito alto, indicando sua baixa afinidade pelo substrato (4 mM). Em contraste com a enzima GS que tem grande afinidade para o íon amônio, em torno de 200 μM (MIFLIN & LEA, 1976; RAWSTHORNE *et alii*, 1980; OAKS & HIREL, 1985). MEEKS *et alii* (1978) desenvolvendo um experimento com ^{13}N em nódulos de soja observaram que a amônia formada pela FBN era primeiramente incorporada na molécula de glutamina, seguindo a formação de glutamato e alanina.

RODHES *et alii* (1980), em experimento com ^{15}N , provaram a predominância do ciclo da glutamato sintase. Análises cinéticas da assimilação da ^{15}N -amônia revelaram que a razão de assimilação via GDH era não mais que 10% do total da assimilação.

Estudos com inibidores da glutamina sintetase, metionina sulfoxiamina (LARA *et alii*, 1983; MARTIN *et alii*, 1983) e da

glutamato sintase, azaserina um inibidor de reações de transferência de grupos amina, combinado com análise de compostos marcados, têm demonstrado que não ocorre assimilação de amônio em glutamato, mesmo quando este se encontra em altos níveis, o que favoreceria a ação de glutamato desidrogenase (JOY, 1988).

Mutantes de trigo, com falha na atividade da GS, praticamente não assimilam amônia. Quando a falha está na GOGAT, nenhuma glutamina é utilizada, ocorrendo um acúmulo de glutamina marcada (JOY *et alii*, 1992).

Estudos de localização de enzimas, usando técnicas de isolamento de organelas, demonstraram que GOGAT está presente somente no cloroplasto (LEA & MIFLIN, 1974), GS no cloroplasto (O'NEAL & JOY, 1973) e no citossol (MIFLIN, 1974) e GDH na mitocôndria (STEWART, 1980).

Não há evidência de assimilação da amônia, formação de glutamato ou outros aminoácidos por mitocôndrias incubadas em condições fisiológicas. Somente mitocôndrias isoladas sintetizam glutamato a partir de N_2 (DAVIES & TEIXEIRA, 1975), e em contraste, ocorre síntese de glutamina (MITCHELL & STOCKING, 1975) e glutamato (LEA & MIFLIN, 1974) no cloroplasto.

Em condições de limitação de carbono, a atividade da GDH aumenta radicalmente, em torno de 10 vezes. Tem sido sugerido que a função primária da GDH seja então, a oxidação do glutamato para fornecer suficiente esqueletos de carbono para efetivo funcionamento do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esta é considerada uma função

regulatória no metabolismo do carbono e do nitrogênio (ROBINSON *et alii*, 1991).

GDH pode ser útil na assimilação de amônio em condições de altas concentrações provocadas por uma grande absorção ou por elevado catabolismo de aminoácidos (LEON *et alii*, 1990). A presença de amônio provoca um intenso consumo de α -cetoácidos do ciclo de Krebs, indicando um aumento da atividade respiratória.

Múltiplas isoformas de GS têm sido identificadas em inúmeras plantas superiores (COCK *et alii*, 1991). Essa descoberta tem importante função no metabolismo de N em plantas, conduzindo à uma interessante área da pesquisa no estudo da assimilação de amônia em plantas superiores.

Em folhas existem duas diferentes enzimas, chamadas GS₁ e GS₂. A GS₁ é restrita ao citossol e a GS₂ ao cloroplasto (HIREL *et alii*, 1984). Nas raízes há somente uma isoforma GS_r similar à GS₁. As 3 isoformas apresentam propriedades cromatográficas específicas (CABELLO *et alii*, 1991). Tem sido sugerido que GS₁ (citossólica) possui a função de assimilação da amônia no citossol em condições de escuro (MCNALLY *et alii*, 1983). Recentes trabalhos demonstraram claramente que a amônia produzida durante a fotorrespiração pode ser reassimilada no cloroplasto (WALLSGROVE *et alii*, 1987).

Em nódulos de *Phaseolus acutifolius* Gray foram encontradas 17 isoenzimas da GS (GREEN & WONG, 1992) que são divididas em duas classes, baseadas nas subunidades polipeptídicas: GS_{n1}, especificamente associada a função do nódulo, e GS_{n2}, que é similar a

GS_r (LARA *et alii*, 1984).

Glutamina está envolvida na biossíntese de asparagina e ureídeos, a ser discutido posteriormente, além de muitas outras reações no metabolismo celular (OAKS & HIREL, 1985). O maior controle da atividade da GS é a nitrogenase, por competição pelo ATP disponível (RAWSTHORNE *et alii*, 1980), cujas fontes diretas são as reações da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

Os mecanismos de assimilação de amônia em nódulos têm sido amplamente especulados, entretanto as exatas relações existentes entre a atividade da nitrogenase, produção e as vias metabólicas de assimilação de amônio e o transporte dos compostos nitrogenados ainda não são bem conhecida.

2.3. Ureídeos - biossíntese, transporte e catabolismo.

Glutamina e glutamato são os primeiros produtos aminados formados nos nódulos (NEVES & HUNGRIA, 1987). Além destes, há outros que são também transportados e podem ser classificados como amidas e ureídeos. As amidas são asparagina, glutamina e 4-metilenoglutamina, e os ureídeos são alantoína, ácido alantóico e citrulina (SCHUBERT, 1986). A assimilação de amônia é feita da mesma maneira em plantas que transportam ureídeos ou amidas.

Em leguminosas tropicais, principalmente da tribo Phaseoleae (SPRENT, 1980), como caupi, feijão e soja, 60 a 90% do nitrogênio transportado na seiva do xilema está na forma de ureídeos (RAINBIRD *et alii*, 1984), e nas leguminosas de clima temperado, tais como ervilha, *Lupinus*, *Ornithopus*, a maior parte está na forma amídica (BODDEY *et alii*, 1987).

Os ureídeos são produzidos no caminho que envolve síntese *de novo* de purinas, seguido por oxidação do anel purínico (BOLAND *et alii*, 1982).

Purinas são sintetizadas a partir de vários precursores: glutamina, glicina, aspartato, fosforribosilpirofosfato e CO_2 (SPRENT, 1984). Glutamina contribui doando nitrogênio (JOY, 1988) à inosina 5-monofosfato (IMP), produto final da síntese de purinas. Iniciando-se seu catabolismo forma-se xantina, ácido úrico, resultando nos ureídeos alantoína e ácido alantóico (SPRENT & SPRENT, 1990).

A síntese de ureídeos envolve muito mais reações que a síntese de amidas. O custo e a energia necessária para a produção e a manutenção destas enzimas não é conhecido (SPRENT, 1984). SCHUBERT (1986) tem estimado um lucro de 8 moléculas de ATP, considerando que 7 moléculas de ATP são consumidas na síntese de purinas e produção de 5 moléculas de NAD(P)H no seu catabolismo, que, se consumidos, produzem 3 moléculas de ATP por molécula de NAD(P)H. O custo da síntese de ureídeos, em equivalente ATP, é menor que 50% em relação às amidas (WINKLER *et alii*, 1988).

Várias observações suportam a idéia de que os ureídeos são formados pelo catabolismo oxidativo das purinas. Antes de citá-las, serão apresentadas aqui a sequência de reações propostas por SPRENT (1984) para a síntese de ureídeos, para melhor compreensão dos itens logo após relacionados.

Tabela 1. Reações de síntese de ureídeos.

REAÇÃO	ENZIMA	LOCALIZAÇÃO
N_2 $\downarrow$ NH_4 $\downarrow \leftarrow \text{glutamato}$ ATP	nitrogenase	bacteróide
glutamina		
$\downarrow$ Síntese de purinas. Precusores: glutamina glicina, aspartato, fosfo- ribosilpirofosfato e CO_2 .	estas enzimas são encontradas no texto de SCHUBERT (1986)	plastídeos
$\downarrow$ inosina monofosfato $\downarrow \rightarrow \text{ribose, Pi}$	IMP desidrogenase	citossol
xantina $NADH \leftarrow \downarrow \leftarrow NAD^+$	xantina desidrogenase	citossol
ácido úrico $CO_2 \leftarrow \downarrow \leftarrow O_2$	uricase	peroxissomos
alantoína $\downarrow \leftarrow H_2O$	alantoinase	retículo endoplasmático
ácido alantóico		

1) enzimas que degradam purinas estão presentes em nódulos de caupi, soja e feijão - IMP desidrogenase, xantina desidrogenase, uricase e alantoinase - (ATKINS *et alii*, 1982) e suas atividades aumentam drasticamente quando começa a fixação de nitrogênio e a produção de ureídeos (BOLAND *et alii*, 1982).

2) os níveis destas enzimas são normalmente baixos em nódulos que exportam amidas (ATKINS *et alii*, 1991).

3) o nível destas enzimas aumentam em resposta à fixação de nitrogênio, atividade assimilatória de amônia e ureídeos exportados dos nódulos (LEE *et alii*, 1993).

4) a adição de alopurinol, inibidor da xantina desidrogenase, resulta em decréscimo do nível de ureídeos em nódulo e exportados no xilema e um acréscimo de xantina no nódulo (ATKINS *et alii*, 1988a; ATKINS *et alii*, 1988b; ATKINS *et alii*, 1992).

5) quando a síntese *de novo* do anel purínico está ocorrendo, $^{14}\text{CO}_2$ é incorporado na posição 6. Bloqueando-se a oxidação do anel purínico com alopurinol, xantina marcada especificamente na posição 6, acumula-se enquanto que o nível de IMP marcado é muito baixo. Isto confirma que purinas sintetizadas *de novo* são rapidamente oxidadas em nódulos, como parte da biogênese de ureídeos (SCHUBERT, 1986).

As propriedades e regulação das enzimas envolvidas na síntese de ureídeos podem ser encontradas em revisões feitas por THOMAS & SCHRADER (1981) e RAO *et alii* (1988).

Um atraso na biossíntese de ureídeos em nódulos de legumes tropicais resulta em sintomas de deficiência de nitrogênio na planta (LEE *et alii*, 1993).

A maior porcentagem de nitrogênio transportado sob a forma de ureídeos poderia ser uma vantagem para o sistema simbiótico, visto que na síntese destes compostos há economia de carbono e ATP (SCHUBERT, 1986). Têm-se observado que melhores combinações simbióticas apresentam maior taxa de translocação de ureídeos na seiva do xilema (HUNGRIA *et alii*, 1985) e maiores índices de colheita (NEVES *et alii*, 1985).

A concentração de ureídeos na seiva do xilema é maior quando o nitrogênio é proveniente da FBN, comparando-se às outras fontes, como por exemplo o nitrato (DAKORA *et alii*, 1992), decrescendo de 88 a 9% em soja (PEOPLES *et alii*, 1991). O mesmo não é válido para sua concentração nos tecidos que está relacionado com o conteúdo de nitrogênio (YONEYAMA *et alii*, 1985).

