

FERNANDA LOPES DE MACEDO

**Estimativa da fixação de N<sub>2</sub> através da  
composição da seiva do xilema e técnicas de  
diluição de <sup>15</sup>N em *Anadenanthera falcata*  
(Benth.) Speg. (Leguminosae – Mimosoideae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDA LOPES DE MACEDO

**Estimativa da fixação de N<sub>2</sub> através da  
composição da seiva do xilema e técnicas de  
diluição de <sup>15</sup>N em *Anadenanthera falcata*  
(Benth.) Speg. (Leguminosae – Mimosoideae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica  
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de  
MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL  
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração  
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. MARCOS PEREIRA MARINHO AIDAR

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Macedo, Fernanda Lopes de

M141e Estimativa da fixação de N<sub>2</sub> através da composição da seiva do xilema e técnicas de diluição de <sup>15</sup>N em *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae - Mimosoideae / Fernanda Lopes de Macedo -- São Paulo, 2010.  
57 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2010

Bibliografia.

1. Mimosoideae. 2. Nitrogênio. 3. xilema . I. Título

CDU: 582.737

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

*Martin Luther King*

## Agradecimentos

À Deus por me fazer ir além do que imaginava e do que poderia, por ser tudo em minha vida.

Aos meus pais, Osmar e Vera, e meus irmãos Leonardo e Gabriela pelo apoio e pela compreensão em todos os momentos.

Ao Dr. Marcos Aidar pela compreensão, confiança, incentivo e por todo o conhecimento transmitido.

Ao professor Dr. Ladaslav Sodek pela colaboração e atenção oferecida, e ao seu aluno Gilberto pelo auxílio e pela paciência em ensinar.

À professora Dr. Heloisa Barbosa, seus alunos Roberta, Carolina e Felipe, e a Iris pelo apoio no ensaio da nitrogenase.

Ao Dr. Marco Tiné pela colaboração durante toda a realização deste trabalho, principalmente pela ajuda no laboratório.

Às minhas amigas de todas as horas Fabiana, Lilian, Alê Defácio e Tati, amo vocês.

Às amigas de longe, mas não menos importantes, Eliane e Paulinha.

À Marina Martins, sempre atenciosa, companheira e amiga, que nunca deixou de me ajudar mesmo estando tão longe.

À Kelly, Fê K e Vanessa, pelas risadas e pela amizade sincera.

À Amanda Asega, Amanda Top, Patrícia Pinho e Marina Campos, que apesar da correria do dia-a-dia, sempre estão presentes na minha vida.

À Janaína pela ajuda nas coletas e no laboratório.

À Sabrina e Luana pelo auxílio na coleta de campo em Santa Rita do Passa quatro.

Aos amigos Jeferson, Willon e Germano pelo apoio e pelos momentos de descontração, principalmente no término deste trabalho.

À Ana Paula, Bárbara, César, Cynthia, Daiane, Fabinho, João, Jú Iura, Jú Zerlin, Ludmila, Marina, Rodrigo Cabral, Rodrigo Cáccere, Vanessa Costa por tornarem o dia-a-dia do laboratório tão agradável e animado.

À Mary, Ana Alice e Cida pela atenção e auxílio.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho (processo 07/56939-2).

Ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica pela oportunidade e formação acadêmica.

À todos aqueles, que não aparecem aqui, mas não menos importantes, que ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho.

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio	01
1.2. Estimativa da Fixação Biológica de Nitrogênio	03
1.3. Cerrado e a espécie <i>Anadenanthera falcata</i> (Benth.) Speg	04
1.4. Justificativa	06
<b>2. OBJETIVOS</b>	08
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	09
3.1. Diferentes fontes de N em plantas jovens <i>Anadenanthera falcata</i>	09
3.1.1. Obtenção de plântulas	09
3.1.2. Análise de crescimento	10
3.1.3. Análise <i>in vivo</i> da enzima Nitrogenase	11
3.1.4. Coleta de seiva	11
3.1.5. Análise de aminoácidos em HPAEC/PAD	11
3.1.6. Aminoácidos Totais Livres	13
3.1.7. Quantificação de ureídeos (ácido alantóico e alantoína)	13
3.1.8. Razão isotópica do N estável e determinação da razão C/N	13
3.2. Composição da seiva em indivíduos adultos de <i>Anadenanthera falcata</i>	14
3.2.1. Quantificação de nitrato	14
3.3. Razão isotópica do N estável e determinação da razão C/N em indivíduos adultos de <i>Anadenanthera falcata</i>	14
3.4. <sup>15</sup> N em aminoácidos da seiva do xilema em plantas de <i>Anadenanthera falcata</i>	15
3.4.1. Extração de aminoácidos em nódulos radiculares	15
3.4.2. Análise de aminoácidos em GC-MS	16
3.5. Análise dos dados	17

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	18
4.1. Experimento com diferentes fontes de N	18
4.2. Caracterização da seiva de plantas adultas de <i>Anadenanthera falcata</i>	32
4.3. Razão isotópica do N estável e determinação da razão C/N em indivíduos adultos de <i>Anadenanthera falcata</i>	37
4.4. Experimento controlado com plantas fixadoras e $^{15}\text{N}_2$	38
<b>5. CONCLUSÃO</b>	40
<b>RESUMO</b>	41
<b>ABSTRACT</b>	42
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	43

## 1. Introdução

O nitrogênio (N) é um dos principais bioelementos, essencial para a estrutura e função de proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos e muitas outras moléculas vegetais (Werner & Schmidt 2002). Desta forma ele é considerado um dos fatores mais limitantes que influencia na dinâmica, biodiversidade e funcionamento de muitos ecossistemas (Vitousek *et al.* 1997).

Na Biosfera o N está disponível para as plantas em diferentes formas: nitrogênio molecular  $N_2$ , óxidos de nitrogênio ( $NH_3$ ,  $NO_x$ ), nitrogênio mineral ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ) e nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) (Wirén *et al.* 1997). O significado ecológico da assimilação de N orgânico para a nutrição da planta, ainda é matéria de discussão, mas várias evidências sugerem que plantas crescendo em vários ecossistemas podem utilizar principalmente o N orgânico, já que em alguns solos a concentração disponível de aminoácidos pode ser similar ou até mais elevada, em relação as outras formas de N inorgânico, principalmente quando é resultado de uma rápida hidrólise das proteínas do solo (Näsholm *et al.* 2009). Trabalhos recentes descrevem as proteínas também como uma importante fonte de N para as plantas. Paungfoo-Lonhienne *et al.* (2008) relatam o uso da proteína no solo como fonte de N em duas espécies vegetais, sem a assistência de nenhum outro organismo, através do processo de endocitose (a planta engloba a proteína intacta) ou através da hidrólise das proteínas no solo por meio da liberação de enzimas proteolíticas pela raiz da planta.

### 1.1. Fixação Biológica de Nitrogênio

Na atmosfera o dinitrogênio ( $N_2$ ) é o gás mais abundante (Halbleib & Ludden 2000), mas apesar de quase 80% da atmosfera ser composta de N, ele não pode ser utilizado diretamente pelas plantas (Crews 1999). Somente um limitado número de bactérias e Archaea evoluíram a capacidade de converter  $N_2$  em nitrogênio reativo (Galloway *et al.* 2004). Estes organismos desenvolveram mecanismos bioquímicos para reduzir o  $N_2$  a amônia utilizando esqueletos carbônicos, através do complexo da enzima nitrogenase (Halbleib & Ludden 2000). Todos os organismos usam o amônio ( $NH_4^+$ ) para produzirem aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, e outros componentes que contêm N necessários para a vida (Lindemann & Glover 2003).

Segundo Zilli (2008) o “início dos estudos sobre fixação biológica do nitrogênio (FBN) foi no século XIX, quando Beijerinck observou a formação de nódulos em raízes de plantas de ervilha. Posteriormente, constatou-se que estes nódulos eram colonizados por

bactérias e que nessas estruturas se estabelecia uma simbiose, onde supostamente a planta fornecia açúcares para a bactéria e a bactéria fixava o nitrogênio atmosférico e o disponibilizava à planta. Na época, estas bactérias receberam o nome de *Bacillus radícola*, sendo alguns anos depois agrupadas no gênero *Rhizobium*, o que permaneceu até o início dos anos 80 do século passado”. Atualmente, sabe-se que os nódulos radiculares de legumes são produto da simbiose envolvendo bactérias fixadoras dos gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, coletivamente chamados de rizóbio (Vance 2002).

Estes organismos são capazes de fixar o N<sub>2</sub>, pois possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, capaz de reduzir o N<sub>2</sub> a duas moléculas de amônia (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) (Hoffman *et al.* 2009). Segundo Nunes *et al.* (2003) a nitrogenase catalisa a redução do N<sub>2</sub> conforme descrito na equação 1:



O amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) é o primeiro composto estável da fixação biológica do N nos nódulos, sendo excretado pelos bacterioides no citoplasma da célula hospedeira, onde é assimilado e utilizado na síntese de compostos orgânicos nitrogenados (Schubert 1986).

A amônia então deve ser imediatamente incorporada em compostos orgânicos por ser tóxica as plantas. Esta reação é mediada pela enzima GS (glutamina sintetase) que une um glutamato (GLU) com o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para formação do aminoácido glutamina (GLN). Após a formação da GLN ela pode ser utilizada, juntamente com uma molécula de 2-oxoglutarato, para produção de duas moléculas de glutamato, reação esta catalisada pela enzima GOGAT (amidatransferase de glutamina 2-oxoglutarato) (Sodek 2004). A GLN formada após a reação da GS pode seguir via GOGAT, pode ser transportada pela planta ou ainda pode ser transformada em asparagina (ASN) por ação da enzima asparagina sintetase (Taiz & Zeiger 2004). Esta enzima transfere o grupo amina da GLN para o aspartato (ASP), formando ASN e GLU (Lea *et al.* 2006) e é encontrada em folhas, raízes e nódulos radiculares. A ASN é uma molécula estável com alta razão N/C (Taiz & Zeiger 2004) e tem papel central na reserva e no transporte de N nas plantas, facilitado pelas suas propriedades químicas (Lea *et al.* 2006).

A FBN é um dos processos biológicos mais importantes da Terra (Graham 2008). É a mais significativa rota para introdução do N da atmosfera nos ecossistemas. Um dos mais importantes locais de ocorrência da FBN é em nódulos formados em raízes de leguminosas como resultado da simbiose entre a planta hospedeira e bactérias do gênero *Rhizobium* (Vitousek *et al.* 1997). O nódulo de leguminosa é considerado um órgão primário da

assimilação do N, comparável a atividade metabólica da folha, órgão primário na assimilação de carbono (C) (Walsh 1995). As leguminosas evoluíram aproximadamente 60 milhões de anos atrás e a nodulação 58 milhões de anos atrás. A capacidade de nodular não ocorre em muitos membros da família Caesalpinioideae com números menores em Mimosoideae e Papilionoideae (Sprent 2007). Em geral, leguminosas tropicais são capazes de formar nódulos com uma ampla faixa de rizóbios, o que contribui significativamente para o aumento da atividade da fixação biológica de nitrogênio (Santos *et al.* 2007).

A principal fonte de N em ecossistemas savânicos provém da FBN, pois normalmente os solos são pobres e lixiviados e as formas de N inorgânicas e orgânicas estão pouco disponíveis (Schmidt & Lamblea 2005). Diversos estudos envolvendo a FBN vêm sendo realizados com espécies economicamente importantes em solos de cerrado, como a soja, amendoim, alfafa e espécies forrageiras, no sentido de maximizar a eficiência do uso de N em sistemas agrícolas (Bredemeier & Mundstock 2000). Porém são poucos os estudos encontrados com espécies nativas. Há falta de informações precisas sobre a nodulação em leguminosas arbóreas tropicais, independentemente da formação vegetacional onde são encontradas (Cordeiro 2002).

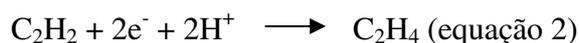
## **1.2. Estimativa da Fixação Biológica de Nitrogênio**

Uma das técnicas utilizadas para quantificação da FBN em plantas é a abundância natural do  $^{15}\text{N}$ , que consiste em explorar diferenças na ocorrência natural desse isótopo estável entre fontes disponíveis de N no solo e o  $\text{N}_2$  da atmosfera (Boddey *et al.* 2000). No entanto, Gerhring (2003) afirma que esta técnica é mais eficiente em condições homogêneas, pois os caminhos de transformação de N afetam o sinal de  $^{15}\text{N}$  de maneira diferente, resultando em variações complexas do  $^{15}\text{N}$ , variações temporal e espacial complexas do  $^{15}\text{N}$  e nas diferentes formas de N da vegetação e do solo. Devido a estes fatos torna-se necessário o estudo de alternativas metodológicas para a quantificação da FBN, especialmente em condições naturais.

Outra técnica utilizada é a caracterização da composição da seiva do xilema, para determinação de possíveis compostos característicos da entrada de N oriundo da fixação biológica. Plantas fixadoras de N podem ser classificadas como exportadoras de amidas ou de ureídeos, baseado na composição da seiva do xilema, sendo as amidas mais comumente encontradas asparagina (ASN) e glutamina (GLN), e entre os ureídeos, o ácido alantóico (ALC), alantoína (ALN) e a citrulina (CIT) (Schubert 1986). Os diferentes compostos nitrogenados transportados via xilema para a parte aérea da planta podem refletir importantes

mudanças no metabolismo de N na raiz (Amarante *et al.* 2006). Também há trabalhos que apontam que a presença de ureídeos transportados na seiva do xilema, pode ser indicativa da presença ou não da fixação biológica. McClure *et al.* (1980) observaram que o transporte de N na forma de ureídeos na seiva do xilema de plantas de soja está intimamente ligado com a existência de fixação biológica. A presença de ureídeos é dependente da espécie da planta e não do genótipo do rizóbio (Tajima *et al.* 2004). Os ureídeos são formados a partir da oxidação das bases purinas, xantinas e hipoxantinas, derivadas da síntese “*de novo*” dos nucleotídeos purínicos (Atkins *et al.* 1980b) Uma molécula de ureídeo contém 4 átomos de N, ou seja, a razão N/C é alta como nas amidas, porém a solubilidade destes compostos é menor em relação as amidas (Layzell *et al.* 1979).

A redução do acetileno é outra técnica utilizada para verificar se uma espécie está fixando N biologicamente. Este método é baseado no princípio de que a nitrogenase não somente catalisa a redução do N<sub>2</sub> a amônio, como também a redução do acetileno a etileno (Hardy *et al.* 1968). A redução do acetileno a etileno é descrita na equação 2 (Kästner & Blöchl 2005):



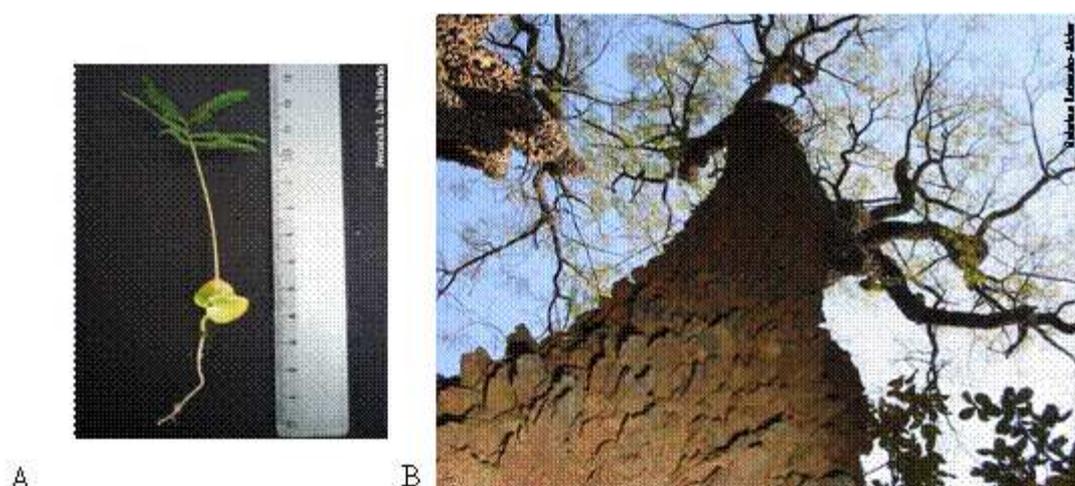
Deste modo, nódulos radiculares podem ser incubados em acetileno e o etileno produzido quantificado através de cromatografia gasosa. Esta técnica é sensível, rápida e simples (Vance 2002), porém de difícil aplicação em sistemas naturais (Vitousek *et al.* 2002). Além disso, distúrbios físicos, inevitáveis durante a realização do ensaio, e a presença do C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> podem reduzir a atividade da nitrogenase (Herridge *et al.* 2008).