A abundância de ureídeos na seiva do xilema têm sido usada como índice de eficiência da fixação de nitrogênio (HERRIDGE & BETTS, 1988; DAKORA *et alii*, 1992), em casa-de-vegetação e também em condições de campo (HERRIDGE *et alii*, 1990). Altas correlações ($r = 0,97-1,00$) foram encontradas entre N-ureídeos na seiva e nitrogênio na planta derivado da FBN, estimado pelo método de diluição isotópica de

¹⁵N (HERRIDGE & PEOPLES, 1990).

A razão carbono/nitrogênio dos compostos nitrogenados exportados do nódulo variam, sendo que em ácido glutâmico é 5:1, asparagina 2:1, glutamina 5:2, alantoína e ácido alantóico 1:1, e citrulina 2:1. Esta pequena razão para os ureídeos implica em uma economia no suprimento de carbono pela planta hospedeira (SCHUBERT, 1986). A quantidade de carbono por unidade de nitrogênio fixado é muito maior em *Lupinus*, um exportador de amidas, do que em caupi, um exportador de ureídeos. No entanto, como muitos processos fisiológicos estão relacionados, não está claro se esta diferença se deve somente à produção de ureídeos (NEVES & HUNGRIA, 1987).

Têm sido observado que sob limitações de carbono ocorre maior transporte de ureídeos e, em extrema situação, eles representam um mecanismo para desintoxicação de amônia (NEVES & HUNGRIA, 1987) e conservação de carbono (THOMAS & SCHRADER, 1981).

Os fotossintatos transportados via floema para os nódulos são usados para produção de energia e esqueletos de carbono que suportam (SCHUBERT, 1986): a) crescimento e manutenção dos tecidos nodulares; b) o consumo de energia das reações associadas à redução de nitrogênio no microssimbionte e à assimilação de amônia liberada no citossol da célula hospedeira e; c) síntese de N-compostos orgânicos que são exportados dos nódulos.

Os N-compostos que são exportados para a parte aérea via xilema, contribui para o *pool* de nitrogênio solúvel da planta (PEOPLES *et alii*, 1985). Quando necessários, são degradados, liberando

amônia e outros produtos. Estes são subsequentemente reassimilados, produzindo aminoácidos importantes à síntese de outros metabólitos (SHELP & IRELAND, 1985).

Alantoinase (EC 3.5.2.5), a enzima responsável pelo primeiro passo do catabolismo dos ureídeos, transformando alantoína em ácido alantóico (WINKLER *et alii*, 1988), é encontrada em nódulos, folhas e frutos em desenvolvimento (MONTALBINI, 1992). A atividade desta enzima varia com o estágio de desenvolvimento da planta (GOMES & SODEK, 1984). Sua atividade nas folhas aumenta com a FBN e transporte de ureídeos na seiva (THAYUMANAVAN & SADASIVAM, 1989).

Têm sido feita algumas tentativas para elucidar a nutrição de nitrogênio dos frutos. Este ponto permanece obscuro devido à complexidade metabólica, caracterizada pelo *turnover* de solutos e sua dinâmica entre e dentro dos complexos tecidos e compartimentos intracelulares das vagens e sementes. São necessários mais estudos rigidamente controlados com compostos marcados (PEOPLES *et alii*, 1985).

Ureídeos não são usados diretamente no desenvolvimento dos embriões pois estes não possuem as enzimas para sua degradação (SCHUBERT, 1986). Antes, são metabolizados na casca da semente ou paredes das vagens, produzindo amidas, glutamina e asparagina, que então suprem as necessidades de nitrogênio do embrião. Na cascas das sementes são encontradas maiores porcentagens de nitrogênio na forma de ureídeos e alta atividade da alantoinase (RAINBIRD *et alii*, 1984). Estes sítios metabólicos podem ter um crítico controle sobre o

metabolismo de ureídeos (WINKLER *et alii*, 1988).

Os produtos finais da degradação de ureídeos são uma molécula de glioxilato, quatro moléculas de amônio e duas moléculas de CO_2 . Sendo que o glioxilato é metabolizado pelo caminho fotorrespiratório, produzindo glicina e serina (WINKLER *et alii*, 1987). Os intermediários desta reação não estão bem definidos ainda. Em estudos com inibidores e compostos marcados, têm-se tentado definir a exata rota metabólica (SHELP & IRELAND, 1985; WINKLER *et alii*, 1987), no entanto devem haver vários caminhos que levam ao produto final (WINKLER *et alii*, 1988).

O fornecimento de fotossintatos para os nódulos, frequentemente, limita a fixação biológica de nitrogênio. Em períodos de maior fixação, os nódulos podem desviar até 30% dos fotossintatos da planta, reduzindo diretamente a produtividade das leguminosas (HUNGRIA & NEVES, 1986), mesmo considerando que a atividade da nitrogenase pode ser aumentada pela demanda de nitrogênio da parte aérea (HEIM, 1993). Desse modo, deve-se selecionar os sistemas simbióticos que utilizem mais eficientemente as fontes de carbono e energia da planta hospedeira. Sistemas que recuperam a energia gasta na redução de prótons (KUMAR & SEN, 1988) e transportam ureídeos (SCHUBERT, 1986) podem contribuir para melhores eficiência energética e desempenho simbiótico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, em Piracicaba - SP, no período de Maio a Julho de 1992. O substrato utilizado para o crescimento das plantas foi uma mistura de vermiculita e areia (2:1 v/v), lavada com água destilada por 3 vezes. Utilizou-se vasos de barro com capacidade para 3 Kg, com drenagem, previamente lavados com hipoclorito de sódio (0,2% de cloro ativo) e enxaguados com água destilada.

Foi fornecida solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada no Laboratório de Bioquímica de Plantas (Apêndice 1) do CENA/USP, por CONTADO (1990).

3.2. Material vegetal e estirpes de *Bradyrhizobium*

As sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) cultivar IAC-8 e caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivar IPEAN V-69 foram procedentes da Seção de Microbiologia do Solo/CENA e Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPAP/EMBRAPA), respectivamente.

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas foram SR e SEMIA-587, fornecidas pela Seção de Microbiologia do Solo - CENA/USP, que apresentam características Hup-positiva e Hup-regulada pelo hospedeiro, respectivamente.

As estirpes foram crescidas em meio YMB (VINCENT, 1970), que foi utilizado como inoculante líquido, tendo sido feita a contagem de células conforme SOMASEGARAN & HOBEN (1985) e padronização de 10^9 células por ml. A inoculação foi feita logo após o transplante, utilizando-se 2 ml por planta.

3.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (estirpe x época de colheita), para as duas espécies vegetais, com o uso de 4 repetições a cada coleta.

Os dados de repetições foram agrupados para obtenção da média.

As médias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4. Condução do experimento

As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) com 0,2% de cloro ativo, por 20 minutos sob aeração forçada, sendo imediatamente lavadas em água destilada por 3 vezes.

O plantio foi feito em bandejas plásticas contendo vermiculita saturada com $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (VERTE) 0,1mM.

Após a emergência, 3 plântulas foram transplantadas para cada vaso e inoculadas conforme anteriormente descrito em 3.2.

As plantas receberam nutrientes minerais na forma de solução nutritiva (Apêndice 1) - 300ml, 3 vezes por semana. Quando

necessário, colocava-se água destilada.

As temperaturas máximas e mínimas, registradas na casa-de-vegetação durante o período experimental, são apresentadas no Apêndice 2.

Aos 12 dias após a emergência (DAE) foi feito desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso, e uma segunda inoculação, desta vez, utilizando-se de 1 ml por planta, de acordo com o item 3.2.

3.5. Coleta e preparo das amostras

Foram feitas 4 coletas para cada espécie vegetal aos 48, 55, 62, 69 DAE.

No dia anterior a cada coleta, às 8:30 hs, foram coletados discos foliares para a determinação da atividade da alantoinase (SCHULLER *et alii*, 1988).

As coletas foram realizadas às 9:00 hs, procedidas da seguinte maneira: a parte aérea foi cortada à base do caule e colocadas em estufa de secagem com ventilação de ar forçada (FANEM) por 7 dias a 70°C para determinação do peso da matéria seca (PMS). Em seguida, as raízes foram separadas do substrato e colocadas em frascos de 250 ml para determinação da liberação de hidrogênio e atividade de redução do acetileno (ARA). Após as análises, as raízes, ainda com os nódulos, foram mergulhadas em nitrogênio líquido e colocadas em freezer a -70°C para uso posterior.

3.6. Análises dos gases por cromatografia

3.6.1. Determinação da liberação de hidrogênio

As medidas da liberação de hidrogênio foram feitas incubando-se as raízes em frascos de vidro (250 ml), que tiveram a parte superior aplainada e coberta com graxa de silicone (DOW CORNING), evitando o escape de gases no momento de vedação, com tampas plásticas contendo rolhas de borracha do tipo "serum cap".

As raízes foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, amostras foram coletadas com seringas, e 0,5 ml foram injetados em cromatógrafo a gás VARIAN AEROGRAPH modelo 3700, utilizando-se o injetor à temperatura de 110°C, com coluna de aço com comprimento de 1,5m x 0,003m de diâmetro externo, preenchida com peneira molecular 5A (45 a 60 mesh) a temperatura de 60°C, condutor térmico a temperatura de 140°C. O gás carreador utilizado foi N₂-U (OXIGÊNIO DO BRASIL) com fluxo de 31,49 ml/min.

Como padrão de hidrogênio (OXIGÊNIO DO BRASIL) foram preparadas 3 concentrações: 100, 250 e 500 ppm para verificar a linearidade entre elas e os picos correspondentes no registrador gráfico conforme RODRIGUES (1992).

3.6.2. Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase foi determinada indiretamente através do método da atividade de redução de acetileno (ARA) proposto por HARDY *et alii* (1968).

Após a retirada de ar (25 ml) dos frascos de incubação, injetou-se a mesma quantidade na forma de gás acetileno (OXIGÊNIO DO BRASIL). Após 30 minutos, retirou-se 1 ml de amostra com o uso de seringas plásticas, sendo armazenadas em rolhas de borracha.

Foram injetados 0,5 ml da amostra em cromatógrafo à gás de ionização de chama (BECKMAN modelo GC-65), utilizando-se detector de chama de hidrogênio à temperatura de 125°C e coluna de 0,5 m de comprimento e 0,005 m de diâmetro, contendo resina Porapac N de 80 a 100 mesh a 50°C. Como gás carreador, foi utilizado N₂-U (OXIGÊNIO DO BRASIL) em fluxo de 40 ml/min. Para determinação dos picos dos padrões usou-se o gás etileno (MESSER GRIESHEIN) 500 ppm.