### 1.3. Cerrado e a espécie *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg

Alguns estudos vêm sendo realizados com espécies nativas do cerrado e entre eles é possível encontrar trabalhos sobre o desenvolvimento de nódulos em raízes de Leguminosas como a espécie *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae – Mimosoideae). O angico do cerrado (figura 1 A e B), como é popularmente conhecido, é uma espécie de ampla dispersão no cerrado brasileiro, que apresenta nodulação em suas raízes (Cordeiro & Beltrati 1989). As leguminosas possuem o mecanismo simbiótico mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas superiores com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (Döbereiner 1990), característica que confere à família Leguminosae extrema importância, não só na estrutura da vegetação dos cerrados, como também na de florestas e matas, sendo a preservação desta fundamental para a dinâmica populacional destas comunidades (Fidelis & Godoy 2003).

Estudos florísticos-fitosociológicos mostram que a família Leguminosae, especialmente a espécie *A. falcata* é dominante na gleba Pé-de-Gigante (figura 2), Parque Estadual do Vassununga, Santa Rita do Passa Quatro, SP, com 1212,92 ha e altitude de 590 - 740m. Esta área é um dos maiores remanescentes do cerrado no estado de São Paulo (Fidelis & Godoy 2003, Ribeiro 2007), Bioma que ocupa mais de 2 milhões de Km<sup>2</sup> do país, possuindo a “mais rica flora entre as savanas do mundo, com alto grau de endemismo” (Klink e Machado 2005).

O Cerrado apresenta uma “ampla extensão e heterogeneidade de ecossistemas, abrigoando uma enorme biodiversidade, que representa em torno de 5% da biodiversidade do Planeta. A região de domínio do Bioma cerrado compreende uma extensa área contínua nos Estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso e algumas penínsulas e áreas disjuntas que se estendem por outros estados (Eiten 1972). Ao lado da biodiversidade, o Bioma caracteriza-se como uma grande caixa d’água no continente sul-americano, captando águas pluviais que abastecem nascentes que formam rios das bacias do Amazonas, Tocantins, Parnaíba, São Francisco, Paraná e Paraguai, dada a sua localização na cumeeira do continente. Também pelos imensos aquíferos encontrados, entre eles o Aquífero Guarani, o Cerrado é fundamental para a manutenção do equilíbrio hidrológico no país” (GTBC 2004).



**Figura 1.** *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. **A.** plântula 8 dias após a germinação. **B.** indivíduo adulto em campo.

Em solos de cerrado, normalmente pobres em nutrientes como o N, a habilidade em fixar este elemento pode ser muito importante. A presença de bactérias simbióticas (rizóbio), localizada em células dos nódulos radiculares, pode contribuir para nutrição da planta hospedeira pela fixação atmosférica de N e assim ajudar na sobrevivência da espécie na savana (Gross *et al.* 2002).



**Figura 2.** Foto aérea (escala 1: 40.000) da gleba Pé-de-Gigante, mostrando a depressão em formato de pegada. Parque Estadual do Vassununga, município de Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo, Brasil.

#### 1.4. Justificativa

Do ponto de vista ecológico a FBN é considerada um processo de adaptação a situações de desequilíbrio, sendo que as espécies de leguminosas típicas do cerrado podem desempenhar papel preponderante no restabelecimento desse ecossistema, especialmente no Estado de São Paulo, onde poucas áreas com esse tipo de vegetação ainda estão preservadas (Cordeiro 2002). Além disso, a diversidade nas estratégias de uso do N tem sido interpretada como característica crucial para a manutenção da diversidade em ambientes com stress nutricional e hídrico como no cerrado (Bustamante *et al.*, 2004). O estudo da FBN no cerrado torna-se ainda mais necessário pelo fato deste bioma ser a maior, mais rica e mais ameaçada savana neotropical do planeta (Silva & Bates, 2002), sendo considerado um dos 34 pontos com prioridade de conservação do planeta – os chamados *Hotspots* (Myers *et al.* 2000 e Mittermeier *et al.* 2005).

As razões para a falta de informações precisas sobre a nodulação em leguminosas arbóreas tropicais, independentemente da formação vegetacional onde são encontradas, incluem desde as dificuldades de localização de nódulos em espécimes adultos até a aparente falta de nódulos em florestas em equilíbrio (Cordeiro 2002). A FBN é considerada a principal entrada de “novo” N no cerrado, mas estudos indicam que esta não aparenta ser uma estratégia amplamente utilizada em florestas tropicais, quando avaliada através da assinatura isotópica das espécies vegetais. Entretanto Kreibich *et al.* (2006) indicam que a proporção de N derivado da atmosfera pode atingir até 66% do total do N presente em espécies da floresta

de várzea na Amazônia. No cerrado a presença de espécies da família das leguminosas é notável, entretanto pouco é conhecido sobre seu potencial de fixação simbiótica, apesar da capacidade de fixar N biologicamente nos trópicos ser considerável. Os dados sobre as leguminosas do Brasil, abordando aspectos ecofisiológicos da associação, disponíveis na literatura, são baseados especialmente em leguminosas herbáceas ou arbustivas de interesse agrônomo ou, nos casos de espécies arbóreas, em experimentos desenvolvidos em casas de vegetação, sementeiras ou observações em mudas (Cordeiro 2002).

Outra informação importante é em relação ao aumento da deposição atmosférica de N. Este processo é conhecido por reduzir a diversidade natural de plantas em ecossistemas naturais e semi-naturais. Pelo menos 17 *hotspots* podem ter de 10 a 100 % de suas áreas recebendo mais que 15 Kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N, uma taxa considerada excessivamente crítica para muitos ecossistemas sensíveis europeus. Esta elevada deposição em áreas de alta diversidade vegetal e endemismo pode acarretar grandes alterações na diversidade florística mundial. No cerrado há estimativa de que 68,7% da área receberão N em quantidades maiores que 10 Kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> e 17,2 % receberão quantidades maiores que 15 Kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N em 2050 (Phoenix *et al.* 2006). Galloway *et al.* (2008) chamam atenção ainda para o caso das plantas fixadoras em relação à deposição de N. Segundo os autores, há poucos estudos do efeito da deposição de N em ecossistemas tropicais e a maioria das espécies terrestres fixadoras de N ocorrem nessas regiões, podendo a resposta destas ao aumento de entrada do N ser muito diferente dos ecossistemas temperados.

É urgente a obtenção de mais informação sobre a relação entre o suprimento de N, associações microbianas, mecanismos fisiológicos e ecológicos que regulam o crescimento da planta e a composição de espécies das comunidades vegetais, sendo o armazenamento, a capacidade de assimilação e o transporte, considerados características fundamentais para um melhor entendimento dos processos de utilização de N em plantas. Este conhecimento deverá auxiliar também na maior compreensão sobre a funcionalidade do ciclo de N no ecossistema em estudo.

## 2. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo estimar o potencial de fixação biológica de nitrogênio em plantas jovens e adultas de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae – Mimosoideae), espécie dominante na gleba Pé-de-Gigante, Parque Estadual do Vassununga, SP.

Os objetivos específicos são:

- a. caracterização do padrão de transporte de aminoácidos na seiva do xilema de plântulas submetidas a diferentes fontes de N;
- b. caracterização do transporte de aminoácidos na seiva do xilema em plantas jovens e adultas em campo;
- c. Identificar aminoácidos enriquecidos com  $^{15}\text{N}$ .

Esta pesquisa é parte integrante do Projeto Temático Biota/FAPESP “Interação Biosfera-Atmosfera Fase 2: Cerrados e Mudanças de Uso da Terra” (Processo no. 02/09289-9, coordenação Dr. Humberto R. da Rocha IAG/USP) que tem como principal objetivo a quantificação de longo prazo da dinâmica dos fluxos de água, energia e  $\text{CO}_2$  em Biomas de Cerrado no sudeste e centro do Brasil, e sobre os agroecossistemas de Cana-de-açúcar e Eucalipto.

Os estudos dos fluxos de carbono em ecossistemas terrestres têm sido raramente acompanhados de abordagens ecofisiológicas de modo a explorar a relação funcional das espécies que compõem o ecossistema e os valores líquidos obtidos para o mesmo. Segundo Buchmann (2002), apenas 14% de todos os estudos de fluxo de vórtices turbulentos em florestas incluem avaliações ecofisiológicas das plantas ou estimativas de biomassa. Desse modo, a combinação de estudos micrometeorológicos e ecofisiológicos é fortemente recomendada para uma melhor compreensão das dinâmicas dos fluxos associados ao funcionamento do ecossistema em estudo. É importante ressaltar que o N é um fator fundamental na determinação da produtividade do ecossistema.

### 3. Material e Métodos

Neste trabalho foi adotada para a espécie estudada a nomenclatura indicada pelo Professor Jorge Tamashiro do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, UNICAMP, *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg sinonímia de *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* (Benth.) Altschul.

#### 3.1. Diferentes fontes de N em plantas jovens de *Anadenanthera falcata*

##### 3.1.1. Obtenção de plântulas

Sementes de *Anadenanthera falcata* foram coletadas na Gleba Pé-de-Gigante (Parque Estadual do Vassununga) em agosto de 2008. As sementes foram retiradas dos frutos manualmente, imersas em solução de hipoclorito de sódio 5 % durante 5 minutos e então lavadas em água corrente abundantemente. A germinação foi realizada em bandejas com vermiculita, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas em câmaras de germinação do tipo B.O.D. Plântulas com protusão da radícula maior que 1 cm foram transferidas para vasos de 5 litros, contendo apenas vermiculita e mantidas em casa de vegetação, sendo regadas diariamente e recebendo nutrição nutritiva semanalmente (200 mL por vaso) com N na concentração de 0,5 mM.

Ao atingirem 60 dias, as plantas foram inoculadas com estirpes de *Rhizobium sp* IBRC-101 provenientes do Banco de Rizóbios da Unesp de Rio Claro, cedidas pela Dra. Marlene Schiavinato, do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas. A inoculação consistiu em adicionar 1 mL do meio de cultura líquido contendo rizóbios no substrato em volta de cada planta. Após 7 dias foi realizada uma nova inoculação. Durante este período de inoculação (15 dias) as plantas receberam solução nutritiva sem adição de N.

Após 15 dias da inoculação as plantas foram divididas nos seguintes tratamentos, cada um com n=100: a) plantas sem inoculação com fonte de N na solução nutritiva (Sem Nod); b) plantas inoculadas com adição de N na solução nutritiva (Nod +N); c) plantas inoculadas sem adição de N na solução nutritiva (Nod -N). A forma de N adicionada a solução nutritiva foi o amônio (sulfato de amônio) estabelecido com base nos resultados obtidos por Macedo (2007), que demonstraram que esta espécie se desenvolve melhor quando nutrida com N inorgânico na forma de amônio.

A solução nutritiva fornecida às plantas foi utilizada com base na solução usada por Camargos (2007):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (6 mM);  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2 mM);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2mM);  $\text{H}_3\text{BO}_3$

(0,46 mM);  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,091 mM);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (7,65  $\mu\text{M}$ );  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3,20  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,56  $\mu\text{M}$ ) e Fe-EDTA [ $\text{Na}_2$ -EDTA (89,2  $\mu\text{M}$ );  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (89,92  $\mu\text{M}$ ) e NaOH (91,25  $\mu\text{M}$ )]. Para solução com N foi adicionado 2 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o que equivale a 4 mM de  $\text{NH}_4$ . O pH da solução foi corrigido em torno de 6,0 e 6,5 antes da aplicação.

### 3.1.2. Análise de crescimento

O crescimento das plantas foi analisado em relação a altura, área foliar, número de folhas (0, 30, 60 e 90 dias), massa seca e número de nódulos (30, 60, 90 e 120 dias). A área foliar foi obtida através da medida do comprimento x largura em régua e o valor corrigido pelo fator de correção 0,8001, apresentado por Macedo (2007). Este fator foi obtido através do uso de um digitalizador de imagem (scanjet HP 2400) e programa de integração de imagem (Leaf Area Measurement, version 1.3, [www.shef.ac.uk/~nucpe/](http://www.shef.ac.uk/~nucpe/)).

Neste experimento foi calculada a razão de raiz: parte aérea da planta (R/PA), através da equação 3:

$$\text{R/PA} = \text{mr} / \text{mc} + \text{mf} \text{ (equação 3)}$$

onde, mr é a massa seca da raiz (com nódulos e xilopódio), mc a massa seca do caule e mf a massa seca das folhas.

A análise de crescimento em MS foi realizada através da determinação da Taxa de Crescimento Relativo (TCR), expressa em  $\text{mg} \cdot \text{dia}^{-1}$ , utilizando-se a equação 4:

$$\text{TCR} = (\text{Ln}A_2 - \text{Ln}A_1) / (t_2 - t_1) \text{ (equação 4)}$$

onde,  $A_1$  e  $t_1$  são MS total da planta e dias de tratamento no primeiro intervalo de avaliação, respectivamente, e  $A_2$  e  $t_2$  são MS total da planta e dias de tratamento no segundo intervalo de avaliação, respectivamente. Os valores de A, foram transformados em Ln como recomendado por Hoffmann & Poorter (2002).

Também foi calculada a razão de área foliar (RAF,  $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) que é a quantidade de área foliar por unidade de biomassa da planta. Este índice mostra a relação entre a produção de fotoassimilados (área disponível para a fotossíntese) em relação ao consumo dos mesmos (planta toda) (Marabesi, 2007). A equação 5 é a seguinte:

$$\text{RAF} = \text{AF} / \text{B} \text{ (equação 5)}$$

onde, AF é a área foliar da planta e B a biomassa total da planta (Poorter & Nagel 2000).

### **3.1.3. Análise *in vivo* da enzima Nitrogenase**

A atividade da enzima nitrogenase nos nódulos foi quantificada aos 30, 60, 90 e 120 dias de experimento da seguinte maneira: aos frascos de 500 mL devidamente vedados foram adicionados 10% de acetileno e incubados sem agitação a 25°C por até 2 horas. A produção de etileno foi testada quantitativamente injetando-se 0,5 ml da fase aérea em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14A, com coluna Porapak-N 80/100 - INOX a 70°C, injetor a 180°C e detector a 230°C. Essa análise foi realizada no Laboratório de Fisiologia de Microorganismos (Departamento de Microbiologia da Universidade São Paulo) com auxílio da pesquisadora Dra. Heloiza Ramos Barbosa. A atividade foi expressa em moles de etileno/minuto/grama MS (massa seca) de nódulos.