A atividade de redução de acetileno foi calculada como descrito por RODRIGUES (1992), e a eficiência relativa conforme SCHUBERT & EVANS (1976).

3.7. Obtenção dos extratos de nódulos

As raízes foram descongeladas e lavadas em solução de CaSO_4 0,1 mM. Posteriormente, os nódulos foram destacados, contados e pesados, enquanto que as raízes foram colocadas em estufa de secagem com ventilação de ar forçada por 7 dias à 70°C para a determinação do PMS.

Foi triturado 1,0 g de nódulos em almofariz banhado em gelo, pré-resfriado com nitrogênio líquido a fim de que a temperatura se aproximasse de 0°C. Para a maceração, adicionou-se 5 ml (2+2+1ml) de tampão HEPES (SIGMA) - 50 mM, pH 8,0, contendo ditioneitol (BRL) 5 mM e EDTA (NUCLEAR) 125mM.

O macerado foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a 30.000 g, à 0°C, por 30 minutos em centrífuga HITACHI modelo Himac CR20B2, com rotor em disposição angular fixa. O sobrenadante foi congelado à temperatura de -11°C para a análise da atividade da enzima glutamina sintetase.

3.7.1. Determinação da atividade da glutamina sintetase

Para determinação da atividade enzimática de glutamina sintetase utilizou-se o procedimento de atividade biossintética do hidroxamato descrito por FARNDEN & ROBERTSON (1980).

O meio de reação foi obtido com a adição de 0,2 ml de tampão TRIS-HCl (ALDRICH) 0,25 M, pH 7,0; 0,2 ml de glutamato de sódio (MERCK) 0,3 M, pH 7,0; 0,2 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (RIEDEL-DE HAËN AG SEELZE) 0,5 M; 0,2 ml da mistura hidroxilamina composta de NH_3OH (ALLIED CHEMICAL) 1 M e NaOH (NUCLEAR) 1 M, 1:1 v/v, pH 7,0; e 0,5 ml do extrato enzimático obtido como descrito no item 3.7. O branco foi feito sem a mistura hidroxilamina.

Os tubos foram agitados e levados ao banho-maria a 35°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 ml de solução férrica contendo $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MERCK) 10%, ácido tricloroacético (SIGMA) 24% e HCl (ECIBRA) 50%, na proporção 1:1:1.

Novamente, a solução foi centrifugada a 5.000 g, por 10 minutos, e a absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro, MILTON ROY, COMPANY modelo Spectronic-20D.

A curva padrão foi feita com soluções diluídas de γ -glutamyl-hidroxamato (SIGMA).

3.7.2. Determinação da concentração de proteínas

À 0,2 ml do extrato obtido no item 3.7, adicionou-se 0,2 ml de água destilada; 2,0 ml da solução cupro-alcalina que contém 50 ml de Na_2CO_3 (MERCK) 2% em NaOH (NUCLEAR) 0,1 N e 1,0 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MERCK) 0,5% em tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - QM) 1%, preparada na hora do uso.

Após agitar e esperar por 10 minutos, adicionou-se 0,2 ml do reagente de Folin 1 N (SIGMA). Agitou-se e após 30 minutos foi lida a absorbância em 660 nm (LOWRY *et alii*, 1951). O branco foi feito sem o extrato nodular e a curva padrão com soluções diluídas de soro de albumina bovina (BSA - SIGMA).

3.8. Determinação da atividade da alantoinase em discos foliares

O método utilizado foi descrito por SCHULLER *et alii* (1988), modificado no laboratório de Bioquímica de Plantas do CENA/USP por MELOTTO & SILVEIRA (1993).

Dos discos de folhas totalmente expandidas (0,5 cm de diâmetro), coletados no dia anterior a cada coleta, foram pesados 200 mg e colocados em 4,0 ml de solução contendo: 100 mM de KH_2PO_4 (MALLINCKRODT); 1% de isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ - BDH CHEMICAL); 0,01% de TRITON X-100 (MERCK) e 20 mM de alantoína (BDH CHEMICAL), pH 7,5.

A reação foi deixada em banho-maria por 2 horas à 30°C. Logo após, a reação foi paralizada em banho de gelo. Em seguida as amostras foram analisadas pelo glioxilato formado segundo método descrito por VOGELS & VAN DER DRIFT (1970).

À uma amostra de 1,25 ml retirada da reação anterior adicionou-se 0,25 ml de tampão fosfato 0,4 M, pH 7,0, contendo $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ECIBRA) e Na_2HPO_4 (MALLINCKRODT); e 0,25 ml de cloridrato de fenilhidrazina ($\text{C}_6\text{H}_9\text{ClN}_2$ - RIEDEL-DE HAËN) - 0,066g/20ml. Misturou-se e deixou-se por 5 minutos à temperatura ambiente.

Resfriou-se em banho de gelo, e foram colocados 1,25 ml de HCl concentrado (ECIBRA) e 0,25 ml de ferricianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - MERCK] - 0,417g/25ml. A absorbância foi determinada a 535 nm em espectrofotômetro MILTON ROY COMPANY, modelo Spectronic-20D. O branco foi feito sem os discos foliares.

A curva padrão foi feita com soluções diluídas de alantoína (BDH CHEMICAL).

3.9. Determinação do teor de nitrogênio

A parte aérea seca foi moída e homogeneizada. Pesou-se 200 mg do material, que foram digeridos a 350°C por 4 horas, utilizando-se 6 ml da seguinte mistura digestora: H_2O_2 (SYNTH) 30% (350 ml); $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (NUCLEAR) (14,0 g); Se (ECIBRA) (0,42 g); H_2SO_4 (SYNTH) concentrado (420 ml).

Diluiu-se as amostras com água destilada até 75 ml e misturou-se. Um volume de 2 ml foi utilizado para a determinação da porcentagem de nitrogênio pelo método colorimétrico em Auto Analizador (TECHNICON AutoAnalyzer II).

Os picos das amostras foram correlacionados com o pico dos padrões feitos com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MALLINCKRODT) à 1, 2, 3, 4, 5 e 6% através de regressão linear, obtendo-se a %N nas amostras. O conteúdo de nitrogênio (CN) foi determinado pela relação:

$$\text{CN} = \frac{\%N \cdot \text{PMS (mg)}}{100}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade de redução do acetileno x liberação de hidrogênio x eficiência relativa (ER)

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA-587 e SR são Hup-hr e Hup⁺, respectivamente. Desta maneira, a estirpe SR não apresentaria alta liberação de hidrogênio para qualquer que fosse o seu macrossimbionte, e a estirpe SEMIA-587, caracterizada acima com expressão da hidrogenase regulada pelo hospedeiro, na simbiose com caupi apresentaria baixa liberação de hidrogênio e o contrário seria verificado em soja (VAN BERKUM, 1990).

Neste trabalho, a simbiose caupi x SR apresentou uma liberação de hidrogênio menor que na simbiose com SEMIA-587, estatisticamente significativa aos 69 DAE. Enquanto que, quando soja foi o hospedeiro não foi verificada diferença estatística durante o período estudado. Em todos os casos estudados, foi verificada alta eficiência relativa (ER), o que sugere a expressão Hup⁺ para ambas as

estirpes.

EISBRENNER & EVANS (1983), sugerem que estirpes com alta ER proporcionariam um aumento na FBN. A Figura 1 demonstra a atividade específica de redução do acetileno (ARA) em caupi. Podemos observar que a ARA específica na simbiose com a estirpe SR foi 50% maior do que na simbiose com SEMIA-587 (significativo a 10%, Tukey). Isto estaria relacionado a um possível aumento da capacidade nodular, uma vez que caupi x SR apresentou menor peso da matéria fresca (PMF) de nódulos (Figura 12) quando confrontado a caupi x SEMIA-587, e as mesmas tiveram padrões semelhantes no conteúdo de nitrogênio na parte aérea (Figura 20). Estas indicações encontram concordância com o trabalho de HUNGRIA *et alii* (1989), onde estirpes comprovadamente de características Hup⁺, tiveram maior eficiência na formação de nódulos.

Quando expressa por planta, a ARA (Figura 2) foi sempre crescente e semelhante nas duas simbioses, diferindo com significância estatística ao nível de 5% aos 69 DAE. Nesta ocasião, a estirpe SEMIA-587 suplantou a estirpe SR. Contudo, este aumento da ARA total pela SEMIA-587 foi acompanhado por um aumento na liberação de hidrogênio (Figura 3), e conseqüentemente não contribuiu para um aumento na eficiência relativa (ER) (Figura 4), que esteve em torno de 0,98 nas 3 últimas coletas.

Apesar da interação caupi x SR ter apresentado uma menor liberação de hidrogênio, isto não se refletiu em maior ARA. Isto

poderia explicar o fato de que a reciclagem de hidrogênio via enzima hidrogenase, não proporcione um aumento na quantidade de ATP e poder redutor, que estariam prontamente disponíveis a serem utilizados pela nitrogenase (DREVON *et alii*, 1987). Estes produtos, seriam drenados para outros processos metabólicos na planta (RAWSTHORNE, 1980).

Em soja, ARA específica (Figura 5) teve seu menor valor aos 55 DAE, tanto para a estirpe SR quanto SEMIA-587. Dos 48 aos 55 DAE a estirpe SR teve maior ARA específica, contudo o padrão de distribuição foi semelhante nas duas simbioses, sendo que na primeira coleta a diferença obtida entre as estirpes foi significativa estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Uma distribuição semelhante também é observada com respeito a ARA expressa por planta (Figura 6). Mas neste caso os valores para SR e SEMIA-587 são quase coincidentes.

Valores coincidentes também foram encontrados para a ER (Figura 7), que estiveram por volta de 0,99 durante todo o período experimental.

A alta ER encontrada nas simbioses estudadas se deve a pequena liberação de hidrogênio, da ordem de 0,1-0,5 $\mu\text{mol H}_2$.(planta . hora)⁻¹ para caupi (Figura 3) e 0,02-0,08 $\mu\text{mol H}_2$.(planta . hora)⁻¹ para a soja (Figura 8). Outros trabalhos têm reportado uma liberação de hidrogênio da ordem de 5-10 $\mu\text{mol H}_2$.(planta . hora)⁻¹ (HUNGRIA & NEVES, 1986; RODRIGUES, 1992). Como há um desvio mínimo de 25% dos elétrons do nitrogênio para o hidrogênio (SCHUBERT & EVANS, 1976;

EVANS *et alii*, 1987), pode-se dizer que os valores de ER acima de 0,75 estão relacionados com a atividade da hidrogenase (HUNGRIA & NEVES, 1986). Acredita-se que todas as combinações simbióticas estiveram sob a ação da hidrogenase.