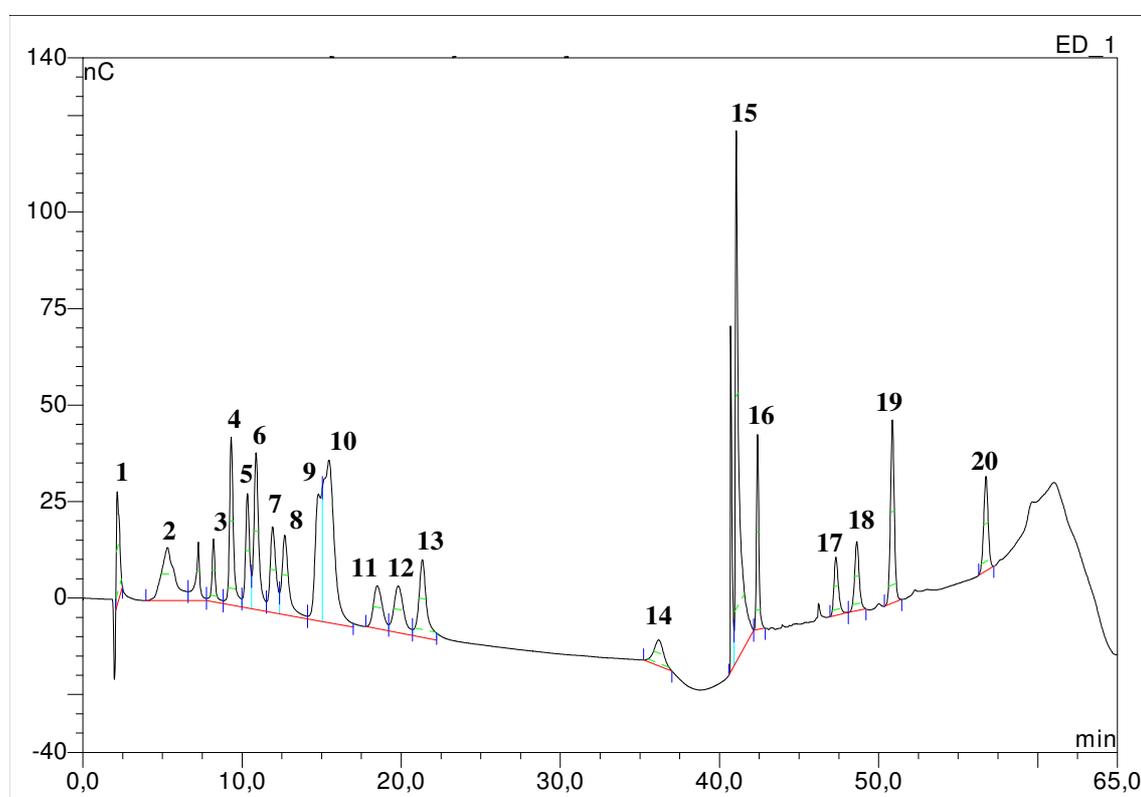
### **3.1.4. Coleta de Seiva**

Coletas de seiva *in vivo* foram realizadas através de uma bomba de pressão (PMS Instrument modelo 1000, Oregon EUA) aos 30, 60, 90 e 120 dias (N=8), com auxílio de uma pipeta, cortando-se as plantas no hipocótilo do caule, (na cicatriz dos cotilédones). As amostras foram acondicionadas em tubos “ependorf” e congeladas a -18 °C para análises posteriores.

### **3.1.5. Análise de aminoácidos em HPAEC/PAD**

Para análise de aminoácidos foi utilizada a metodologia descrita em Bruijn & Bout (2000) com algumas modificações: a 10 µL de seiva foi adicionado 1 µL de HCl 0,1 M e então injetada em coluna contendo resina de troca catiônica AG-50W-X8 (H<sup>+</sup>, 100 - 200 µM, BioRad Laboratories), previamente lavada com água ultra-pura (Milli-Q) e HCl 0,01 M. Após a adição da amostra a resina foi lavada com 300 µL de HCl 0,01 M para exclusão dos carboidratos e ácidos orgânicos. Após este procedimento, a coluna foi lavada para retirada dos aminoácidos com 400 µL de tampão trisodíocitrato 33 mM, contendo 145 mM de NaOH e 200 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (≈ pH 10). Essa fração foi filtrada em filtro de 12 µm e analisada em Cromatografia de Troca Aniônica de Alto Desempenho com detector de pulso amperométrico

(HPAEC/PAD) modelo ICS 3000, em coluna analítica AminoPAC - PA1 com dimensão de 4x 250 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) e coluna guarda AminoPac - PA10 com dimensão de 4 x 50 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Os eluentes utilizados foram: A - água; B - hidróxido de sódio 250 mM; e C - acetato de sódio 1M, com fluxo 0,2 mL/minuto. A eluição aconteceu através de um gradiente entre os eluentes A, B e C da seguinte maneira: 0-28 min. 93-87 % A , 7-13 % B; 29-36 min. 87-67 A, 13 % B, 0-20 % C; 37-49 min. 67-55 % A, 13-15 % B, 20-30 % C; 50-54,8 min. 55-30 % A, 15-25 % B, 30-45 % C; 54,9-55 min. 30-20 % A, 25-80 % B, 45-0 % C; 55-55,1 min. 20-93 % A, 80-7 % B; 55,2 – 60 min. 93 % A, 7 % B. Na figura 3 é apresentado o cromatograma de um padrão de aminoácidos analisado em HPAEC.



**Figura 3.** Perfil de aminoácidos analisados em HPAEC. Os aminoácidos presentes no padrão são: 1. arginina; 2. ornitina e lisina; 3. glutamina; 4. asparagina; 5. alanina; 6. glicina; treonina; 7. valina; 8. hidroxiprolina; 9. serina; 10. prolina; 11. isoleucina; 12. leucina; 13. metionina; 14. alantoína (ureideo); 15. histidina; 16. fenilalanina; 17. glutamato; 18. aspartato; 19. cisteína; 20. tirosina.

### 3.1.6. Aminoácidos totais Livres

A quantificação de aminoácidos totais foi realizada segundo a metodologia descrita em Yemm & Cocking (1955). A 1000  $\mu\text{L}$  da amostra (seiva diluída em  $\text{H}_2\text{O}$ ) foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de tampão citrato 0,02 M, 200  $\mu\text{L}$  de ninhidrina 5 % em metilcelulose e 100  $\mu\text{L}$  de KCN (0,0002 M) em metilcelulose, respectivamente. Os tubos foram agitados, vedados e mantidos em banho a temperatura de 100 °C, durante 20 minutos. Após o resfriamento dos tubos, foi adicionado 1 mL de etanol 60 % e realizada a leitura em 570 nm em espectrofotômetro. Os valores de aminoácidos na seiva foram expressos em  $\mu\text{moles.mL}^{-1}$ .

### 3.1.7. Quantificação de ureídeos (ácido alantóico e alantoína)

O método utilizado para a quantificação de ureídeos (ácido alantóico e alantoína) foi de Vogels & Van Der Drift (1970). Em tubos de ensaio foram colocados 250  $\mu\text{L}$  da amostra, 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 M, 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e foram levados a banho-maria a 100 °C durante 8 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de HCl 0,65 M e novamente levou-se a banho-maria, a 100 °C durante 4 minutos. Em seguida ao resfriamento dos tubos adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,4M, pH 7 e 250  $\mu\text{L}$  de fenilhidrazina 0,33 %. Após 5 minutos em temperatura ambiente, os tubos foram incubados em banho de gelo por 5 minutos e então acrescentou-se 1,25 mL de HCL concentrado previamente gelado e 250  $\mu\text{L}$  de ferricianeto de potássio 1,65 %. Após 15 minutos a temperatura ambiente foi realizada a leitura dos tubos em espectrofotômetro a 535 nm. O teor de ureídeos na seiva foi expresso em nanomoles.  $\text{mL}^{-1}$ .

### 3.1.8. Razão isotópica do N estável e determinação da razão C/N

A determinação da razão C/N, porcentagem de N total e da abundância natural do isótopo estável ( $\delta^{15}\text{N}$ ) foi realizada em amostras de folhas de *A. falcata*, nos diferentes tratamentos, aos 90 dias de experimento, secas a 50° C e moídas através de analisador elementar (Carlo Erba, EA 1110, CHNS, CE Instruments) e espectrometria de massas para razões isotópicas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan) do Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/ESALQ/USP.

### 3.2. Composição da seiva em indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata*

As coletas foram realizadas na Gleba Pé de Gigante, Parque Estadual de Vassununga nas estações de outono, inverno e primavera. A seiva do xilema foi extraída de ramos coletados aleatoriamente (as folhas foram retiradas previamente para minimizar a respiração), através de uma bomba de vácuo manual e congeladas (-20 °C) até a realização das análises conforme descrito em Aidar *et al.* (2003).

Para análise qualitativa de aminoácidos em HPAEC, foi utilizada a metodologia descrita no item 3.1.5 deste trabalho. A seiva foi caracterizada ainda quanto ao transporte de aminoácidos totais livres, ureídeos e nitrato conforme descrito nos itens 3.1.6, 3.1.7 e 3.1.8, deste trabalho, respectivamente.

#### 3.2.1. Quantificação de nitrato

A quantificação de nitrato foi realizada utilizando-se a metodologia descrita em Cataldo *et al.* (1975). Em tubos de ensaio foram adicionados 200 µL da amostra, 800 µL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico, seguido de repouso a temperatura ambiente por 20 minutos. Após este tempo foi adicionado lentamente 19 mL de NaOH 2N e após o resfriamento a temperatura ambiente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. O teor de nitrato na seiva foi expresso em nanomoles.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3. Razão isotópica do N estável e determinação da razão C/N em indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata*

A avaliação do potencial da FBN pela espécie em estudo foi realizada através da técnica de diluição de <sup>15</sup>N. Simplificadamente, o método da abundância natural <sup>15</sup>N baseia-se na presença de duas fontes distintas de N nas folhas das leguminosas potencialmente fixadoras e nas plantas de referência: 'N oriundo do ar' e 'N oriundo do solo', respectivamente. O teor de <sup>15</sup>N no ar é constante (0.3663%). A estimativa da FBN como % Ndfa, sendo a porção do N foliar oriundo da FBN: % Ndfa =  $\frac{((\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}) \div (\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}} - \text{B})) * 100$  onde:  $\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}$  = sinal foliar de  $\delta^{15}\text{N}$  do N oriundo do solo, medido nas plantas de referência;  $\delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}$  = sinal foliar de  $\delta^{15}\text{N}$  das leguminosas potencialmente fixadoras. O processo da FBN causa uma ligeira diluição de <sup>15</sup>N relativo ao ar.

A espécie selecionada para referência foi *Myrcia língua* (O.Berg) Mattos (Myrtaceae) determinada dentre aquelas que ocorrem com alta dominância e distribuição uniforme na área

de estudo, segundo levantamento realizado por Ribeiro (2007). As coletas foram realizadas nas estações verão, outono e inverno, utilizando as folhas dos mesmos galhos coletados para extração da seiva do xilema, em indivíduos com altura menor de 3 metros, de 3 a 5 metros e maiores que 5 metros.

As análises foram realizadas conforme descrito no item 3.1.8.

### **3.4. $^{15}\text{N}$ em aminoácidos da seiva do xilema em plantas de *Anadenanthera falcata***

Sementes de *Anadenanthera falcata* coletadas na Gleba Pé-de-Gigante (Parque Estadual do Vassununga) foram germinadas conforme metodologia descrita no item 3.1.1. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação da seção de Fisiologia e Bioquímica de plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. Elas receberam semanalmente solução nutritiva contendo:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2mM);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (6 mM);  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2 mM);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,46 mM);  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,091 mM);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (7,65  $\mu\text{M}$ );  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3,20  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,56  $\mu\text{M}$ ) e Fe-EDTA [ $\text{Na}_2$ -EDTA (89,2  $\mu\text{M}$ );  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (89,92  $\mu\text{M}$ ) e NaOH (91,25  $\mu\text{M}$ )].

Aos 60 dias as plantas foram inoculadas como descrito no item 3.1.1. e aproximadamente 120 dias após a inoculação as plantas foram utilizadas para o experimento de  $^{15}\text{N}$ .

As plantas foram acondicionadas em frascos de 600 mL, gentilmente cedidos pelo professor Dr. Ladaslav Sodek do departamento de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da UNICAMP, previamente recheados de bolas de vidro (para diminuição do volume total), com o sistema radicular totalmente encerrado e vedado, no vaso (duas plantas por vaso). Imediatamente foi injetado, com auxílio de uma seringa, 20 % do volume total do vaso (medido previamente já com a bolas de vidro, com uma proveta) com  $^{15}\text{N}_2$  da Aldrich – 99 % átomos de  $^{15}\text{N}$  - (figura 4). Foi adicionada água ao fundo do vaso, de forma que durante a injeção do gás a mesma quantidade de água era expelida para fora do vaso. Após o tempo determinado (60 minutos e 120 minutos) a parte aérea foi cortada e a seiva do xilema foi coletada como descrito no item 3.1.3. e congeladas para posterior análise. Os nódulos radiculares também foram coletados e congelados imediatamente para posterior análise.

#### **3.4.1. Extração de aminoácidos em nódulos radiculares**

Esta extração foi realizada conforme recomendado pelo Dr. Ladaslav Sodek. Os nódulos foram macerados (250 mg) com 2 mL de ácido sulfosalicílico 2 % e então transferidos para tubos “eppendorfs”. A amostra foi centrifugada a velocidade de 13.000 rpm

durante 5 minutos. O sobrenadante foi injetado em coluna contendo 500 mg de resina AG-50W X8 (BioRad Laboratories). A coluna foi lavada com 4 mL de água destilada e então 2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4 mM) foram injetados para eluição dos aminoácidos. Esta fração foi coletada e concentrada até atingir metade do seu volume (seca em jato de  $\text{N}_2$ ).



**Figura 4.** Experimento com  $^{15}\text{N}_2$  utilizando plantas jovens (120 dias) noduladas de *Anadenanthera falcata*.

### 3.4.2. Análise de aminoácidos em GC-MS

Amostras de seiva foram preparadas como descrito em Justino (2009). Devido ao volume variável de seiva obtido para a análise, cerca de 50 a 80  $\mu\text{L}$  de amostra (valores previamente testados) foram secos totalmente em jato de  $\text{N}_2$ . Em seguida, foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de HCl 0,1 N e novamente as amostras foram secas em jato de  $\text{N}_2$ . Após a secagem, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e nova secagem foi realizada.

As amostras de nódulos foram processadas praticamente da mesma forma que a seiva, porém o volume inicial utilizado foi 100  $\mu\text{L}$  (10 % do volume total da amostra) e a etapa de secagem com HCl 0,1 N foi omitida.

As amostras foram derivatizadas em frascos de 1,5 mL com a adição de 30 $\mu\text{L}$  de piridina (Merck, super-seco) e 30 $\mu\text{L}$  de MTBSTFA [N-metil-N(-Tertbutildimetilsilil) trifluoroacetamida]. As amostras então foram mantidas a temperatura de 70°C durante 30 minutos em banho seco.

Após derivatizadas, as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás modelo 2010 Plus, marca Shimadzu, acoplado a um detector de massas modelo QP2010 Plus, marca Shimadzu como descrito em Justino (2009).

Segundo Justino (2009) os valores de enriquecimento dos aminoácidos ( $^{15}\text{N}_2$ ) foram calculados de acordo com a fórmula abaixo, sugerida por Godber e Parsons (1998):

$$\text{APE} = (\text{Re} - \text{Rc}) / [1 + (\text{Re} - \text{Rc})] \times 100, \text{ em que:}$$

APE: Porcentagem de enriquecimento de átomos

$$\text{Re} = [(M+1)/M] \text{ (enriquecido) e}$$

$$\text{Rc} = [(M+1)/M] \text{ (controle).}$$

Onde, M é a intensidade do fragmento analisado em cada aminoácido, no qual pode ocorrer a incorporação do  $^{15}\text{N}$ .

Esta parte do trabalho foi realizada no departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, com colaboração do professor Dr. Ladaslav Sodek.

### **3.5. Análise dos dados**

Os dados foram analisados através de análise de variância, teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) em programa estatístico WINSTAT (WinSTAT for Excel; R. Fish Software 2002; [www.winstat.com](http://www.winstat.com)). Para os dados em que não foi possível realizar estatística desta maneira, foram apresentados apenas os valores de desvio padrão (barras).

## 4. Resultados e Discussão

O início desta dissertação consistiu em testar a eficiência das estirpes de *Rhizobium* sp em nodular a espécie *Anadenanthera falcata*. Porém, observou-se que o período de inoculação não foi propício, no meio do inverno. Isto porque, os primeiros nódulos só foram observados aproximadamente 80 dias após a inoculação, quando as temperaturas apresentaram um aumento, devido ao início da primavera. Mendonça & Schiavinato (1996) obtiveram plantas noduladas aproximadamente 30 dias após a inoculação com as estirpes de *Rhizobium* sp e Cordeiro & Beltrati (1989) relataram a visualização de nódulos aproximadamente 42 dias após o processo de inoculação. As estirpes IBRC-101 utilizadas neste trabalho foram as mesmas utilizadas por Cordeiro & Beltrati (1989) isoladas de raízes de *A. falcata*. Segundo as autoras os nódulos de *A. falcata* provenientes da infecção com essa estirpe de rizóbio são de crescimento indeterminado, do tipo astragolóide, considerados primitivos. A demora em apresentar nódulos observada nas plantas do presente trabalho, pode estar diretamente relacionada às baixas temperaturas ocorridas imediatamente após a inoculação, indicando momento não muito propício para a realização do experimento (junho de 2008). Com o começo da primavera e o aumento nas temperaturas, a quantidade e o tamanho de nódulos aumentaram. Nas figuras 5 e 6 é possível visualizar a presença de muitos nódulos radiculares em *A. falcata* em plantas de aproximadamente 118 dias, no começo de outubro (primavera).

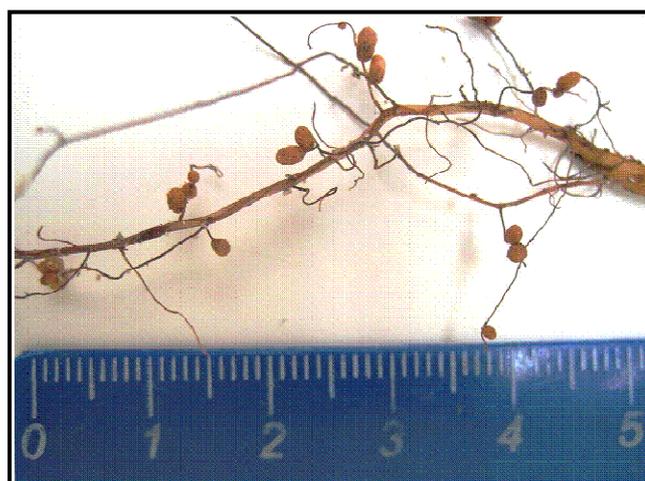
Estas plantas foram descartadas e novas plantas foram então inoculadas no início da primavera (setembro), conforme descrito na metodologia, com a finalidade de serem utilizadas para os posteriores experimentos deste trabalho.

### 4.1. Experimento com diferentes fontes de N

Analisando os dados de área foliar (figura 7-A) do experimento de diferentes fontes de nitrogênio (N) é possível observar um contínuo crescimento ao longo do tempo. Porém, as plantas que receberam N apenas na solução nutritiva e não apresentavam nodulação (Sem Nod) apresentaram maior área foliar total em todas as coletas. O tratamento que apresentou menor área em todas as coletas foi o Nod -N (plantas noduladas, sem adição de N na solução nutritiva).



**Figura 5.** Plântulas de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg de aproximadamente 150 dias apresentando nódulos radiculares 118 dias após a inoculação com estipes IBRC-103 de *Rhizobium* sp.

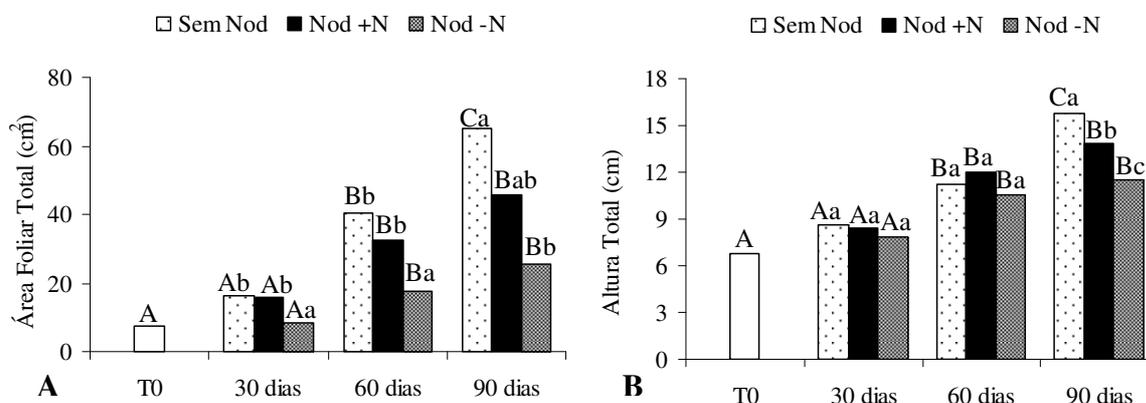


**Figura 6.** Detalhe da raiz de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg apresentando nódulos, 118 dias após a inoculação com estipes IBRC-103 de *Rhizobium* sp.

Os resultados da altura das plantas mostram um crescimento contínuo durante todo o experimento, mas diferenças significativas só apareceram aos 90 dias (figura 7-B). Neste ponto, o tratamento Sem Nod apresentou altura estatisticamente maior em relação aos outros tratamentos, Por outro lado, o tratamento Nod -N apresentou o menor crescimento também em altura em relação aos demais.

Um menor desenvolvimento do tratamento Nod -N pode ser indício do maior gasto energético necessário para o processo de fixação biológica do nitrogênio, única fonte disponível do nutriente neste tratamento. Esse maior gasto energético é relatado por Csiro

(2008), que afirma que plantas não costumam fixar N quando há boa disponibilidade do nutriente no solo, pois o custo energético é extremamente alto (aproximadamente 10 g de carbono (C) por g de N fixado), quando comparado com a assimilação de N disponível no solo pelas raízes (de 4 a 6 g de C por g de N assimilado).



**Figura 7.** Desenvolvimento das plantas de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento, submetidas a diferentes fontes de N. **A.** área foliar total em cm<sup>2</sup>; **B.** altura em cm. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). Letras maiúsculas representam análise estatística entre plantas de um mesmo tratamento em diferentes tempos de coleta; letras minúsculas representam análise estatística em um mesmo tempo de coleta nos diferentes tratamentos para Tukey ( $P < 0.05$ ,  $n=20$ ).

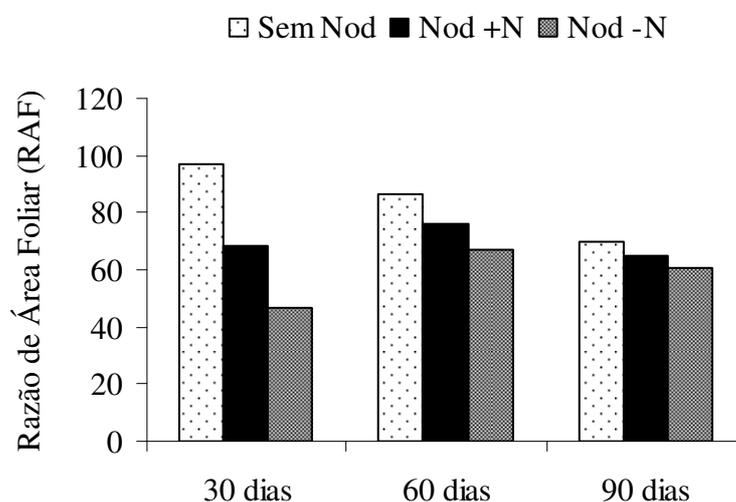
Os resultados de número de folhas (tabela 1) mostram que o tratamento Nod -N possui número menor de folhas total/planta em relação aos demais tratamentos. Essas plantas apresentaram tendência de menor crescimento e/ou desenvolvimento na parte aérea, conforme também observado nos dados de área foliar e altura discutidos acima. Com base nestes dados, pode-se inferir que plantas supridas apenas com N proveniente da fixação biológica apresentam menor produção de folhas, tanto em número como em área.

A razão de área foliar (RAF) mostra que há uma maior disponibilidade para produção de fotoassimilados (maior investimento em área foliar) em relação à biomassa total da planta no tratamento Sem Nod quando comparado aos outros tratamentos.

**Tabela 1.** Número total de folhas em *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento nos diferentes tratamentos. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). Desvio padrão entre parênteses.

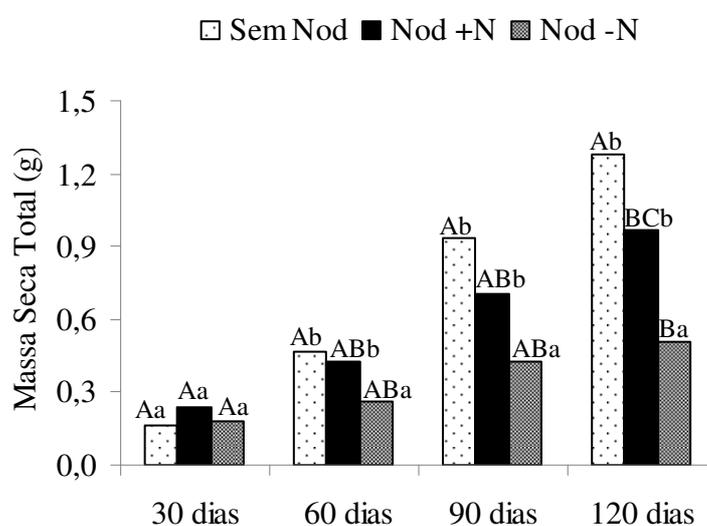
Tratamentos	Sem Nod	Nod +N	Nod -N
Total de Folhas			
T0	3 ( $\pm 0,6$ )	3 ( $\pm 0,6$ )	3 ( $\pm 0,6$ )
30 dias	3 ( $\pm 0,7$ )	3 ( $\pm 0,8$ )	2 ( $\pm 0,6$ )
60 dias	4 ( $\pm 1,1$ )	4 ( $\pm 1$ )	3 ( $\pm 0,8$ )
90 dias	6 ( $\pm 1,4$ )	6 ( $\pm 1,3$ )	5 ( $\pm 1,2$ )

Esta diferença diminui ao longo do experimento como observado aos 60 e aos 90 dias (figura 8), mas este tratamento continua apresentando maior RAF. A menor RAF apresentada pelo tratamento Nod -N pode ser explicada pela menor área e menor número de folhas, como visto anteriormente (Figuras 7-A e 7-B). Moreau *et al.* (2008) relatam que no caso de *Medicago truncatula* cv. Jemalong, quando a fixação biológica é a principal fonte de N para a planta e o requerimento de N não é sustentado, a área foliar é muito afetada, apesar da fotossíntese por unidade de área ser inalterada.



**Figura 8.** Razão de área foliar (RAF) em plantas de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento, submetidas a diferentes fontes de N. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva) e Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva).

Os dados de massa seca (figura 9) mostram que plantas do tratamento Sem Nod possuem maior massa seca que todos os outros tratamentos a partir dos 60 dias, sendo ao final do experimento (120 dias) 24,6 % maior em relação ao tratamento Nod +N e 42,4 % maior em relação ao tratamento Nod -N. Mais uma vez os resultados mostram um desenvolvimento mais lento das plantas que obtêm N proveniente apenas da fixação biológica (Nod -N) em relação a outra fonte (Sem Nod e Nod +N). Gross *et al.* (2002), Gross *et al.* (2004) e Mendonça & Schiavinato (1996) também relataram que quando o N é oferecido apenas através da fixação simbiótica, as plantas apresentam menor acúmulo de massa seca em relação ao tratamento que recebeu N apenas na forma inorgânica (assimilação no solo).

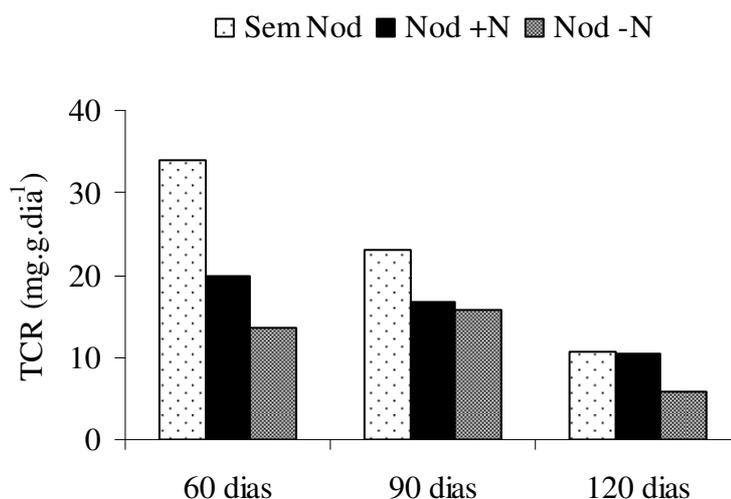


**Figura 9.** Massa seca de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento submetidas diferentes fontes de nitrogênio. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação, sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação, adição de N a solução nutritiva). Letras maiúsculas representam análise estatística entre plantas de um mesmo tratamento em diferentes tempos de coleta; letras minúsculas representam análise estatística em um mesmo tempo de coleta nos diferentes tratamentos para Tukey ( $P < 0.05$ ,  $n=20$ ).

A TCR (taxa de crescimento relativo) do experimento de diferentes fontes de N (figura 10) segue a tendência dos dados de área foliar, altura, número de folhas, RAF e massa seca encontradas neste trabalho, confirmando que na espécie *A. falcata* os tratamentos que assimilam N inorgânico do solo se desenvolvem melhor que as plantas que obtêm N apenas através da fixação biológica. Isto porque, a TCR do tratamento Sem Nod é relativamente maior em todos os pontos de coleta, sendo aos 120 dias, maior 24,7 e 47,6 % que os

tratamentos Nod +N e Nod -N, respectivamente. Em outras palavras, pode-se dizer que 1/4 da energia que poderia ser utilizada para produção de massa seca em plantas que possuem nódulos fixadores e N disponível no solo é desviada para manutenção de nódulos e em plantas que apenas adquirem N proveniente da fixação biológica esse valor chega próximo aos 50 %.

Aproximadamente 90 % da massa seca das plantas são originados dos produtos resultantes do processo fotossintético (Poorter *et al.* 1990), e nódulos fixadores são drenos de fotoassimilados (Vance & Heichel 1991). Neste trabalho fica claro através dos resultados de área foliar, RAF, massa seca e TCR, que parte dos produtos resultantes do processo fotossintético podem realmente ser desviados para a manutenção dos nódulos no tratamento Nod -N, pois os valores apresentados são relativamente menores em relação ao tratamento Sem Nod, tratamento este, que poderia potencialmente utilizar totalmente os fotoassimilados para o incremento de massa seca. Um dos efeitos deste menor investimento em massa seca seria a diminuição do número de folhas e o tamanho da área das folhas, resultados estes encontrados neste experimento.



**Figura 10.** Taxa de crescimento relativo (TCR) em mg.g.dia<sup>-1</sup> em plantas de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento submetidas a diferentes fontes de N. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação, sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação, adição de N a solução nutritiva).

Em relação aos nódulos radiculares é evidente a variação existente no número total de nódulos dos dois tratamentos que apresentavam nodulação (tabela 2). Em ambos, no fim do experimento houve uma diminuição de nódulos. Apesar desta diminuição, não se pode falar

com certeza em senescência de nódulos, pois no trabalho de Cordeiro & Beltrati (1989) onde os autores estudaram o desenvolvimento de nódulos radiculares também em *A. falcata*, utilizando as mesmas estirpes de *Rhizobium* sp utilizadas neste trabalho, não foram encontradas evidências de senescência pelo menos até os 126 dias após a inoculação. Estas variações podem ser explicadas pelos altos desvios padrões apresentados, já que a espécie é nativa, podendo apresentar grande variabilidade genética e assim conseqüentemente apresentar também grande variabilidade no número total de desenvolvimento de nódulos.