Em termos energéticos, a alta eficiência relativa encontrada nas simbioses com soja parece não ter sido suficiente para explicar as diferenças obtidas quanto a eficiência nodular (Figura 10), ao acúmulo de MS (Figura 18) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (Figura 22). O fato das estirpes utilizadas neste experimento não serem isogênicas, diferindo em outras características além da hidrogenase, poderia resultar em ativação ou não de outros processos metabólicos no macrossimbionte que determinariam as variações encontradas.

HUNGRIA & RUSCHEL (1989) explicam que outros fatores importantes associados às altas taxas de fixação de nitrogênio estão ligados aos genes responsáveis pelo metabolismo de hidrogênio. Entre eles pode-se incluir a maior capacidade de nodulação, alta produção de ureídeos (NEVES & HUNGRIA, 1987) e alta fixação de CO₂ pelos nódulos devido à maior atividade da PEP carboxilase (CONTADO, 1990).

Em outros trabalhos, desenvolvidos em nossos laboratórios, têm-se encontrado que na simbiose soja x SR, estirpe com característica Hup⁺ (VAN BERKUM, 1990), ocorre uma maior concentração de leghemoglobina nos nódulos, maior atividade da PEP carboxilase (RODRIGUES, 1992).

Estas considerações necessitam de abordagens mais aprofundadas sobre este aspecto da FBN.

ATIVIDADE ESPECÍFICA DA NITROGENASE CAUPI

Figura 1. Distribuição da atividade de redução de acetileno específica em *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 30%; d.m.s. = 8,98.

ATIVIDADE DA NITROGENASE CAUPI

Figura 2. Distribuição da atividade de redução de acetileno em *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 35%; d.m.s. = 5,39.

Figura 3. Liberação de hidrogênio em *Vigna unguiculata*, ao longo do tempo. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 75%; d.m.s. = 0,21.

Figura 4. Eficiência relativa (ER) da nitrogenase em *Vigna unguiculata*, ao longo do tempo. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 4%; d.m.s. = 0,058.

ATIVIDADE ESPECÍFICA DA NITROGENASE SOJA

Figura 5. Distribuição da atividade de redução de acetileno específica em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 27%; d.m.s. = 9,52.

Figura 6. Distribuição da atividade de redução de acetileno em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 21%; d.m.s. = 6,12.

Figura 7. Eficiência relativa (ER) da nitrogenase em *Glycine max*, ao longo do tempo. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 0,3%; d.m.s. = 0,004.

LIBERAÇÃO DE HIDROGÊNIO SOJA

Figura 8. Liberação de hidrogênio em *Glycine max*, ao longo do tempo.

Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de

Tukey. C.V. = 62%; d.m.s. = 0,05.

4.2. Eficiência nodular

Em caupi x SEMIA-587, obteve-se maior PMF de nódulos (Figura 12) aos 69 DAE, mas iguais PMS (Figura 17) e conteúdo de nitrogênio (Figura 20) na parte aérea, sugerindo nódulos menos ativos nesta simbiose. No entanto, a eficiência nodular não foi significativa pelo Teste de Tukey 5% em nenhum dos períodos amostrados.

Em soja inoculada com a estirpe SR, obteve-se maior eficiência nodular aos 55 DAE (Tukey 5%) quando comparada com SEMIA-587 (Figura 10). Isto sugere que essa maior eficiência nodular pode ter sido responsável pelo maior acúmulo de nitrogênio (Figura 22) e PMS (Figura 18) na parte aérea de soja x SR aos 69 DAE.

HUNGRIA *et alii* (1989) também encontraram que nódulos formados por estirpes Hup⁺ apresentaram maior conteúdo de nitrogênio na planta, quando comparadas com estirpes Hup⁻, mesmo que o PMF e ARA não tenham sido diferentes. Observamos que nem sempre o maior PMF em nódulos corresponde ao maior acúmulo de nitrogênio nos tecidos.

Estas observações sugerem que a eficiência nodular poderia ser um importante parâmetro a ser considerado em seleção de cultivares, uma vez que fontes de carbono obtidas dos carboidratos da planta, para o uso na formação e função do nódulo, devem ser utilizados de maneira que maximizem a FBN. No entanto, verifica-se pela literatura que pouca atenção tem sido dada a este parâmetro. Os

trabalhos em sua maioria são voltados à ARA que é uma medida temporária da atividade enzimática, sujeita a influência de fatores ambientais (BETHLENFALVAY & PHILLIPS, 1977).

Figura 9. Eficiência nodular em plantas de *Vigna unguiculata*, ao longo do tempo. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 29%; d.m.s. = 19,8.

Figura 10. Eficiência nodular em plantas de *Glycine max*, ao longo do tempo. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 37%; d.m.s. = 57,9.

4.3. Desenvolvimento dos nódulos

Na simbiose caupi x SR, o número de nódulos aumentou obedecendo uma curva sigmóide e o PMF cresceu linearmente, chegando a 2 e 3 vezes do valor inicial aos 69 DAE, respectivamente.

O peso da matéria fresca (PMF) de nódulos e o número de nódulos formados na simbiose caupi x SEMIA-587 aumentaram rapidamente, dobrando seu valor aos 55 DAE. Em seguida, houve uma parada no desenvolvimento nodular tanto em número, quanto em massa e na última coleta, aos 69 DAE, número e peso atingiram um valor de aproximadamente 2 e 5 vezes, respectivamente, relativo ao período inicial estudado (48 DAE).

Em termos de acúmulo de massa nodular, a estirpe SEMIA-587 mostrou-se melhor aos 69 DAE, sendo estatisticamente significante ao nível de 5%. Pouca diferença foi observada nos estágios anteriores. Os gráficos obtidos com o número e PMF de nódulos em caupi são demonstrados nas Figuras 11 e 12.

Em soja, independente da estirpe inoculada, o número de nódulos (Figura 13), não apresentou diferença significativa.

O peso de matéria fresca de nódulos de soja (Figura 14) foi maior somente aos 55 DAE na simbiose com SEMIA-587, havendo significância estatística ao nível de 5% neste período. Após este período a estirpe SR foi superior, porém em pequena diferença, da

ordem de 50 mg por planta.

O maior desenvolvimento dos nódulos obtidos com a estirpe SEMIA-587 não se traduziu em maior desenvolvimento da parte aérea, concordando com os dados observados por RODRIGUES (1992). Pelo contrário, como veremos adiante, os maiores valores de PMS (item 4.5) e conteúdo de nitrogênio (item 4.6) na parte aérea tiveram lugar com a estirpe SR.

Figura 11. Variação sazonal no número de nódulos em *Vigna unguiculata*.

Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 23%; d.m.s. = 29,6.

Figura 12. Variação sazonal do peso de matéria fresca de nódulos em *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 27%; d.m.s. = 0,2.

Figura 13. Variação sazonal no número de nódulos em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 20%; d.m.s. = 37,3.

Figura 14. Variação sazonal do peso de matéria fresca de nódulos em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 17%; d.m.s. = 0,21.

4.4. Concentração de proteínas solúveis em nódulos

Nas Figuras 15 e 16 podemos observar a concentração de proteínas solúveis em nódulos de caupi e soja, respectivamente. Independentemente da estirpe inoculada, não houveram diferenças significativas.

Para todas as interações estudadas neste experimento, observamos que durante o período de coletas, há uma queda na concentração de proteínas solúveis, inverso dos valores obtidos para atividade por nódulos e atividade específica de glutamina sintetase para caupi (Figuras 23 e 24), e soja (Figuras 25 e 26). Esta informação poderia sugerir que a enzima glutamina sintetase em sua função de assimilar nitrogênio, não estaria somente associada ao processo de FBN, como querem informar MIFLIN & LEA (1976). Desta maneira, a enzima glutamina sintetase poderia, neste caso, ter participação ativa na assimilação de amônio proveniente de outras fontes, tais como catabolismo de aminoácidos e compostos transportadores de nitrogênio, bem como quebra e interconversão de produtos aminados que também podem resultar na liberação de amônia (KUMAR & ABROL, 1990).

Concordando com os dados relatados por GROAT *et alii* (1984), as simbioses que tiveram maior concentração de proteínas solúveis nos nódulos, observando o mesmo período de coleta, também

apresentaram maior atividade da glutamina sintetase (item 4.7).

Genótipos com alta atividade enzimática nos nódulos possuem maiores concentrações de proteínas solúveis (JESSEN *et alii*, 1987). Estes pontos são importantes para maior eficiência nodular, que melhoram a FBN e a produção vegetal (JESSEN *et alii*, 1988).

PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM NÓDULOS CAUPI

Figura 15. Variação sazonal da concentração de proteínas solúveis em nódulos de *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 19%; d.m.s. = 14,3.

PROTEÍNAS SOLÚVEIS EM NÓDULOS SOJA

Figura 16. Variação sazonal da concentração de proteínas solúveis em nódulos de *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 21%; d.m.s. = 15.

4.5. Acúmulo de fitomassa

O acúmulo de fitomassa total (raiz + parte aérea) nas simbioses com caupi apresentaram uma distribuição quase que linear (Figura 17). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as duas simbioses, em todas as épocas de colheita.

A maior massa nodular em caupi x SEMIA-587 aos 69 DAE (Figura 12) não se refletiu em um maior acúmulo de fitomassa. Mostrando que nesta simbiose mais nódulos são necessários para produzir a mesma quantidade de matéria seca, como foi mostrado anteriormente pela eficiência nodular (item 4.2).

Em soja, o acúmulo de matéria seca (Figura 18) foi ligeiramente maior na presença da estirpe SR do que com SEMIA-587, sendo que na primeira houve um incremento em torno de 6 vezes mais que o estágio inicial e na segunda, 5 vezes. Isto correspondeu a um incremento de 20% aos 69 DAE em favor da estirpe SR, sendo esta diferença significante estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Resultados semelhantes foram encontrados por SAINI *et alii* (1987), que observaram um aumento de 22% no PMS de *Sesbania* inoculada com estirpe Hup⁺ comparado com Hup⁻. Também, pelos trabalhos de THIMMAIAH & LODHA (1986) e CHAKHAL & BRAR (1987), obtiveram-se os mesmos resultados.