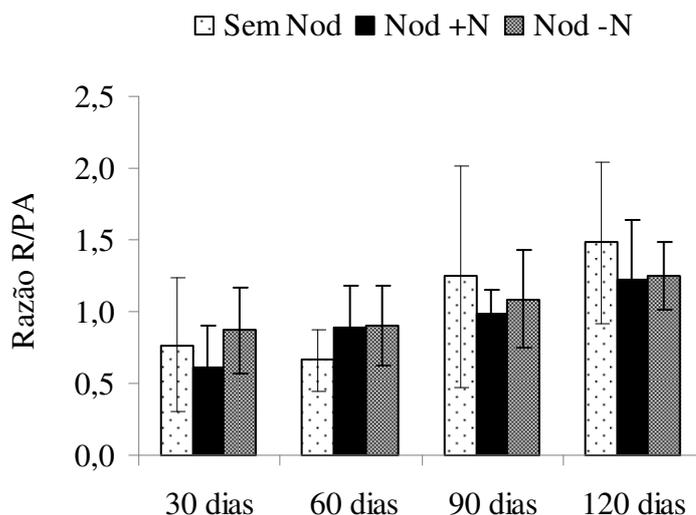
Tanto a massa seca total de nódulos por planta, quanto a massa seca média total por nódulos, são maiores no tratamento Nod -N em relação ao tratamento Nod +N. Isto confirma a teoria de que plantas que possuem nódulos desviam grande parte da energia da planta (fotoassimilados) para o desenvolvimento dos nódulos. Assim como Vance & Heichel (1991), Ludwig *et al.* (2003), também afirmam que nódulos radiculares podem cumprir o papel de verdadeiros drenos de carbono na planta, pois em troca dos aminoácidos fornecidos pelos nódulos a planta hospedeira, estes necessitam de carbono fornecido pela planta para manterem suas atividades. Neste trabalho a massa seca média por nódulo mostrou-se aos 90 e aos 60 dias, 225 % maior nas plantas Nod -N em relação às plantas Nod +N, confirmando o maior investimento nos desenvolvimento dos nódulos quando este é o único meio de obtenção do N.

Outro fato importante é que a fonte amônio não inibiu totalmente a nodulação em angico como relatado ocorrer em muitas plantas quando a fonte de nitrogênio é o nitrato. Mendonça & Schiavinato (1996) verificaram que em *Anadenanthera peregrina* (L.) Speng e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan também não há inibição da nodulação na presença de N na forma amoniacal, porém quando a fonte é o nitrato houve inibição total ou parcial (diminuição no número e tamanho de nódulos) nas espécies. No caso do presente trabalho houve apenas uma diminuição da nodulação, como mostrado pelos resultados de massa seca de nódulos (tabela 2). Estudos mostram que realmente há diferenças na sensibilidade de nodulação das plantas em relação ao tipo de fonte de N inorgânico ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ). Vessey & Bollman (2006) relata que a sensibilidade da simbiose leguminosa – rizóbio ao amônio é relativamente baixa em relação ao nitrato e Gyan'ko *et al.* (2008) afirmam que provavelmente isto ocorra, pois os mecanismos inibitórios do processo de nodulação nesta simbiose são diferentes em relação ao nitrato e ao amônio. Apesar de algumas hipóteses serem levantadas ainda não é possível explicar com certeza qual a razão da diferente resposta da leguminosa na formação da simbiose, em relação a nutrição com nitrato ou amônio.

**Tabela 2.** Desenvolvimento de nódulos de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação, sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação, adição de N a solução nutritiva). Letras significam análise estatística entre os tratamentos para ANOVA – Teste de Tukey ( $p < 0.05$ ,  $n=8$ ).

	Número total nódulos/planta	Massa seca total nódulos/planta (mg)	Massa seca específica mg / nódulo
Nod -N			
30 dias	12	3,2 a	0.3
60 dias	9	6,6 ab	0.7
90 dias	10	12,6 bc	1.3
120 dias	7	17,9 cd	2.6
Nod +N			
30 dias	10	2,0 a	0.2
60 dias	5	1,5 a	0.3
90 dias	14	6,0 ab	0.4
120 dias	6	4,7 ab	0.8

Os resultados de razão raiz / parte aérea mostram uma tendência de maior investimento em raiz no tratamento Sem Nod em relação aos outros tratamentos a partir dos 90 dias (figura 11). Isto provavelmente se deve à presença do xilópodio. O xilópodio é uma estrutura muito comum em espécies de cerrado (Apezato da Glória 2003). Milanez & Moraes-Dallaqua (2003) estudando sistema subterrâneo de *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi, afirmam que o xilópodio é uma estrutura armazenadora de água e amido. Macedo (2007) afirma que aproximadamente 50 % do xilópodio de *A. falcata* é composto por amido, sendo uma importante fonte de carbono para a planta. Durante as coletas realizadas no experimento do presente trabalho, foi observada a presença de xilópodio nas raízes, porém estes eram muito maiores em plantas do tratamento Sem Nod. Provavelmente devido a grande demanda de carbono para a manutenção de nódulos, não foi possível o armazenamento de grande quantidade de amido no xilópodio, podendo ser este fato responsável pela tendência de maior razão raiz: parte aérea observada neste experimento.

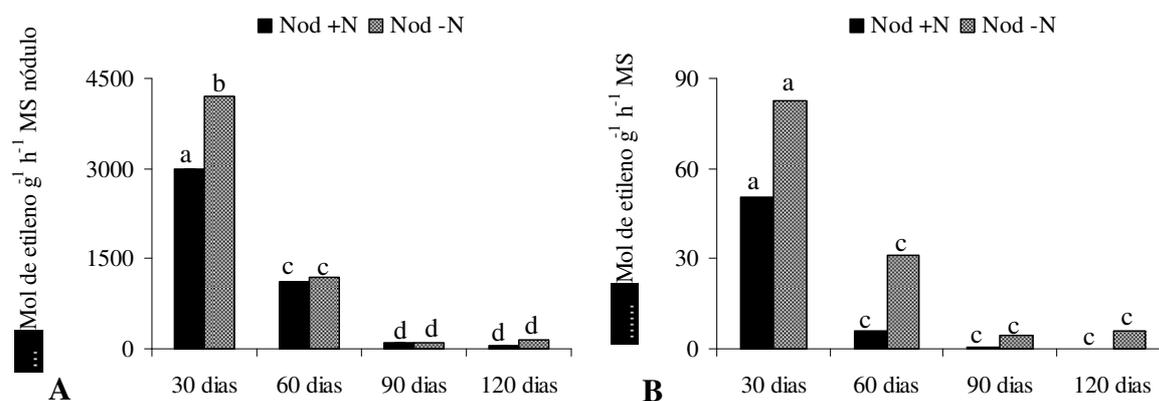


**Figura 11.** Razão R/PA (Raiz Parte Aérea) e desvio padrão em plantas de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). Barras indicam desvio padrão.

A técnica de redução do acetileno mostrou que a atividade da enzima nitrogenase por grama (g) de nódulo seco tem tendência de ser maior em plantas do tratamento Nod -N aos 30 dias e aos 120 dias (figura 12-A). Vale ressaltar que apenas é possível falar em tendência, pois apesar da atividade apresentar valores maiores no tratamento Nod -N esta diferença não foi estatisticamente significativa. É observado uma alta atividade da enzima aos 30 dias, seguido de uma queda brusca aos 60 dias e valores similares ao final do experimento (aos 90 e 120 dias). Uma das hipóteses para que isso tenha ocorrido é a grande demanda por N, inicialmente requerida pela planta. O primeiro ponto de coleta corresponde ao início da estação de crescimento, momento no qual a planta necessita garantir o seu estabelecimento, e necessita de maior quantidade de nutrientes.

Ao analisar a atividade da nitrogenase em relação à massa seca da planta toda (figura 12-B), vemos que durante todo o experimento ela apresenta tendência de maior atividade no tratamento Nod -N em relação ao tratamento Nod +N. Aos 120 dias, enquanto a atividade da nitrogenase por massa seca da planta do tratamento Nod +N variou em torno de  $0,43 \mu\text{M g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , no tratamento Nod -N essa atividade atingiu valores em torno de  $1,45 \mu\text{M g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Isto evidencia o potencial de *A. falcata* em fixar N em condições onde este elemento não está disponível no solo em quantidades suficientes. Schmidt & Lamblea (2005) confirmam esta informação ao afirmarem que a fixação biológica é a principal fonte de N em ecossistemas savânicos, pois os solos são pobres e lixiviados, refletindo em baixas concentrações de N.

Apesar do tratamento Nod -N apresentar um crescimento menor em relação aos outros tratamentos, em todos os parâmetros analisados, não se pode falar que o amônio atrapalha o desenvolvimento da mesma, mas pode sim diminuir o seu ritmo. Isto pode ser confirmado pelos valores de atividade da enzima nitrogenase por g de MS de nódulos, que se mostrou elevada. Além do mais a atividade por MS da planta toda se mostrou maior no tratamento Nod -N, evidenciando a competência da fixação em *A. falcata* em suprir N para seu desenvolvimento durante todo o experimento. Dixon & Wheeler (1986) relatam que a planta hospedeira fornece esqueletos de carbono provenientes da fotossíntese para os nódulos, doando dessa forma poder redutor e ATP necessários ao processo de fixação do N e esqueletos de carbono necessários à formação de compostos orgânicos nitrogenados. Desta maneira, a atividade da nitrogenase até os 120 dias de experimento comprova a funcionalidade dos nódulos.

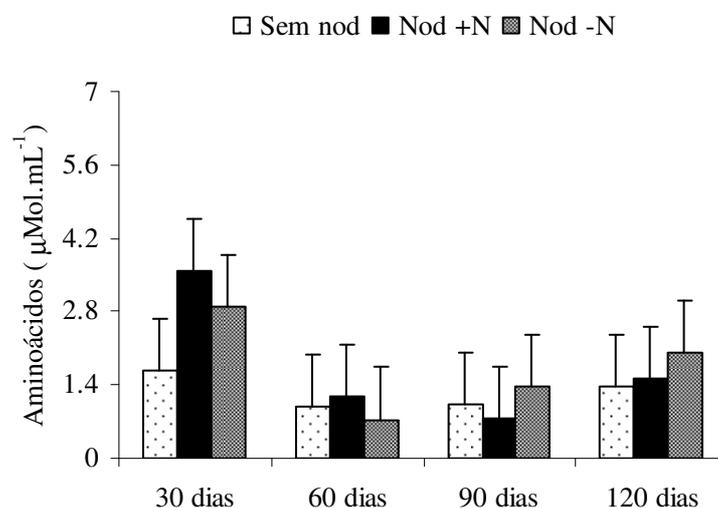


**Figura 12.** Atividade da nitrogenase através da técnica de redução de acetileno. **A**,  $\mu\text{Mol}$  de etileno  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  massa seca (MS) de nódulos; **B**,  $\mu\text{Mol}$  de etileno  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  massa seca (MS) total da planta. Tratamentos: Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). Letras representam análise estatística entre todos os tratamentos para ANOVA ( $P < 0.05$ ,  $n=4$ ).

Os valores de atividade da nitrogenase encontrados neste trabalho podem ser consideradas bem altas ao comparar com valores de outras plantas. Zanela (2004) relata atividade de até  $28 \mu\text{Mol g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (massa seca de nódulos) para a espécie *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. González-Ruiz *et al.* (2008) ao estudarem a atividade da enzima nitrogenase em plantas arbóreas de campo, encontraram valores de atividade de até  $5 \mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  de massa seca de nódulo. Levando em consideração que a estirpe de rizóbio utilizada neste experimento é nativa, isolada a partir de raízes de angico em campo (Cordeiro & Beltrati 1989), da mesma forma como realizada nos casos citados acima, a atividade da enzima nitrogenase em *A.*

*falcata* pode ser considerada alta já que seus valores não foram menores do que  $40 \mu\text{Mol g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

A quantificação de aminoácidos totais na seiva do xilema das plantas submetidas a diferentes fontes de N não mostra grandes alterações ao final do experimento (figura 13), sendo notável apenas a quantidade elevada no início do experimento, nos tratamentos Nod -N e Nod +N. Porém, esses valores caem já a partir dos 60 dias e se mantêm similares durante todo o período observado. Cabe lembrar, que aos 30 dias também foi observada uma alta atividade da nitrogenase (figura 12 A e B) ainda que a quantidade de aminoácidos transportada na seiva possa ser elevada em decorrência da maior entrada de N através do processo de fixação, já que no tratamento onde não há presença de nódulos (Sem Nod) a concentração de aminoácidos totais continua similar durante todo o experimento. Mendonça (2002) estudando a espécie *Crotalaria juncea* L. afirma que as maiores quantidades de aminoácidos livres foram encontradas em plantas noduladas em relação às plantas não noduladas nutridas apenas com N oferecido na solução nutritiva. Camargos (2007) também apresenta dados semelhantes com a espécie *Calopogonium mucunoides* Desv., mostrando haver um maior teor de aminoácidos livres totais na seiva de xilema de plantas noduladas que não receberam N na solução nutritiva em relação às plantas noduladas que receberam nitrato ou amônio. Estas informações confirmam os resultados encontrados em *A. falcata*.

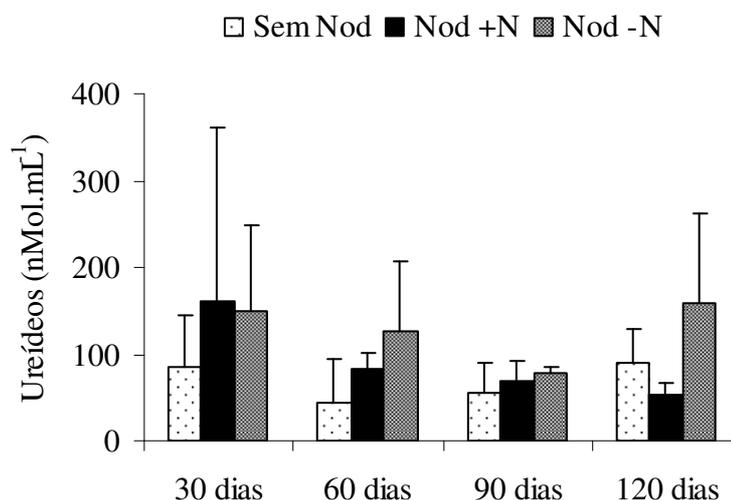


**Figura 13.** Aminoácidos livres totais na seiva de plantas de *A. falcata* ao longo do experimento, submetidas a diferentes fontes de N. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). Barras indicam desvio padrão.

Em geral os teores de ureídeos (figura 14) transportados na seiva são baixos quando comparados, por exemplo, com plantas de soja (*Glycine max* (L) Merrill) que chegam a transportar valores próximos de  $10 \mu\text{Mol.mL}^{-1}$  e *Phaseolus vulgaris* L., que transporta em torno de  $7 \mu\text{Mol.mL}^{-1}$  na seiva do xilema (Amarante *et al.* 2006). Os valores encontrados para *A. falcata* não passaram de  $161 \text{ nMol.mL}^{-1}$  nas plantas noduladas.

Os ureídeos podem ser compostos característicos da fixação biológica de N em muitas espécies de leguminosas, já que na comparação de plantas noduladas e não noduladas, estas últimas tendem a ter valores bem menores em relação às noduladas (Schubert 1986). Ireland & Lea (1999) afirmam que leguminosas fixadoras que apresentam nódulos do tipo indeterminado, tendem a assimilar o N na forma de amidas (asparagina e glutamina). Isto corrobora os resultados apresentados, já que em *A. falcata*, os nódulos radiculares também são do tipo indeterminado, mostrando haver relação do tipo de nódulo com o tipo de transporte do N fixado na seiva do xilema (Cordeiro & Beltrati 1989). Mendonça (2002) também encontrou valores baixos de ureídeos transportados na seiva de xilema de *C. juncea*, espécie que também apresenta nódulos do tipo indeterminado.

Apesar dos baixos valores de ureídeos encontrados para esta espécie, é evidente pelo menos aos 60 e aos 120 dias a tendência de maior concentração destes metabólitos nos tratamentos Nod +N, mostrando que na presença de fixação biológica a planta pode apresentar um incremento nos valores de ureídeos transportados no xilema.



**Figura 14.** Teor de ureídeos na seiva do xilema em plantas de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento submetidas à diferentes fontes de N. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). Barras indicam desvio padrão.

Na análise de aminoácidos por HPLC (tabela 3), foi possível perceber que os aminoácidos transportados na seiva são principalmente arginina (ARG), asparagina (ASN), glutamina (GLN), alanina (ALA), glutamato (GLU) e aspartato (ASP). Também houve o aparecimento de um aminoácido não identificado pelo método utilizado, que corresponde em alguns casos a aproximadamente 20 % dos aminoácidos totais analisados por esta metodologia. Não houve o aumento de nenhum aminoácido específico nas plantas noduladas, porém é possível perceber a baixa representatividade do ASP em indivíduos que adquirem N através da fixação em relação às plantas que adquirem N apenas do solo. A ASN é um dos aminoácidos mais representativos, sendo claro o seu aumento ao longo do experimento em todos os tratamentos. Já a ARG representa cerca de 50 % do total de aminoácidos encontrados na seiva de xilema nos diferentes tratamentos, sendo que estes valores caem bruscamente aos 120 dias estes valores oscilando por volta de 5%.

**Tabela 3.** Composição (%) de aminoácidos na seiva do xilema de plântulas de *Anadenanthera falcata* ao longo do experimento submetidas à diferentes fontes de N. Tratamentos: Sem Nod (sem nodulação com adição de N a solução nutritiva); Nod -N (nodulação e sem adição de N a solução nutritiva); Nod +N (nodulação e adição de N a solução nutritiva). \* Aminoácido ainda não identificado.

	Arg (%)	Gln (%)	Asn (%)	Ala (%)	Glu (%)	Asp (%)	* (%)	outros (%)
<b>Sem Nod</b>								
30	48,1	2,8	3,1	1,0	1,6	2,1	21,6	19,5
60	49,7	5,3	17,4	1,2	0,7	5,2	1,1	19,5
90	49,9	5,3	17,5	1,2	0,7	5,2	0,7	19,6
120	12,7	13,2	51,5	1,1	3,5	5,8	1,8	10,4
<b>Nod +N</b>								
30	44,6	3,0	14,3	0,1	2,2	1,9	16,0	17,9
60	60,7	4,4	21,0	0,7	0,7	0,9	0,4	11,4
90	59,6	4,3	20,6	0,7	0,7	0,8	2,0	11,3
120	8,9	5,9	30,8	0,4	38,8	3,3	0,1	11,7
<b>Nod -N</b>								
30	49,0	2,5	6,9	0,4	1,2	2,0	20,4	17,6
60	50,4	2,8	24,7	0,5	1,0	1,3	0,0	19,3
90	49,1	2,7	24,0	0,4	1,0	1,2	2,6	18,8
120	10,2	10,6	43,1	1,8	9,0	1,0	14,1	10,0

Esta alta representatividade da ARG nos primeiros 90 dias do experimento pode estar intimamente ligada ao transporte de reserva na planta. Isto porque Lea *et al.* (2007) relatam que a ARG, juntamente com a ASN atua como molécula de reserva e transporte de N na planta. Martins *et al.* (2007) estudando transporte de N em plântulas de *Hymenaea courbaril*

var. *stilbocarpa* (Lee & Lang.) encontrou valores altos de ARG no período inicial do desenvolvimento, logo após a germinação da semente evidenciando o seu papel central no transporte do N resultante das reservas cotiledonares de proteínas. Como visto por Macedo (2007) a semente de *A. falcata* é extremamente rica em N, apresentando 36,1 % da sua constituição representada por proteínas. A grande participação da ARG no transporte de N de *A. falcata* leva a hipótese de que este N provavelmente seja oriundo da reserva da semente, ainda sendo utilizada pela planta. Já aos 120 dias a queda na participação da ARG na seiva evidencia o término de uso do N proveniente da reserva da semente e uma maior participação do “novo” N absorvido pela planta, seja ele assimilado ou fixado biologicamente.

A GLN aparece em proporções similares durante o experimento, com exceção apenas nos tratamentos Sem Nod e Nod -N aos 120 dias, momento no qual houve um aumento expressivo do seu teor, chegando este aumento a ser de mais de 100 %. Para a maioria das plantas os aminoácidos predominantes na seiva do xilema são a ASN e a GLN (Bollard 1960). Segundo Lea *et al.* (2006), a ASN é um aminoácido que possui razão N:C de 2:4, sendo por isso considerada uma eficiente molécula de reserva e de transporte de N. Como já discutido acima, plantas com nódulos do tipo indeterminado tendem a transportar preferencialmente amidas em relação aos ureídeos, informação que confirma os resultados encontrados neste trabalho, já que a ASN representa grande parte dos aminoácidos encontrados na seiva do xilema.

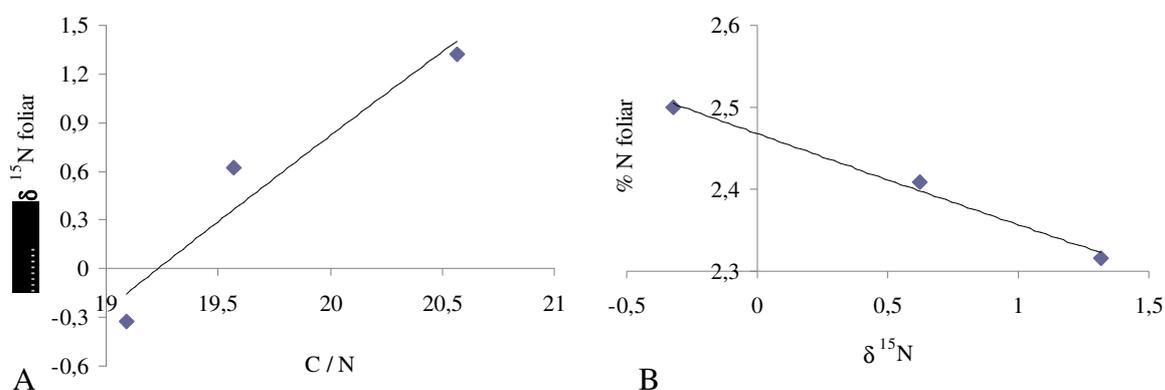
A característica de uma planta transportar preferencialmente amida ou ureídeos levanta a questão sobre qual forma seria mais eficiente. Embora a razão C: N seja maior nos ureídeos que em amidas (1:1 dos ureídeos, contra 2:1 das amidas) o ganho é pequeno porque o metabolismo de ureídeos requer mais energia em relação ao metabolismo das amidas. O custo energético dos dois metabolismos é similar (Vance 2002). De qualquer modo, ficou claro com este experimento que o composto nitrogenado preferencialmente transportado no xilema de *A. falcata* são os aminoácidos, com destaque para a ASN, GLN e o outro aminoácido ainda não identificado, sendo que em plantas que apresentam fixação tendem a aumentar o transporte de aminoácidos livres e de ureídeos, apesar dos seus baixos valores.

As análises isotópicas mostraram que os tratamentos Sem Nod, Nod + N e Nod -N apresentaram valores para  $\delta^{15}\text{N}$  de 1,3; 0,6 e -0,3, respectivamente. Estes dados confirmam como esperado que a presença de FBN dilui a o teor de  $^{15}\text{N}$  foliar da planta, diminuindo desta forma o  $\delta^{15}\text{N}$ .

A razão C/N é mais elevada em plantas do tratamento Sem Nod (20,6), seguida por Nod +N (19,6), sendo o tratamento Nod -N o de menor razão C/N, com 19,1. Quanto a porcentagem de N total foliar os números aumentam apresentando valores de 2,3; 2,4; e 2,5

para os tratamentos Sem Nod, Nod +N e Nod -N, respectivamente. Isto mostra que a FBN aumenta o conteúdo de N foliar alterando a razão C/N. Estes resultados confirmam a hipótese levantada pelos dados de crescimento de que a planta que obtêm o N apenas através da FBN tem menor crescimento devido ao alto custo energético para manter os nódulos e para o processo de FBN. Isto porque, enquanto o conteúdo de N aumenta, o conteúdo de C diminui, como é visto na relação C/N, mostrando que o C esta sendo desviado para manter o processo de FBN, que esta acontecendo como confirmado pelos dados de  $\delta^{15}\text{N}$ .

Nas figuras 15. A e 15. B é possível observar a correlação existente entre  $\delta^{15}\text{N}$  e C/N, e entre  $\delta^{15}\text{N}$  e porcentagem de N foliar, respectivamente evidenciando que quanto mais negativo o  $\delta^{15}\text{N}$ , maior a porcentagem de N foliar e maior fica a relação C/N, confirmando o desvio do C para a manutenção do processo de FBN.



**Figura 15.** Análise isotópica em folhas de plântulas de *Anadenanthera falcata* submetidas a diferentes fontes de N, aos 90 dias de experimento. **A.** Correlação entre o  $\delta^{15}\text{N}$  foliar e razão C/N (carbono/nitrogênio) para  $R^2 = 0,9246$ ; e **B.** Correlação entre % de N foliar e  $\delta^{15}\text{N}$  foliar para  $R^2 = 0,9899$ .

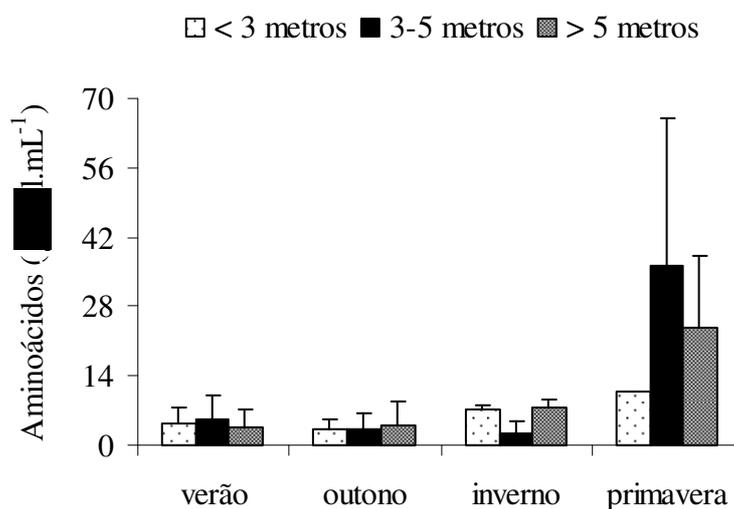
Estes resultados permitem que a análise isotópica de indivíduos adultos em campo, possa indicar a possível presença de FBN.

#### 4.2. Caracterização da seiva de plantas adultas de *Anadenanthera falcata*

Realizada a caracterização do transporte de N na seiva de plantas jovens de *A. falcata*, foi realizada então a caracterização da seiva de indivíduos adultos em campo, já que segundo Fischer *et al.* (1998) a análise de compostos nitrogenados na seiva do xilema pode indicar como a planta está transportando o N assimilado. Além do mais, afirmam que o estudo sazonal das mudanças na composição da seiva do xilema pode trazer informações sobre

reserva, mobilização e movimento dos nutrientes na planta (Ferguson *et al.* 1983).

A seiva dos indivíduos adultos de angico mostrou quantidades de aminoácidos livres totais (figura 16) similares nas estações verão, outono e inverno e um aumento acentuado dos valores na primavera, em indivíduos maiores (3-5 metros e > 5 metros). Esse aumento de transporte de aminoácidos na estação primavera pode refletir a maior demanda de N que ocorre nesta época, tempo no qual se inicia a estação de crescimento. É importante lembrar que no experimento com plantas jovens em casa de vegetação, os maiores valores de aminoácidos também ocorreram no início da estação de crescimento. Moreno & García-Martínez (1983) estudando a variação sazonal dos compostos nitrogenados em seiva do xilema de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Washington Navel relatam que nas estações outono e inverno, o transporte destes compostos se mantêm estáveis, havendo aumento do fluxo no começo da estação da primavera.

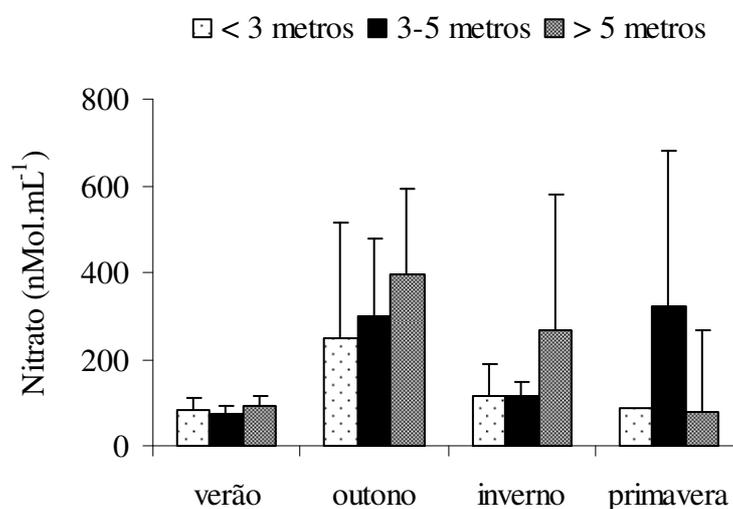


**Figura 16.** Aminoácidos Livres Totais em seiva do xilema de indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata* ao longo das estações do ano, coletadas na Gleba Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. Barras indicam desvio padrão.

A quantificação de nitrato (figura 17) mostrou tendência de aumento na estação outono em todos os indivíduos em relação às demais estações. Porém os valores encontrados em geral são relativamente baixos quando comparados com outras espécies arbóreas. Campos (2009) classificou diversas espécies arbóreas em relação ao transporte nitrato e considerou valores muito baixos para espécies que transportam menos que 1 mMol de nitrato por mL. Isto comprova o que foi visto no trabalho de Macedo (2007), em que a espécie *A. falcata* utiliza preferencialmente o amônio como fonte de N do solo, indicado inclusive pela baixa

atividade da enzima nitrato redutase, responsável pela entrada do  $\text{NO}_3^-$  na planta. Se a planta não utiliza o nitrato, é natural que o seu transporte na seiva do xilema seja pouco significativo.

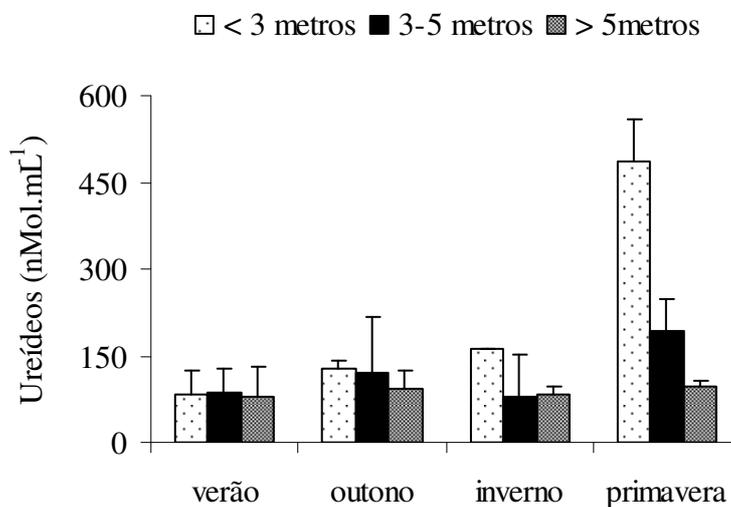
A análise de ureídeos mostrou haver pouca variação no teor destes compostos na seiva durante as estações inverno, outono e verão (figura 18). Foi notável uma maior concentração de ureídeos em indivíduos abaixo de 3 metros de altura nas estações de inverno e primavera. Como já relatado anteriormente, o aumento do transporte de ureídeos na seiva do xilema, pode ser reflexo da presença de fixação biológica de N na espécie. O maior transporte destes compostos que possuem uma alta razão C: N na estação da primavera pode refletir maior demanda deste nutriente, necessário para o crescimento e desenvolvimento da planta.



**Figura 17.** Teor de nitrato na seiva do xilema de indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata* ao longo das estações do ano, coletadas na Gleba Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. Barras indicam desvio padrão.