É interessante observar que as estirpes SR e SEMIA-587

em simbiose com caupi, teria a expressão positiva do gene hup, portanto resultando em baixa liberação de hidrogênio, o que explicaria os valores coincidentes no acúmulo de fitomassa (Figura 17). Para a interação das mesmas estirpes com soja, a cepa SR seria de expressão Hup⁺, enquanto que SEMIA-587 por ser Hup-hr teria expressão Hup⁻. Entretanto, foi obtido também, baixa liberação de hidrogênio nos dois casos, mas mesmo assim, o acúmulo de fitomassa foi superior para a estirpe SR. Isto sugere que outros aspectos do metabolismo vegetal estão relacionados com os genes responsáveis pela expressão da enzima hidrogenase (HUNGRIA & RUSCHEL, 1989), e podem ter influenciado nas simbioses com soja.

No geral, a estirpe SR, nas duas simbioses, mostrou-se mais eficiente quando comparada com SEMIA-587, pois teve menor desenvolvimento nodular, havendo provavelmente menor requerimento de fotossintatos para formação e manutenção dos nódulos. Estes fotossintatos poderiam então, ser usados em outros processos, como o desenvolvimento da parte aérea. Nódulos, normalmente, consomem 30-50% dos fotossintatos produzidos na parte aérea, durante o período de ativo crescimento. Variações nesta necessidade podem estar diretamente ligadas à produção de sementes (NEVES & HUNGRIA, 1987). Isto refletiu também no conteúdo de nitrogênio na parte aérea.

ACÚMULO DE FITOMASSA CAUPI

Figura 17. Acúmulo de fitomassa da parte aérea de *Vigna unguiculata*.

Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 19%; d.m.s. = 0,32.

Figura 18. Acúmulo de fitomassa da parte aérea de *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 16%; d.m.s. = 0,78.

4.6. Porcentagem e conteúdo de nitrogênio na parte aérea

Na simbiose caupi x SEMIA-587 a porcentagem de nitrogênio aumentou de 2,5 para 3,0 até aos 69 DAE. Enquanto que com SR foi variável atingindo o maior valor aos 62 DAE: 3,4% (Figura 19).

O conteúdo total de nitrogênio em caupi (Figura 20), na presença da estirpe SR, não diferiu até aos 62 DAE e foi maior aos 69 DAE para SEMIA-587, devido a queda na porcentagem de nitrogênio. Diferenças estatísticas não foram observadas nas duas simbioses que tiveram caupi por macrossimbionte. Contrariando o que foi sugerido por LA FAVRE & FOCHT (1985), a maior massa nodular obtida na simbiose caupi x SEMIA-587 não indicou maior habilidade em fixar nitrogênio.

Em soja inoculada tanto com SR quanto com SEMIA-587 a porcentagem de nitrogênio não diferiu significativamente (Figura 21). No entanto, o conteúdo de nitrogênio total chegou a um incremento de 25% na simbiose soja x SR comparada com SEMIA-587 (Figura 22), provavelmente pelo maior PMS (Figura 18). Aos 69 DAE esta diferença foi significativa estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Em outras espécies estudadas, *Cajanus cajan* (LA FAVRE & FOCHT, 1985), *Pisum sativum* e *Vicia benghalensis* (CUNNINGHAM *et alii*, 1985), *Vigna unguiculata* e *Glycine max* (RODRIGUES, 1992), um aumento na razão de fixação de nitrogênio também foi observado, quando inoculadas com estirpe apresentando fenótipo Hup⁺.

Figura 19. Variação sazonal da porcentagem de nitrogênio na parte aérea de *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 18%; d.m.s. = 0,73.

Figura 20. Variação sazonal do conteúdo de nitrogênio total na parte aérea de *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 31%; d.m.s. = 11,2.

Figura 21. Variação sazonal da porcentagem de nitrogênio na parte aérea de *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 9%; d.m.s. = 0,39.

CONTEÚDO DE NITROGÊNIO NA PARTE AÉREA SOJA

Figura 22. Variação sazonal do conteúdo de nitrogênio total na parte aérea de *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 16%; d.m.s. = 21.

4.7. Atividade de glutamina sintetase e sua relação com a atividade da nitrogenase

Nas Figuras 23 e 24 podemos observar a atividade da Glutamina Sintetase (GS) em caupi expressa por g de MF de nódulos e mg de proteína, respectivamente. De modo geral, a assimilação de amônia nas duas simbioses foi semelhante, confirmado pela análise estatística, e crescente com o desenvolvimento da planta.

Convém lembrar que os outros parâmetros estudados, acúmulo de fitomassa, conteúdo de nitrogênio e ER em caupi foram todos semelhantes em caupi independente da estirpe. Neste caso os possíveis benefícios que a inoculação com uma estirpe Hup⁺ pudessem promover não foram observados. Dados semelhantes foram encontrados por outros autores (LA FAVRE & FOCHT, 1985; CUNNINGHAM *et alii*, 1985; CHAKHAL & BRAR, 1987).

Em soja, uma diferença ao redor de 20% foi encontrada nos estágios mais adiantados do desenvolvimento (62 e 69 DAE) quanto à atividade da GS (Figuras 25 e 26) em favor da estirpe SR sobre a estirpe SEMIA-587, não sendo, porém, significante estatisticamente. Esta diferença foi acompanhada pelo acúmulo de MS (Figura 18) e conteúdo de nitrogênio (Figura 22) na parte aérea. Pode-se considerar que a maior atividade assimilatória de nitrogênio possa ter contribuído para maiores valores das variáveis acima, já que não foram

observadas diferenças quanto a ARA e ER (item 4.1).

As variações na atividade das enzimas que assimilam amônia sugerem que elas estão mais estreitamente associadas com o potencial de fixação de nitrogênio em algumas simbioses que em outras (GROAT *et alii*, 1984). Estas características poderiam ser exploradas como possíveis critérios de seleção das melhores simbioses (JESSEN *et alii*, 1987).

Outro item importante para um programa de seleção seria a relação da GS com a atividade da nitrogenase. Tem sido sugerido que as nodulinas GS, GOGAT e PEP carboxilase podem ser utilizadas como marcadores genéticos-bioquímicos de variação na eficiência de fixação de nitrogênio (JESSEN *et alii*, 1988).

Os coeficientes de correlação entre a nitrogenase e a atividade da GS variam muito com os simbiontes (Tabela 2). Nas simbioses aqui estudadas, foram encontrados baixíssimos coeficientes de correlação entre estes parâmetros (Tabela 3).

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre a GS e ARA observados em diferentes simbioses.

ESTIRPE	CULTIVAR	r^2	REFERÊNCIA
<i>Bradyrhizobium</i> (CB-756)	<i>Vigna unguiculata</i> (BR-05)	0,453	CONTADO (1990)
<i>B. japonicum</i> (SR)	<i>Glycine max</i> (IAC-08)	0,120	RODRIGUES (1992)
<i>B. japonicum</i> (SEMIA-587)	<i>Glycine max</i> (IAC-08)	0,140	RODRIGUES (1992)
<i>B. japonicum</i> (SR)	<i>Vigna unguiculata</i> (BR-01)	0,680	RODRIGUES (1992)
<i>B. japonicum</i> (SEMIA-587)	<i>Vigna unguiculata</i> (BR-01)	0,300	RODRIGUES (1992)
<i>Rhizobium tropici</i> (CIAT-899)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Negro Argel)	0,691	CONTADO (1990)
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	-0,060	GROAT <i>et alii</i> (1984)

Tabela 3. Equações de regressão e seus coeficientes de correlação entre a atividade específica da nitrogenase e atividade específica da glutamina sintetase, obtidas a partir de 4 repetições.

Simbiose	r^2	equação de regressão
caupi x SR	0,12	$y = 0,2944 + 0,0087x$
caupi x SEMIA-587	0,08	$y = 0,3538 + 0,0103x$
soja x SR	0,11	$y = 0,7494 - 0,0073x$
soja x SEMIA-587	0,013	$y = 0,5534 - 0,0012x$

ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE CAUPI

Figura 23. Distribuição da atividade da glutamina sintetase em *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 25%; d.m.s. = 8,7.

ATIVIDADE ESPECÍFICA DA GLUTAMINA SINTETASE CAUPI

Figura 24. Distribuição da atividade específica da glutamina sintetase em *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 31%; d.m.s. = 0,23.

ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE SOJA

Figura 25. Distribuição da atividade da glutamina sintetase em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 21%; d.m.s. = 7,77.

ATIVIDADE ESPECÍFICA DA GLUTAMINA SINTETASE SOJA

Figura 26. Distribuição da atividade específica da glutamina sintetase em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 28%; d.m.s. = 0,23.

4.8. Atividade da alantoinase

No presente experimento não foi possível determinar a composição da seiva do xilema devido ao volume insuficiente das amostras obtidas para as análises. Entretanto, a degradação de ureídeos transportados pelo xilema pôde ser observada nas folhas através da atividade da enzima alantoinase.

Na Figura 27 podemos verificar a atividade da enzima alantoinase em discos foliares de caupi. Na presença da estirpe SEMIA-587 foram obtidos maiores valores a partir do 55 DAE comparados com os valores obtidos com a estirpe SR, sendo que aos 69 DAE obteve-se a maior diferença, estatisticamente significativa ao nível de 1%. Contudo foi observado um padrão de distribuição semelhante para as duas estirpes.

Na distribuição da atividade da alantoinase ocorrida em soja (Figura 28) também houve um padrão semelhante para as duas estirpes, mas neste caso, a simbiose com a estirpe SR teve maior atividade que na presença da estirpe SEMIA-587 até aos 62 DAE, porém sem diferença significativa.

Todos os trabalhos consultados relacionam a atividade da alantoinase com a nutrição das sementes. Nenhuma atenção tem sido dada à influência do metabolismo de ureídeos durante o crescimento vegetativo da planta.

Como têm relatado HUNGRIA *et alii* (1991), os sintomas de deficiência de nitrogênio em feijoeiro durante o estágio inicial de crescimento, são causados, não pela limitação de FBN, como seria esperado, mas pela expressão dos processos posteriores a ela, tais como a assimilação e transporte do nitrogênio feito na forma de ureídeos em leguminosas tropicais (SCHUBERT, 1986).

ATIVIDADE DA ALANTOINASE EM FOLHAS CAUPI

Figura 27. Distribuição da atividade da allantoinase em folhas em *Vigna unguiculata*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 19%; d.m.s. = 7,6.

ATIVIDADE DA ALANTOINASE EM FOLHAS SOJA

Figura 28. Distribuição da atividade da allantoinase em folhas em *Glycine max*. Barra vertical indica a d.m.s. ao nível de 5%, pelo teste de Tukey. C.V. = 23%; d.m.s. = 4,52.

5. CONCLUSÕES

A eficiência nodular da estirpe SR se mostrou superior em relação à estirpe SEMIA-587. Sendo possível que a expressão genotípica Hup^+ da estirpe SR esteja associada a outras características fisiológicas que contribuem para a maior eficiência simbiótica, além da menor liberação de hidrogênio.