Em áreas de cerrado há uma grande diversidade e densidade de leguminosas (Felfili *et al.* 1992) e há uma alta atividade dos nódulos ocorrendo nesta região (Leitão 1997). A magnitude da fixação depende não somente da densidade rizóbios presentes no solo, mas também de suas propriedades físicas e químicas, reflexo das mudanças sazonais, entre outros (Bustamante *et al.* 2006). Estes autores relatam que a estação seca afeta fortemente a capacidade de fixação biológica, diminuindo desta forma a quantidade relativa de ureídeos transportados na seiva do xilema das espécies nativas. Está informação corrobora os dados encontrados neste trabalho, onde é possível ver o maior transporte de aminoácidos livres totais e ureídeos, justamente na primavera, início da estação chuvosa e de crescimento. Apesar destes resultados, afirmar a presença de nodulação em indivíduos adultos de *A. falcata*

em campo, através apenas da análise de ureídeos não é correta, já que estes valores são considerados baixos e o aumento ocorreu apenas em indivíduos menores que 3 metros na primavera, não havendo grandes variações entre os outros grupos ao longo das estações.



**Figura 18.** Teor de ureídeos transportado na seiva do xilema de indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata* ao longo das estações do ano, coletadas na Gleba Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Os aminoácidos que aparecem na seiva do xilema de indivíduos adultos (tabela 4) são em maior proporção, ASN, GLN, ARG, ASP, GLU, e o aminoácido não identificado. É curioso notar que nas plantas de campo, quando a proporção de ASN diminui o aminoácido não identificado aumenta. Por exemplo, no verão quando a ASN alcança 39, 36 e 21 % nos indivíduos < 3 metros, 3-5 metros e > 5 metros, respectivamente, o outro aminoácido atinge valores de 0, 4,3 e 6,8 % respectivamente. Ao longo do tempo os dois aminoácidos juntos chegam a representar de 25 % a 42 % dos aminoácidos encontrados na seiva de xilema.

A importância da proporção de ASN na seiva do xilema, funcionando como indicador da fixação já foi relatado para plantas de soja (Amarante *et al.* 2006). Porém as grandes variações encontradas para *A. falcata* dificulta o diagnóstico da presença da fixação através da composição da seiva do xilema. No experimento controlado em laboratório ficou clara a grande representação de ASN, GLN e do outro aminoácido não identificado como transportadores de N na planta, porém não houve grandes diferenças entre os tratamentos com e sem nodulação. Se analisarmos juntos a GLN e o GLU, aminoácidos envolvidos diretamente na assimilação do amônio há uma tendência de maior representatividade destes aminoácidos nos tratamentos que apresentam nodulação e em plantas de campo é possível

perceber entre os indivíduos < que 3 metros, uma maior porcentagem de GLN no verão, assim como de ASN.

**Tabela 4.** Composição (%) de aminoácidos na seiva de xilema de indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata* ao longo das estações do ano, coletadas na Gleba Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. \* Aminoácido ainda não identificado.

Altura	Arg (%)	Gln (%)	Asn (%)	Ala (%)	Glu (%)	Asp (%)	* (%)	outros (%)
<b>&lt; 3 metros</b>								
verão	6,2	8,5	39,0	1,4	4,9	3,4	0,0	36,7
outono	6,5	0,4	19,7	1,9	3,7	7,5	13,5	49,7
inverno	4,9	3,1	20,6	2,2	9,4	5,3	7,4	47,1
primavera	1,9	0,0	16,3	4,8	3,5	5,2	11,1	57,2
<b>3 - 5 metros</b>								
verão	9,7	13,0	36,4	1,5	3,3	2,1	4,3	29,6
outono	1,4	0,7	16,6	4,4	3,5	5,1	9,8	58,5
inverno	9,7	6,6	24,6	1,5	13,1	5,8	0,8	37,9
primavera	1,4	7,2	7,3	6,3	3,1	5,4	19,6	49,8
<b>&gt; 5 metros</b>								
verão	11,6	6,8	21,1	1,5	11,8	2,6	6,8	37,7
outono	3,5	2,8	20,4	2,9	2,8	5,1	13,2	49,4
inverno	6,3	5,1	23,1	0,3	9,5	2,8	5,3	47,7
primavera	1,9	4,4	14,4	1,6	3,1	3,8	28,5	42,5

Observando os valores de ARG apresentados é possível perceber uma tendência de elevação na estação verão conforme a altura da planta aumenta, exatamente o contrário do que parece acontecer com a representatividade da ASN, GLN e GLU que diminuem conforme a altura da planta aumenta. Para analisar melhor estes resultados, foi realizado o cálculo de razão entre ASN / ARG e entre a soma de ASN + GLN + GLU / ARG. Os resultados obtidos foram 6,3; 3,7; 1,8 para indivíduos menores que 3 metros, de 3 a 5 metros e maiores de 5 metros, respectivamente na razão ASN / ARG. Para a razão ASN + GLN + GLU / ARG os valores encontrados foram 8,5; 5,4 e 3,4 para indivíduos menores que 3 metros, de 3 a 5 metros e maiores que 5 metros, respectivamente. Estes valores mostram que a entrada de “novo” N na planta tem maior participação nos indivíduos mais jovens em relação aos indivíduos adultos, onde a participação da ARG, aminoácido indicador da remobilização de N na planta tem maior aumento. Aidar *et al.* (2003) mostraram que espécies tardias na sucessão ecológica tendem a utilizar a maior parte do N oriunda da remobilização interna da planta, fato este indicado pela maior participação da ARG transportada na seiva do xilema. Schmidt

& Stewart (1998) afirmam que a presença de ARG na seiva do xilema representa grande parte de N remobilizado dos sítios de proteínas de reserva vegetativa estocada nas plantas. Estas informações deixam claro o papel da ARG como aminoácido indicativo do transporte de N remobilizado na planta.

É curioso lembrar que os indivíduos menores que 3 metros também apresentaram maiores quantidades de aminoácidos livres totais e ureídeos na estação de crescimento. Estes resultados podem estar relacionados com a maior demanda de N necessária a planta para o crescimento da espécie, principalmente em plantas menores.

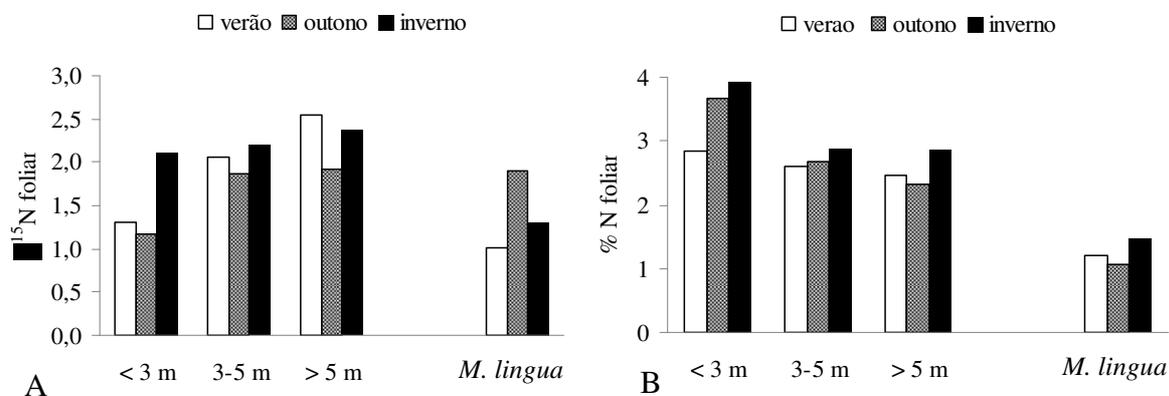
A caracterização da seiva do xilema de indivíduos adultos de *A. falcata*, sugeriu um maior transporte de compostos nitrogenados durante a estação de crescimento, porém a composição de aminoácidos e a quantificação de ureídeos não tornaram possível o diagnóstico da presença de nodulação em plantas de campo, apesar de a maior participação de aminoácidos característicos da entrada de “novo” N na planta poder indicar a maior importância do processo de FBN em indivíduos mais jovens de *A. falcata*, quando a demanda por N é maior.

#### **4.3. Razão isotópica do N estável e determinação da razão C/N em indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata***

A análise isotópica em folhas de indivíduos adultos de *A. falcata* mostrou que indivíduos menores têm menor  $\delta^{15}\text{N}$  (figura 19. A) e maior porcentagem de N foliar (figura 19. B), sugerindo que a FBN ocorre no verão e outono. Já no inverno, o  $\delta^{15}\text{N}$  sobe muito, similar aos outros maiores, sugerindo mobilização de reserva. Os indivíduos maiores que 5 metros mostram valores altos de  $\delta^{15}\text{N}$ , indicando a mobilização de N proveniente de reservas.

É no verão que o  $\delta^{15}\text{N}$  de indivíduos menores de 3 metros mostra-se similar a planta não fixadora *M. lingua*, porém comparando com o outono e inverno o  $\delta^{15}\text{N}$  é bem menor confirmando a possibilidade de a FBN estar ocorrendo nesta estação. Estes resultados confirmam fortemente que a FBN se torna importante fonte de N nos indivíduos mais jovens de *A. falcata*, assim como já sugerido pelos resultados de transporte de N, onde a razão  $\text{GLN} + \text{ASN} + \text{GLU} / \text{ARG}$ , mostrou que a entrada de “novo” N se torna mais importante nos indivíduos mais jovens, pois o aminoácido indicativo da remobilização de reservas (ARG) se torna mais importante em indivíduos maiores. Masclaux-Daubresse *et al.* (2010) afirmam que na maioria das espécies, a eficiência de uso do N depende da forma que as plantas utilizam e que quando a fonte inorgânica é a amônia ou o nitrato a reciclagem de N orgânico toma grande importância. Esta informação indica em indivíduos maiores de *A. falcata* onde o

N proveniente de remobilização se torna evidente pelos dados de  $\delta^{15}\text{N}$ , a principal fonte de N para a planta parece ser o N inorgânico do solo (amônio e nitrato, por exemplo) e que a FBN se torna mais importante nos indivíduos menores, quando a demanda de N é maior.



**Figura 19.** Análise isotópica em folhas de indivíduos adultos de *Anadenanthera falcata* (< 3 metros, 3-5 metros, > 5 metros) e *Mycia língua*, coletadas na Gleba Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. **A.**  $\delta^{15}\text{N}$  foliar; e **B.** Porcentagem de N foliar.

#### 4.4. Experimento controlado com plantas fixadoras e $^{15}\text{N}_2$

Este experimento foi conduzido com a finalidade de verificar em quais aminoácidos houve incorporação de  $^{15}\text{N}$  e assim determinar quais aminoácidos são responsáveis pelo transporte do N proveniente da fixação biológica. Na tabela 5 são apresentadas as porcentagens de plantas que apresentaram incorporação do  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos, tanto na seiva do xilema, quanto nos nódulos radiculares.

A GLN mostrou ser o principal aminoácido responsável pelo transporte do N na seiva de xilema, apresentando 62,5 % das plantas com incorporação. Mas, cabe ressaltar que o restante das plantas correspondentes aos 37,5 % que não incorporaram  $^{15}\text{N}$ , na verdade, foram somente enquadradas nesta categoria, pela impossibilidade de identificar o pico da GLN na análise. Nas plantas que apresentaram enriquecimento, este variou de 1,14 % (uma hora de exposição) a até 8,35 % (duas horas de exposição).

Justino (2009) encontrou dados semelhantes para plantas de soja. Em seu trabalho ficou claro o enriquecimento dos átomos da GLN com  $^{15}\text{N}$  já após 52 minutos de exposição, chegando a valores próximos de 10 % de enriquecimento. Ludwig *et al.* (2003) relatam o enriquecimento dos aminoácidos GLN e ASN na seiva do xilema de plantas de *Pisum sativum* c.v. Avola, inoculadas com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, sendo a GLN de longe a amida que apresentou o maior enriquecimento. Estes dados confirmam os resultados

aqui apresentados mostrando o importante papel da GLN em transportar o N oriundo da fixação biológica.

**Tabela 5.** Incorporação de  $^{15}\text{N}$  em aminoácidos na seiva do xilema e em nódulos radiculares de *Anadenanthera falcata* em experimento controlado com atmosfera enriquecida com  $^{15}\text{N}$  (20%).

	Porcentagem de enriquecimento dos átomos (APE)								
	GLN	ASN	SER	ALA	VAL	ILE	GABA	ASP	GLU
Seiva	1,1 - 8,3	-	1,5 - 2,2	-	-	-	-	1,0	-
Nódulos	3,6 - 8,4	1,1 - 1,5	1,2-1,3	1,1- 2,4	1,1 - 1,4	1,3	1,9 - 2,8	1,6 - 2,0	2,0 - 3,3

Nos nódulos radiculares de angico o enriquecimento da GLN ocorreu em 100 % das plantas submetidas à atmosfera enriquecida de  $^{15}\text{N}_2$ , com enriquecimento dos átomos variando de 3,6 a 10,7 % após uma e duas horas de exposição, respectivamente. Isto comprova que a GLN está envolvida diretamente com o processo de fixação biológica do N em plantas de *A. falcata* e com o transporte deste N para a parte aérea. Outros aminoácidos como ALA, GABA, GLU, ASP e ASN, apresentaram incorporação na maior parte das plantas, porém com enriquecimento de átomos em valores bem menores que a GLN.

Os aminoácidos que apresentaram enriquecimento encontrado nos nódulos de *A. falcata*, também coincidem com os encontrados no trabalho de Prell *et al.* (2009). Os autores relatam que os aminoácidos que apresentaram maior enriquecimento em nódulos foram GLU, ALA, GABA e GLN, ASN, sendo que o alto grau de marcação do GLU e da GLN era esperado, pois eles são produtos diretos da assimilação da amônia, processo catalisado pela GS/GOGAT. O enriquecimento da ASN foi muito menor que em GLN e GLU, provavelmente isto seja reflexo do grande *pool* de ASN, porém sua grande quantidade encontrada não diz realmente se ela é produto da FBN ou do transporte na planta. Esta informação é importante, pois como relatado anteriormente a ASN é o aminoácido de maior representatividade na seiva de angico, no entanto o enriquecimento não foi encontrado.

A ALA, outro aminoácido marcado durante o experimento, segundo Prell *et al.* (2009) pode ser derivada da transaminação ou da assimilação direta via alanina desidrogenase, enzima que apresenta alta atividade em nódulos. Isto explica a sua marcação, na maioria das plantas de *A. falcata*.

## 5. Conclusão

Plantas que adquirem N através apenas da fixação biológica têm desenvolvimento mais lento, em relação às plantas que adquirem N proveniente do solo.

Resultados de RAF e TCR mostram que plantas que adquirem N proveniente da fixação e N disponível no solo investem até um terço da energia destinada ao crescimento em massa na manutenção de nódulos e na fixação biológica, enquanto as que adquirem N apenas da fixação biológica podem investir até metade desta energia na manutenção dos nódulos e no processo de fixação biológica.

*A. falcata* não transporta ureídeos em quantidades suficientes para ser classificada como leguminosa tropical transportadora de ureídeos, ou seja, eles não podem ser utilizados como indicativo da FBN.

Os aminoácidos de maior representatividade na seiva do xilema de angico são as ASN, GLN e o aminoácido ainda não identificado.

A maior representatividade da ARG nos primeiros 90 dias de experimento e sua queda brusca aos 120 dias evidenciam o seu papel no transporte de N oriundo da reserva cotiledonar de proteínas na semente de *A. falcata*.

A glutamina é o principal aminoácido responsável pelo transporte de N proveniente da fixação biológica em *Anadenanthera falcata*, confirmado pelo seu enriquecimento encontrado na seiva e nos nódulos da espécie.

As razões ASN /ARG e ASN + GLN + GLU / ARG mostraram maiores valores nos indivíduos mais jovens (menor altura) na estação verão evidenciando uma maior participação da entrada de “novo” N na planta em indivíduos jovens em relação aos indivíduos adultos, onde a participação de N remobilizado se torna maior demonstrada pela maior representatividade da ARG.

O menor  $\delta^{15}\text{N}$  em plantas menores de 3 metros de indivíduos adultos confirma a importância de utilização do N proveniente da FBN no verão enquanto o N proveniente de remobilização se torna mais importante em indivíduos maiores.

*A. falcata* mostrou competência em fixar N, característica que confere a ela, sucesso em seu ambiente, já que os solos de cerrado são caracterizados por apresentar baixa disponibilidade de N, sendo esta uma vantagem em relação às plantas não fixadoras de N.