A atividade específica da enzima glutamina sintetase apresentou pouca relação com a atividade específica da nitrogenase, indicando que estas enzimas podem não ser correguladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.W.W.; MORTENSON, L.E.; CHEN, J.S. Hydrogenase. Bioquímica et Biophysica Acta, Amsterdam, 594:105-76, 1981.
- ALCANTAR-GONZALES, G.; MOYSE, A.; BISMUTH, E.; CHAMPIGNY, M.L. Effect of nitrate on acetylene reduction and the activities of some enzymes of nitrogen and carbon metabolism, involved in nitrogen fixation in the root nodules of soybean. Agronomie, Paris, 10:847-55, 1990.
- ATKINS, C.A.; STORER, P.J.; PATE, J.S. Pathways of nitrogen assimilation in cowpea nodules studies using $^{15}\text{N}_2$ and allopurinol. Plant Physiology, Rockville, 86:204-7, 1988a.
- ATKINS, C.A.; STORER, P.J.; YOUNG, E.B. Translocation of nitrogen and expression of nodule-specific uricase (nodulin-35) in *Robinia pseudoacacia*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 83(3):483-91, 1991.
- ATKINS, C.A.; FERNANDO, M.; HUNT, S.; LAYZELL, D.B. A metabolic connection between nitrogenase activity and the synthesis of ureides in nodulated soybean. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 84(3):441-7, 1992.

- ATKINS, C.A.; SANFORD, P.J.; STORER, P.J.; PATE, J.S. Inhibition of nodule functioning in cowpea by a xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol. Plant Physiology, Rockville, 88:1229-34, 1988b.
- ATKINS, C.A.; RITCHIE, A.; ROWE, P.B.; MCCAIRNS, E.; SAUER, D. *De novo* purine synthesis in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and soybean (*Glycine max* L. Merr.). Plant Physiology, Rockville, 70:55-60, 1982.
- BERGERSEN, F.J. Leghaemoglobin, oxygen supply and nitrogen fixation: studies with soybean nodules. In: STEWART, W.D.P. & GALLON, J.R. ed. Nitrogen fixation. London, Academic Press, 1980. p.139-60.
- BERGERSEN, F.J. Physiological control of nitrogenase and uptake hydrogenase. In: DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. eds., Biology and biochemistry of nitrogen fixation. Amsterdam, Elsevier, 1991. v.1: Studies in plant science, p.76-102.
- BETHLENFALVAY, G.L. & PHILLIPS, D.A. Effect of light intensity on the efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. Plant Physiology, Rockville, 60:868-71, 1977.
- BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; NEVES, M.C.P. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. Mircen - Journal of Applied Microbiology & Biotechnology, Oxford, 3:3-22, 1987.

- BOLAND, M.J.; HANS, J.F.; REYNOLDS, P.H.S.; BLEVINS, D.G.; TOLBERT, N.E.; SCHUBERT, K.R. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. Planta, Berlin, 155:45-51, 1982.
- BREWIN, N.J. Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen fixing symbionts. In: VERMA, D.P.S. & HOHN, T.H., ed. Plant gene research - genes involved in microbe-plant interaction. New York, Springer-Verlag, 1984. cap. 6, p.179-203.
- CABELLO, P.; HABA, P. DE LA; MALDONADO; J.M.; DE LA HABA, P. Isoforms of glutamine synthetase in cotyledons, leaves and roots of sunflower plants. Journal of Plant Physiology, Stuttgart, 137(3):378-80, 1991.
- CHAKHAL, V.P.S. & BRAR, N.K. The enzymes for ammonium assimilation studied in the cytosol of nodules by HUP-positive and HUP-negative *Rhizobium* strains in two cultivars of the moong *Vigna radiata* L. Mikrobiologija, Yugoslav, 56(1):36-9, 1987.
- COCK, J.M.; BROCK, J.W.; WATSON, A.T.; SWARUP, R.; MORBY, A.P.; CULLIMORE, J.V. Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Molecular Biology, Dordrecht, 17:761-771, 1991.
- CONTADO, J.L. Relações das atividades de Fosfoenolpiruvato carboxilase e glutamina sintetase com a fixação simbiótica de N₂ em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Piracicaba, 1990. 75p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- CUNNINGHAM, S.D.; KAPULNIK, Y.; BREWIN, N.J.; PHILLIPS, D.A. Uptake hydrogenase activity determined by plasmid PRL-6JI in *Rhizobium leguminosarum* does not increase symbiotic nitrogen fixation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 50(4):791-4, 1985.
- DAKORA, F.D. & ATKINS, C.A. Effect of pO_2 on growth and nodule functioning of symbiotic cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Plant Physiology, Rockville, 93(3):948-55, 1990.
- DAKORA, F.D.; ATKINS, C.A., PATE, J.S. Effect of NO_3 on N_2 fixation and nitrogenous solute of xylem in two nodulated West African geocarpic legumes, Karsting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) and Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.). Plant and Soil, The Hague, 140(2):255-62, 1992.
- DAVIES, D.D. & TEIXEIRA, A.N. The synthesis of glutamate and control of glutamate dehydrogenase in pea mitochondria. Phytochemistry, New York, 14:647-56, 1975.
- DREVON, J.J.; FRAZIER, L.; RUSSEL, S.A.; EVANS, H.J. Respiratory and nitrogenase activities of soybean nodules formed by hydrogen uptake negative (Hup^-) mutant and revertant strains of *Rhizobium japonicum* characterized by protein patterns. Plant Physiology, Rockville, 70:1341-6, 1982.
- DREVON, J.J.; KALIA, V.C.; HECKMANN, M.O.; SALSAC, L. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 53(3):610-2, 1987.

- EISBRENNER, G. & EVANS, H.J. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe association. Annual Review of Plant Physiology, Stanford, 34:105-36, 1983.
- EVANS, H.J.; HARKER, A.R.; PAPEN, H.; RUSSELL, S.A.; HANUS, F.J.; ZUBER, M. Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in Rhizobia. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 41:335-61, 1987.
- FARNDEN, K.J.F. & ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase In: BERGERSEN, F.J. ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York, John Wiley & Sons, 1980. p.265-314.
- GARG, F.C.; GARG, R.P.; KUKREJA, K.; SINDHU, S.S.; TAURO, P. Host-dependent expression of uptake hydrogenase in cowpea rhizobia. Journal of General Microbiology, New York, 131(1):93-6, 1985.
- GIBSON, A.H. The genetics of nitrogen-fixing symbiotic associations. In: ABROL, Y.P. ed. Nitrogen in higher plants. England, Research Studies Press, 1990. p. 461-81.
- GODFROY, A. & DREVON, J.J. Hydrogen effect on nitrogenase (C_2H_2 reduction) response to oxygen in *Bradyrhizobium japonicum* - Phaseoleae symbioses. Journal of Experimental Botany, Oxford, 42(244):1379-85, 1991.
- GOMES, M.A.F. & SODEK, L. Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 62:105-9, 1984.

- GRAHAM, L.A.; STULTS, L.W.; MAIER, R.J. Nitrogenase-hydrogenase relationships in *Rhizobium japonicum*. Archives of Microbiology, Berlin, 140:243-6, 1984.
- GREEN, P.D. & WONG, P.P. Subunit analyses of glutamine synthetase isozymes from root nodules of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* Gray). Plant Science, Amsterdam, 82(2):179-86, 1992.
- GROAT, R.G.; VANCE, C.P.; BARNES, D.K. Host plant nodule enzymes associated with selection for increased with N_2 fixation in alfalfa. Crop Science, Madison, 24:895-8, 1984.
- HARDY, R.W.F.; HOSTEN, R.D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluations. Plant Physiology, Rockville, 43:1185-207, 1968.
- HEIM, I. Regulation of nitrogenase activity after defoliation in white clover: the involvement of current photosynthesis, current N_2 fixation and nodular carbohydrate content. Zurich, 1993. 44p. (Dissertation - Swiss Federal Institute of Technology).
- HERRIDGE, D.F. & BETTS, J.H. Field evaluation of soybean genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. Plant and Soil, The Hague, 110:129-35, 1988.
- HERRIDGE, D.F. & PEOPLES, M.B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ^{15}N methods. Plant Physiology, Rockville, 93:495-503, 1990.
- HERRIDGE, D.F.; BERGERSEN, F.J.; PEOPLES, M.B. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ^{15}N abundance methods. Plant Physiology, Rockville, 93:708-16, 1990.

HIREL, B.; MACNALLY, S.F.; GADAL, P.; SUMMAR, N.; STEWART, G.R.

Cytosolic glutamine synthetase in higher plants: a comparative immunological study. European Journal of Biochemistry, Paris, 138:63-6, 1984.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture methods for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station, Berkeley, 347:1-39, 1950.

HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 21(1):9-24, 1986.

HUNGRIA, M.; RUSCHEL, A.P. Acetylene reduction, hydrogen evolution and nodule respiration in *Phaseolus vulgaris*. Biology and Fertility of Soils, New York, 7(4):351-8, 1989.

HUNGRIA, M.; BARRADAS, C.A.A.; WALLSGROVE, R.M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. Journal of Experimental Botany, Oxford, 42(240):839-44, 1991.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; DOBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. Biology and Fertility of Soils, New York, 7(4):325-9, 1989.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte de nitrogênio na seiva do xilema. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 9:193, 1985.

- HYMAN, M.R. & ARP, D.J. Acetylene is an active-site-directed slow-binding reversible inhibitor of *Azotobacter vinelandii* hydrogenase. Biochemistry, Washington, 26(20):6447-54, 1987.
- JESSEN, D.L.; BARNES, D.K.; VANCE, C.P. Bidirectional selectioning alfalfa for activity of nodule nitrogen and carbon-assimilating enzymes. Crop Science, Madison, 28:18-22, 1988.
- JESSEN, D.L.; BARNES, D.K.; VANCE, C.P.; HEICHEL, G.H. Variation for activity of nodule nitrogen and carbon assimilating enzymes in alfalfa. Crop Science, Madison, 27:627-31, 1987.
- JOY, K.W. Ammonia, glutamine, and asparagine: a carbon-nitrogen interface. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 66:2103-9, 1988.
- JOY, K.W.; BLACKWELL, R.D.; LEA, P.J. Assimilation of nitrogen in mutants lacking enzymes of the glutamate synthase cycle. Journal of Experimental Botany, Oxford, 43(247):139-45, 1992.
- KALIA, V.C.; DREVON, J.J.; SALSAC, L. Nitrogenase and uptake hydrogenase activities of *Rhizobium japonicum* during the life cycle of *Glycine max*. Plant Science, Amsterdam, 39(1):17-24, 1985.
- KEYSER, H.H.; VAN BERKUM, P.; WEBER, D.F. A comparative study of physiology of symbioses formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. Plant Physiology, Rockville, 70:1626-30, 1982.
- KUMAR, P.A. & ABROL, Y.P. Ammonia assimilation in higher plants. In: ABROL, Y.P. ed. Nitrogen in higher plants. England, Research Studies Press, 1990. p.159-74.

- KUMAR, K.R. & SEN, A.N. Present concept of hydrogenase activity in nitrogen-fixing systems with special reference to root nodule bacterium. Current Science 57(2):74-8, 1988.
- LA FAVRE, J.S. & FOCHT, D.D. Comparison of N_2 fixation and yields in *Cajanus cajan* between hydrogenase-positive and hydrogenase-negative rhizobia by *in situ* acetylene reduction assays and direct ^{15}N partitioning. Plant Physiology, Rockville, 72:971-7, 1983.
- LA FAVRE, J.S. & FOCHT, D.D. Nitrogen fixation and hydrogen evolution by the pigeon-pea and *Rhizobium* symbiosis. Tropical Agriculture, Trinidad, 62(4):284-8, 1985.
- LARA, M.; CULLIMORE, J.V.; LEA, P.S.; MIFLIN, B.J.; JOHNSTON, A.W.B.; LAMB, J.W. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. Planta, Berlin, 157:254-8, 1983.
- LARA, M.; PORTA, H.; PADILLA, J.; FOLCH, J.; SANCHEZ, F. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiology, Rockville, 76:1019-23, 1984.
- LAYZELL, D.B.; HUNT, S.; PALMER, G.R. Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules. Plant Physiology, Rockville, 92:1101, 1990.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature, London, 251:614-6, 1974.

- LEE, N.G.; STEIN, B.; SUZUKI, H.; VERMA, D.P.S. Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. The Plant Journal 3(4):599-606, 1993.
- LEE, S.B. & WILSON, P.W. Hydrogenase and nitrogen fixation by *Azotobacter*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 151:377-85, 1943.
- LÉON, E.; HABA, P. DE LA; MALDONADO, J.M. Changes in the levels of enzymes involved in ammonia assimilation during the development of *Phaseolus vulgaris* seedlings: effect of exogenous ammonia. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 80:20-6, 1990.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the foin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 193:265-75, 1951.
- MCNALLY, S.F.; HIREL, B.; GADAL, P.; MANN, A.F.; STEWART, G.R. Glutamine synthetase of higher plants. Plant Physiology, Rockville, 72:22-5, 1983.
- MARTIN, F.; WINSPEAR, M.J.; MACFARLANE, J.D.; OAKS, A. Effect of methionine sulfoximine on the accumulation of ammonia in C₃ and C₄ leaves. Plant Physiology, Rockville, 71:177-81, 1983.
- MEEKS, J.C.; WOLK, C.P.; SCHILLING, N.; SHAFFER, P.W.; AVISAR, Y.; CHEIN, W. Initial organic products of fixation of (¹³N) dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). Plant Physiology, Rockville, 61:980-3, 1978.

- MELLOR, R.B. & WERNER, D. Legume nodule biochemistry and function. In: GRESSHOFF, P.M. ed. Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. Boca Raton, CRC Press, 1990. p.111-31.
- MELOTTO, M. & SILVEIRA, J.A.G. da. Transporte e distribuição de ureídeos em *Phaseolus vulgaris* (L.) no período reprodutivo. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., Londrina, 1993. Resumos. Londrina: IAPAR, 1993. 222p.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. Bern, POTAFOS, 1987. 687p.
- MICHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. NEVES, M.C.P. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*): effect of timing of inorganic nitrogen applications on nodulations, plant growth and seed yield. Tropical Agriculture, Trinidad, 58(1):1, 1981.
- MIFLIN, B.J. The location of nitrate reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. Plant Physiology, Rockville, 54:550-5, 1974.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry, New York, 15:873-85, 1976.
- MITCHELL, C.A. & STOCKING, C.R. Kinetics and energetics of light driven chloroplast glutamine synthesis. Plant Physiology, Rockville, 55:59-63, 1975.
- MONTALBINI, P. Ureides and enzymes of ureide synthesis in wheat seeds and leaves and effect of allopurinol on *Puccinia recondita* F. sp. *tritici* infection. Plant Science, Amsterdam, 87:225-31, 1992.

- MURILLO, J.; VILLA, A.; CHAMBER, M.; RUIZ-ARGÜESO, T. Occurrence of H_2 -uptake hydrogenase in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) and their expression in nodules of *Lupinus* spp. and *Ornithopus compressus*. Plant Physiology, Rockville, 89:78-85, 1989.
- NEVES, M.C.P. & HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. CRC Critical Reviews in Plant Science, Boca Raton, 6(3):267-320, 1987.
- NEVES, M.C.P. & RUMJANECH, N.G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. ed. Microbiologia do Solo. Campinas, SBCS, 1992. p.141-56.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. *Rhizobium* strains effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. Journal of Experimental Botany, Oxford, 36(169):1179-92, 1985.
- OAKS, A. & HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. Annual Review Plant Physiology, Stanford, 36:345-65, 1985.
- O'NEAL, D. & JOY, K.W. Localization of glutamine synthetase in chloroplast. Nature, London, 246:61-2, 1973.
- PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; MURRAY, D.R. Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. Plant Physiology, Rockville, 77:382-8, 1985.

- PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; CHONG, K.; FAIZAH, A.W.; SURATMINI, P.; NURHAYATI, D.P.; BAGNALL, D.J.; BERGERSEN, F.J. Re-evaluation of the role of ureides in the xylem transport of nitrogen in *Arachis* species. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 83(4):560-7, 1991.
- PHILLIPS, D.A.; KAPULNIK, Y.; BEDMAR, E.J.; JOSEPH, C.M. Development and partial characterization of nearly isogenic pea lines (*Pisum sativum* L.) that alter uptake hydrogenase activity in symbiotic *Rhizobium*. Plant Physiology, Rockville, 92:983-9, 1990.
- RAINBIRD, R.M.; THORNE, J.H.; HARDY, R.W.F. Role of amide, amino acids, and ureides in nutrition of developing soybean seeds. Plant Physiology, Rockville, 74:329-34, 1984.
- RAO, N.V.; REDDY, R.S.; SASTRY, K.S. Allantoinases of nodulated *Arachis hypogaea*. Phytochemistry, New York, 27(3):693-5, 1988.
- RASCHE, M.E. & ARP, D.J. Hydrogen inhibition of nitrogen reduction by nitrogenase in isolated soybean nodule bacteroids. Plant Physiology, Rockville, 91:663-8, 1989.
- RAWSTHORNE, S.; MICHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; COOKSON, C.; COOMBS, J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. Phytochemistry, New York, 19:341-55, 1980.
- RHODES, D.; SIMS, A.P.; FOLKES, B.F. Pathway of ammonia assimilation in alluminated *Lemma minor*. Phytochemistry, New York, 19:357-65, 1980.

- ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G.; PHILLIPS, R.; RATCLIFFE, R.G.; STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiology, Rockville, 95:509-16, 1991.
- RODRIGUES, J.L.M. As nodulinas PEP carboxilase e glutamina sintetase e sua relação com a eficiência simbiótica na fixação de N₂ em caupi e soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*. Piracicaba, 1992. 139p. (Mestrado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP).
- SAINI, I.; DOGRA, R.C.; NAGPAL, P. Uptake hydrogenase in fast-growing strains of *Rhizobium* sp. (*Sesbania*) in relation to nitrogen fixation. Journal of Applied Bacteriology, New York, 62:449-52, 1987.
- SCHUBERT, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. Annual Review Plant Physiology, Stanford, 37:539-73, 1986.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A., Washington, 73(4):1207-11, 1976.
- SCHULLER, K.A.; DAY, D.A.; GRESSHOF, P.M. Nitrogenase activity and ureide levels in a supernodulating soybean mutant: Effects of inoculum dose and nitrate treatment. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 74:66-71, 1988.
- SHELP, B.J. & IRELAND, R.J. Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean plants. Plant Physiology, Rockville, 77:779-83, 1985.

- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. Methods in legume-Rhizobium technology. NIFTAL, University of Hawaii, 1985. 367p.
- SPRENT, J.I. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin some Leguminosae. Plant, Cell and Environment, Oxford, 3:35, 1980.
- SPRENT, J.I. Nitrogen fixation In: WILKING, M.D. ed. Advanced plant physiology. Pitman, 1984. p.249-76.
- SPRENT, J.I. & SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects. London, Chapman and Hall, 1990. 256p.
- STEWART, G.R.; MANN, A.F.; FENTEM, P.A. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In: MIFLIN, B.J. ed. The Biochemistry of plants. New York, Academic Press, 1980. v.5, p.271-327.
- THAYUMANAVAN, B. & SADASIVAM, S. Influence of exogenous nitrogen on ureide concentration, nitrogenase and allantoinase activities in greengram (*Vigna radiata*) plants. Journal of Ecobiology, New Delhi, 1(2):118-22, 1989.
- THIMMAIAH, S.K. & LODHA, M.L. Hydrogen metabolism and nitrogen fixation in mungbean *Vigna radiata* plants inoculated with HUP-positive and HUP-negative *Rhizobium* strains. Indian Journal of Experimental Biology, New Delhi, 24(2):112-5, 1986.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. Ureide metabolism in higher plants. Phytochemistry, New York, 20:361-71, 1981.

- TRUELSEN, T.A. & WYNDAELE, R. Recycling efficiency in hydrogenase uptake positive strains of *Rhizobium leguminosarum*. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 62:45-50, 1984.
- VAN BERKUM, P. Expression of uptake hydrogenase and hydrogen oxidation during heterotrophic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Bacteriology, New York, 169(10):4565-9, 1987.
- VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 56:3835-41, 1990.
- VAN BERKUM, P. & MAIER, R.J. Lack of carbon substrate repression of uptake hydrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum* SR. Journal of Bacteriology, New York, 170(4):1962-4, 1988.
- VINCENT, J.M. Manual of the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell, 1970, 163p. (International biology program, 15).
- VOGELS, G.D. & VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glioxilate derivatives. Analytical Biochemistry, New York, 33:143-7, 1970.
- WALLSGROVE, R.M.; TURNER, J.C.; HALL, N.P.; KENDALL, A.C.; BRIGHT, S.W.J. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase - biochemical and genetics analysis. Plant Physiology, Rockville, 83:155-8, 1987.
- WINKLER, R.G.; BLEVINS, D.G.; POLACCO, J.C.; RANDALL, D.D. Ureide catabolism of soybean: II. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. Plant Physiology, Rockville, 83:585-91, 1987.

- WINKLER, R.G.; BLEVINS, D.G.; POLACCO, J.C.; RANDALL, D.D. Ureide catabolism in nitrogen-fixing legume. Trends Biochemical Science, Amsterdam, 13:97-100, 1988.
- YONEYAMA, T.; KARASUYAMA, M.; KOUCHI, H.; ISHIZUKA, J. Occurrence of ureide accumulation in soybean plants. Effect of nitrogen fertilization and N₂ fixation. Soil Science of Plant Nutrition, Tokyo, 31(1):133-40, 1985.

Apêndice 1. Composição da solução nutritiva utilizada para cultivo das plantas e das soluções-estoque utilizadas no seu preparo.

SOLUÇÃO ESTOQUE		ESTOQUE/ SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO FINAL DA SOLUÇÃO	
Composição	Concentração (M)	ml/l	Nutriente	Concentração
				mM
1) K_2SO_4	0,5	4,0	K	6,0
2) K_2HPO_4	1,0	1,0	P	1,0
3) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,0	3,0	Ca	3,0
4) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0	1,0	S	3,1
5) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	1,0	Mg	1,0
Na_2EDTA	0,08		Fe	0,1
6) H_3BO_3	0,04	1,0	Cl	6,0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,009			μM
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0003			
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0007		Co	4
H_2MoO_4	0,0001		B	40
7) $CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,004	1,0	Mn	9
			Cu	0,3
			Zn	0,7
			Mo	0,1

APÊNDICE 2. Variação diária da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no interior da casa de vegetação, durante o período de experimentação.

ÉPOCA (DAE)	Temperaturas		ÉPOCA (DAE)	Temperaturas	
	máxima	mínima		máxima	mínima
14	35	13	42	32	11
15	37	18	43	31	10
16	33	16	44	33	10
17	33	14	45	35	13
18	35	13	46	34	14
19	36	15	47	35	14
20	36	14	48	35	14
21	34	18	49	34	14
22	37	18	50	33	14
23	34	18	51	34	14
24	31	18	52	28	16
25	33	17	53	31	17
26	34	18	54	35	15
27	36	16	55	36	15
28	34	16	56	33	15
29	36	16	57	31	17
30	37	16	58	32	16
31	37	19	59	34	15
32	37	18	60	33	15
33	38	17	61	17	14
34	32	18	62	18	12
35	33	18	63	37	12
36	32	17	64	33	13
37	32	11	65	36	13
38	31	11	66	35	13
39	32	10	67	34	13
40	33	12	68	35	14
41	31	10	69	35	13

Apêndice 3. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis liberação de hidrogênio, ARA, ARA específica e ER nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48DAE	55DAE	62DAE	69DAE
LH ₂	SEMIA-587	0,30aAB	0,05aB	0,33aA	0,46aA
	SR	0,12aA	0,10aA	0,17aA	0,14bA
ARA	SEMIA-587	3,59aA	8,68aA	10,70aA	21,15aB
	SR	2,85aA	10,32aB	12,21aB	14,93bB
ARA esp.	SEMIA-587	12,67aA	20,15aA	23,13aA	21,10aA
	SR	10,33aA	29,05aB	24,08aB	21,01aAB
ER	SEMIA-587	0,89aA	0,99aB	0,96aAB	0,97aB
	SR	0,94aA	0,98aA	0,98aA	0,98aA

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

LH₂ = liberação de hidrogênio ($\mu\text{mol H}_2/\text{planta} \cdot \text{hora}$)

ARA = atividade de redução de acetileno ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{planta} \cdot \text{hora}$)

ARA esp. = atividade específica de redução de acetileno
($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g nódulo} \cdot \text{hora}$)

ER = eficiência relativa [$1 - (\text{H}_2 \text{ liberado} / \text{acetileno reduzido})$]

Apêndice 4. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis liberação de hidrogênio, ARA, ARA específica e ER nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
LH ₂	SEMIA-587	0,05aA	0,05aA	0,05aA	0,08aA
	SR	0,01aA	0,06aA	0,05aA	0,05aA
ARA	SEMIA-587	10,47aA	5,40aA	31,51aB	28,01aB
	SR	11,50aA	6,93aA	28,73aB	30,12aB
ARA esp.	SEMIA-587	22,08aA	8,00aB	34,56aA	23,70aA
	SR	31,79bA	15,09aB	29,72aA	24,18aAB
ER	SEMIA-587	0,99aA	0,99aA	0,99aA	0,99aA
	SR	0,99aA	0,99aA	0,99aA	0,99aA

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

LH₂ = liberação de hidrogênio ($\mu\text{mol H}_2/\text{planta} \cdot \text{hora}$)

ARA = atividade de redução de acetileno ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{planta} \cdot \text{hora}$)

ARA esp. = atividade específica de redução de acetileno
($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{g nódulo} \cdot \text{hora}$)

ER = eficiência relativa [$1 - (\text{H}_2 \text{ liberado} / \text{acetileno reduzido})$]

Apêndice 5. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável eficiência nodular nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
EN	SEMIA-587	28,91aA	32,52aA	54,64aA	54,35aA
	SR	37,30aA	37,21aA	65,06aB	60,62aAB

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

EN = Eficiência nodular (mg nitrogênio na planta/ g nódulo)

Apêndice 6. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável eficiência nodular nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
EN	SEMIA-587	75,84aA	83,30aA	102,66aA	106,98aA
	SR	85,77aA	160,92bA	109,59aA	122,57aA

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

EN = Eficiência nodular (mg nitrogênio na planta/ g nódulo)

Apêndice 7. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis peso e número de nódulos nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
PN	SEMIA-587	0,28aA	0,44aA	0,46aA	1,01aB
	SR	0,27aA	0,36aA	0,50aAB	0,72bB
NN	SEMIA-587	54aA	91aAB	89aAB	117aB
	SR	57aA	69aAB	101aBC	111aC

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

PN = peso de nódulos (g)

NN = número de nódulos

Apêndice 8. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis peso e número de nódulos nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
PN	SEMIA-587	0,50aA	0,75aAB	0,90aB	1,19aC
	SR	0,37aA	0,52bA	0,97aB	1,25aB
NN	SEMIA-587	95aA	116aAB	149aB	138aAB
	SR	83aA	97aA	147aB	154aB

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

PN = peso de nódulos (g)

NN = número de nódulos

Apêndice 9. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável concentração proteínas solúveis em nódulos nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
PSN	SEMIA-587	67,76aA	57,61aAB	41,65aB	38,80aB
	SR	66,19aA	47,53aAB	43,82aB	40,88aB

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

PSN = proteínas solúveis em nódulos

Apêndice 10. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável concentração proteínas solúveis em nódulos nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
PSN	SEMIA-587	51,31aA	40,78aA	41,99aA	45,93aA
	SR	62,24aA	52,92aA	42,60aA	46,14aA

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

PSN = proteínas solúveis em nódulos

Apêndice 11. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável acúmulo de fitomassa nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
PMS	SEMIA-587	0,46aA	0,70aA	1,14aB	2,08aC
	SR	0,43aA	0,81aA	1,31aB	1,96aC

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

PMS = peso de matéria seca na parte aérea

Apêndice 12. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável acúmulo de fitomassa nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
PMS	SEMIA-587	1,49aA	2,33aA	3,55aB	5,06aC
	SR	1,36aA	2,52aB	3,75aC	5,90bD

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

PMS = peso de matéria seca na parte aérea

Apêndice 13. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis porcentagem e conteúdo de nitrogênio na parte aérea nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
% N	SEMIA-587	2,49aA	2,64aA	2,83aA	3,01aA
	SR	3,17aA	2,28aA	3,19aA	2,70aA
CN	SEMIA-587	8,01aA	11,89aAB	25,03aB	53,18aC
	SR	9,86aA	13,68aA	32,99aB	43,52aB

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

% N = porcentagem de nitrogênio na parte aérea

CN = conteúdo de nitrogênio na parte aérea (mg nitrogênio/ planta)

Apêndice 14. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis porcentagem e conteúdo de nitrogênio na parte aérea nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
% N	SEMIA-587	2,79aA	3,14aA	2,93aA	2,83aA
	SR	2,84aA	3,25aA	3,25aA	2,93aA
CN	SEMIA-587	35,37aA	63,37aA	93,07aB	127,20aC
	SR	30,86aA	71,35aB	106,56aC	151,75bD

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

% N = porcentagem de nitrogênio na parte aérea

CN = conteúdo de nitrogênio na parte aérea (mg nitrogênio/ planta)

Apêndice 15. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis atividade de GS e atividade específica de GS nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
GS	SEMIA-587	21,57aA	23,84aA	25,36aA	30,00aA
	SR	13,99aA	17,40aAB	27,42aBC	29,30aC
GS esp.	SEMIA-587	0,33aA	0,47aAB	0,62aAB	0,77aB
	SR	0,23aA	0,36aAB	0,64aBC	0,63aC

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

GS = atividade de glutamina sintetase

(mmol γ -glutamilhidroxamato/g nódulo . hora)

GS esp. = atividade específica de glutamina sintetase

(mmol γ -glutamilhidroxamato/mg proteína . hora)

Apêndice 16. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições das variáveis atividade de GS e atividade específica de GS nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
GS	SEMIA-587	21,85aA	23,30aA	23,21aA	25,50aA
	SR	24,24aA	24,44aA	28,48aA	30,36aA
GS esp.	SEMIA-587	0,44aA	0,57aA	0,55aA	0,55aA
	SR	0,43aA	0,53aA	0,66aA	0,66aA

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

GS = atividade de glutamina sintetase

(mmol γ -glutamilhdroxamato/g nódulo . hora)

GS esp. = atividade específica de glutamina sintetase

(mmol γ -glutamilhdroxamato/mg proteína . hora)

Apêndice 17. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável atividade da alantoinase nas simbioses caupi x SEMIA-587 e caupi x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
AAL	SEMIA-587	27,14aA	21,35aA	23,68aA	44,68aB
	SR	28,90aA	18,65aB	17,37aB	34,28bA

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

AAL = atividade da alantoinase

(nmol alantoína/g matéria fresca folhas. hora)

Apêndice 18. Teste de Tukey para comparação de médias de 4 repetições da variável atividade da alantoinase nas simbioses soja x SEMIA-587 e soja x SR, durante o período experimental.

VARIÁVEL	ESTIRPE	ÉPOCA			
		48 DAE	55 DAE	62 DAE	69 DAE
AAL	SEMIA-587	14,06aAB	10,27aAB	9,78aA	15,83aB
	SR	17,67aA	11,24aB	10,79aB	14,66aAB

- médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

AAL = atividade da alantoinase

(nmol alantoína/g matéria fresca folhas. hora)