## Resumo

O nitrogênio (N) é um dos principais bioelementos, essencial para a estrutura e função de proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos, e muitas outras moléculas vegetais sendo considerado um dos maiores fatores limitantes que influencia na dinâmica, biodiversidade e funcionamento de muitos ecossistemas. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é a mais significativa rota para introdução do N da atmosfera. Em ecossistemas savânicos neotropicais, a principal fonte de N provém da atividade simbiótica da fixação de nitrogênio, pois normalmente os solos são pobres e lixiviados e as formas de N inorgânicas e orgânicas estão pouco disponíveis. Alguns estudos vêm sendo realizados com espécies nativas do cerrado e entre eles é possível encontrar trabalhos sobre o desenvolvimento de nódulos em raízes de Leguminosas como a espécie *Anadenanthera falcata*, espécie de ampla dispersão no cerrado brasileiro, que apresenta nodulação em suas raízes. Este trabalho teve por objetivo estimar a de FBN em plantas jovens e adultas de *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae – Mimosoideae), espécie dominante na gleba Pé-de-Gigante, Parque Estadual do Vassununga, SP, através da caracterização do padrão de transporte de aminoácidos na seiva do xilema de plântulas submetidas a diferentes fontes de N (incluindo a nodulação radicular) e de plantas jovens e adultas em campo; e da estimativa da FBN através do uso de  $^{15}\text{N}_2$  em experimento controlado. O experimento com diferentes fonte de N mostrou que plantas que adquirem N proveniente apenas da FBN têm crescimento mais lento em relação às plantas que adquirem N do solo, apenas. Este experimento também mostrou que os ureídeos não podem ser utilizados como indicativo da presença de FBN e que não há um aminoácido específico correlacionado com o transporte de N oriundo da fixação biológica. Em indivíduos adultos o maior transporte de compostos nitrogenados na seiva do xilema aparece na estação de crescimento, quando a demanda pelo N é maior, além da razão ASN (asparagina) + GLN (glutamina) + GLU (glutamato) / ARG (arginina) evidenciar a maior participação da entrada de “novo” N em indivíduos mais jovens em relação aos indivíduos adultos, onde o transporte de N remobilizado toma grande importância. O experimento controlado com  $^{15}\text{N}_2$  mostrou que o aminoácido GLN é o que apresenta maior enriquecimento, tanto na seiva quanto em nódulos, confirmando sua importância na assimilação do N proveniente da fixação biológica. Desta forma, a espécie *A. falcata* mostrou competência em fixar N biologicamente, porém é necessário o estudo de técnicas eficientes para estimar a entrada de N na planta, proveniente da FBN.

Palavras-chave: *Anadenanthera falcata*, cerrado, fixação biológica de nitrogênio,  $^{15}\text{N}_2$

## Abstract

Nitrogen (N) is a major bioelements essential to the structure and function of proteins, glycoproteins, nucleic acids, and many other plant molecules is considered one of the major limiting factors that influence the dynamics, biodiversity and functioning of many ecosystems. The biological nitrogen fixation (BNF) is the most significant route for release of N from the atmosphere. In neotropical savanna ecosystems, the main source of nitrogen comes from the activity of symbiotic nitrogen fixation, because the soils are usually poor and leached and forms of inorganic and organic N are not readily available. Some studies have been conducted with species native to savanna and among them is possible to find work on the development of nodules on the roots of legumes such as species *Anadenanthera falcata*, a species of wide dispersal in the Brazilian savannah, which has its roots in nodulation. This study aimed to estimate the BNF in juvenile and adult plants of *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae - Mimosoideae), the dominant species on the land-Foot Giant State Park Vassununga, SP, through the characterization of the pattern of amino acid transport in the xylem sap of seedlings under different N sources (including the root nodulation) and juvenile and adult plants in field, the estimation of BNF through the use of  $^{15}\text{N}_2$  in controlled experiment. The experiment with different N source showed that plants acquire N from BNF is only slower growth for the plants acquire soil N, only. This experiment also showed that ureides can not be used as indicative of the presence of BNF and that there is a specific amino acid correlated with the BNF. In adults greater transport of nitrogen compounds in the xylem sap appears in the growing season, when demand for N is greater, beyond reason ASN (asparagine) + GLN (glutamine) + GLU (glutamate) / ARG (arginine) show the largest share of the entry of "new" N in younger subjects compared to adults, where the transport of N remobilized takes great importance. The controlled experiment with  $^{15}\text{N}_2$  showed that the amino acid glutamine is the one with higher enrichment in both sap and nodules, confirming its importance in the assimilation of N from biological fixation. Thus, the species showed *A.falcata* jurisdiction to fix N biologically, but it is necessary to study techniques to estimate the input of plant N derived from the BNF.

**Key-words:** *Anadenanthera falcata*, cerrado, biology nitrogen fixation,  $^{15}\text{N}_2$

## Referências Bibliográficas

- Aidar, M.P.M., Schimidt, S., Moss G., Stewart, G.R. & Joly, C.A.** 2003. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic forest. *Plant Cell and Environment* 26: 389-399.
- Atkins, C.A., Rainbird, R.M. & Pate, J.S.** 1980 Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N<sub>2</sub>-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Z Pflanzenphysiol* 97:(Suppl) 249-260.
- Amarante, L., Lima, J.D. & Sodek, L.** 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species. *Environmental and Experimental Botany* 58: 123-129.
- Apezato-da-Glória, B.** 2003. Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil. Ribeirão Preto: A.S. Pinto. 80 p.
- Boddey, R.M., Peoples, M.B., Palmer, B., & Dart, P.J.** 2000. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 57: 235-270.
- Bollard, E.G.** 1960. Transport in the Xylem. *Annual Review of Plant Physiology* 11: 141-166.
- Bredemeier, C. & Mundstock, C.M.** 2000. Regulação da Absorção e Assimilação do Nitrogênio nas Plantas. *Ciência Rural, Santa Maria* 30 (2): 365-372.
- Bruijn, J.M. & Bout, M.** 2000. HPAEC analysis of amino acids in sugar beet samples: method development and application. *Zuckerindustrie* 125: 604–609.
- Buchmann, M.** 2002. Plant ecophysiology and forest response to global change. *Tree Physiology* 22:1177–1184.
- Bustamante, M.M.C., Martinelli, L.A., Silva, D.A., Camargo, P.B., Klink, C.A., Domingues, T.F. & Santos, R.V.** 2004. <sup>15</sup>N Natural Abundance in Woody Plants and Soils of Central Brazilian Savannas (cerrado). *Ecological Applications* 14: 200-213.
- Bustamante, M.M.C., Medina, E., Asner, G.P., Nardoto, G.B. & Garcia-Montiel, D.C.** 2006. Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. *Biogeochemistry* 79: 209–237.
- Camargos, L.S.** 2007. Alterações no metabolismo de composto nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio efixos na nodulação e na fixação. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

- Campos, M.S. 2009.** Ecofisiologia do uso de nitrogênio em espécies arbóreas da floresta ombrófila densa das terras baixas. Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Cataldo, D.A., Harron, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L., 1975.** Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6:71-80.
- Cordeiro, L.** Fixação de nitrogênio em Leguminosas ocorrentes no cerrado. 2002. In: Klein, A.L. (Org). *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. São Paulo: Editora UNESP, Imprensa Oficial do Estado.
- Cordeiro, L. & Beltrati, C.M.** 1989. Estrutura e desenvolvimento de nódulos radiculares de *Anadenanthera falcata* Speg. (Leg. Mimosoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 12: 61-70.
- Crews, T.E.** 1999. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs. ecological considerations. *Biogeochemistry* 46: 233-246.
- Csiro.** 2008. Global nitrogen fixation distribution - a plant ecology mystery. Disponível em: <http://www.csiro.au/resources/GlobalNitrogenFixation.html> Acesso em: 01 de fevereiro de 2009.
- Dixon, R.O.D. & Wheeler, C.T.** 1986. *Nitrogen fixation in plants*. Glasgow : Backfield. 157 pp.
- Döbereiner, J.** 1990. Avanços Recentes na Pesquisa em Fixação Biológica de Nitrogênio no Brasil. *Estudos Avançados* 4 (8): 144-152.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- Felfili, J.M., Silva, M.C., Rezende, A.V., Machado, J.W.B., Walter, B.M.T., Silva, P.E.N. & Hay, J.D.** 1992. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado *sensu stricto* na Chapada Pratinha, D.F. Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 6: 27-84.
- Ferguson, A.R., Eiseman, J.A. & Leonard J.A.** 1983. Xylem sap from *Actinidia chinensis*: seasonal changes in composition. *Annals of Botany* 51: 823-833.
- Fischer, W.N., André, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Bretkreuz, K. & Frommer, W. B.** 1998. Amino acid transport in plants. *Trends in Plant Science* 3 (5): 188- 195.
- Fidelis, A.T. & Godoy S.A.P.** 2003. Estrutura de um cerrado *stricto sensu* na gleba cerrado Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP. *Acta Botanica Brasilica* 17 (4): 531 – 539.

- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R. & Vorosmarty, C.J.** 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70: 153–226.
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P. & Sutton, M.A.** 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320: 889–892.
- Gehring, C.** 2003. O Papel da Fixação Biológica de Nitrogênio em Floresta Secundária e Primária da Amazônia Central. Alemanha,. 30 p. Tese de Doutorado. Center for Development Research (ZEF) Dept. of Ecology and Resource Management. Faculdade de Agronomia Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- Glyan'ko, A.K., Vasil'eva, G.G., Mitanova, N.B. & Ishchenko, A.A.** The Influence of Mineral Nitrogen on Legume-Rhizobium Symbiosis. *Biology Bulletin* 36 (3): 250–258.
- Godber, I.M. & Parsons, R.** 1998. Translocation of amino acids from stem nodules of *Sesbania rostrata* demonstrated by GC-MS in planta  $^{15}\text{N}$  isotope dilution. *Plant, Cell and Environment* 21: 1089 – 1099.
- González-Ruiz, T., Jaramillo, V.J., Cabriales, J.J.P & Flores A.** 2008. Nodulation dynamics and nodule activity in leguminous tree species of a Mexican tropical dry forest. *Journal of Tropical Ecology* 24: 107–110.
- Graham, P.H.** 2008. Ecology of Root-Nodule Bacteria of Legumes. In: Dilworth, M.J., James E.K., Sprent J.I. & Newton W.E. Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. Nitrogen Fixation: origins, applications and research progress. 402 p.
- Gross, E., Cordeiro, L. & Caetano, F. H.** 2002. Nodule ultrastructure and initial growth of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. var. *falcata* (Benth.) Altschul plants infected with rhizobia. *Annals of Botany* 90: 175-183.
- Gross, E., Cordeiro L., & Caetano, F. H..** 2004. Nodulação e Micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 95-101.
- Grupo de Trabalho do Bioma Cerrado (GTBC).** 2004. Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado – Programa Cerrado Sustentável. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Núcleo dos Biomas Cerrado e Pantanal. 49 p.

- Halbleib, C.M., & Ludden, P.W.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition* 130: 1081-1084.
- Hardy, R.F.W., Holsten, R.D., Jackson, E.J. & Burns, R.C.** 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation. Laboratory and Field Evaluation. *Plant Physiology* 43:1188-1207.
- Herridge, D.** 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiology* 70 1-6.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B. & Boddey, R.M.** 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311:1–18.
- Hoffmann, W.A. & Poorter, H.** 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of Botany* 80: 37-42.
- Hoffman, B.M., Dean, D.R. & Seefeldt, L.C.** 2009. Climbing Nitrogenase: Toward a Mechanism of Enzymatic Nitrogen Fixation. *Accounts of Chemical Research* 42 (5): 609-619.
- Ireland, R.J. & Lea, P.J.** 1999. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. In *Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology*. Edited by Singh, B.K. pp. 49–109.
- Justino, G.C.** 2009. Fixação de nitrogênio em plantas de soja com o sistema radicular alagado. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas.
- Kästner, J. & Blöchl, P.E.** 2005. Model for Acetylene Reduction by Nitrogenase Derived from Density Functional Theory. *Inorganic Chemistry* 44 (13).
- Klink, C.A. & Machado, R.B.** 2005. A Conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade* 1 (1): 147-155.
- Kreibich, H., Kern, J., de Camargo, P.B., Moreira, M.Z., Victória, R.L. & Werner, D.** 2006. Estimation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in an Amazon floodplain forest. *Oecologia* 147: 359-368.
- Layzell, D.B., Rainbird, R.M., Atkins, C.A. & Pate, J.S.** 1979. Economy of photosynthate use in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiology* 64: 888-891.
- Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R. & Halford, N.G.** 2006. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology* 150: 1-26.
- Leitão, M.R.S.M.M.** 1997. Fixação biológica do nitrogênio por espécies arbóreas. In: Vargas M.A.T. & Hungria M. (eds), *Biologia dos solos dos Cerrados*, EMBRAPA-CPAC, Brasília, pp. 155–186.

- Lindemann, W.C. & Glover, C.R.** 2003. Nitrogen fixation by Legumes. Cooperative extension service. College of Agriculture and Homes Economics. New México State University. Guide A-129.
- Lodwig, E.M., Hosie, A.H.F., Dourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J.A. & Poole, P.S.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbioses. *Nature*. 422: 722 – 726.
- McClure, P.R., Israel, D.W. & Volk, R.J.** 1980. Evaluation of the Relative Ureide Content of Xylem Sap as an Indicator of N<sub>2</sub> Fixation in Soybeans. *Plant Physiology* 66: 720-725.
- Macedo, F.M.** 2007. Germinação de sementes, crescimento inicial e preferência no uso de nitrogênio em *Anadenanthera falcata* (benth.) Speng (leguminosae - mimosoideae). Monografia (graduação em Ciências Biológicas). Universidade Metodista de São Paulo, São Paulo.
- Marabesi, M.A.** 2007. Efeito do alto CO<sub>2</sub> no crescimento inicial e na fisiologia da fotossíntese em plântulas *Senna alata* (L.) Roxb. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Martins, M.C.M.** 2007. Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e nitrogênio ao longo do ciclo de vida de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Lee & Lang.). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gauffichon, L. & Suzuki, A.** 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 1-17
- Mendonça, E.H.M.** 2002. Fixação e reações de assimilação de N em *Crotalaria juncea* L. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Mendonça, E.H.M. & Schiavinato, M.A.** 1996. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio mineral no crescimento e nodulação de duas espécies de angico. *Arquivos em Biologia e Tecnologia* 36 (3): 607-611.
- Milanez, C.R.D. & Moraes-Dallaqua, M.A.** 2003. Ontogênese do sistema subterrâneo de *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi (Fabaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 415-427.
- Mittermeier, R.A., Robles-Gil, P., Hoffmann, M., Pilgrim, J.D., Brooks, T. M., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J. L. & Fonseca, G.** 2005. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Mexico City.
- Moreau, D., Voisin, A.S., Salon, C. & Munier-Jolain, N.** 2008. The model symbiotic

- association between *Medicago truncatula* cv. Jemalong and *Rhizobium meliloti* strain 2011 leads to N-stressed plants when symbiotic N<sub>2</sub> fixation is the main N source for plant growth. *Journal of Experimental Botany* 59 (13): 3509–3522.
- Moreno, J. & García-Martínez, J.** 1983. Seasonal variation of nitrogenous compounds in the xylem sap of *Citrus*. *Physiologia Plantarum* 59 (4): 669 – 675.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403 (24): 853-858.
- Nälshon, T., Kielland, K. & Ganeteg, U.** 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182 (1): 31-48.
- Nunes, F.S., Raimondi, A.C. & Niedwieski, A.C.** 2003. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das Nitrogenases. *Química Nova* 26 (6): 872-879.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T.G.A., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R.I., Gamage, H.K., Carroll, B.J., Schenk, P.M. & Schmidt, S.** 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *PNAS* 105 (11): 4524-4529.
- Phoenix, G.K., Hicks, W.K., Cinderby, S., Kuylenstierna, J.C.I., Stock, W.D., Dentener, F.J., Giller, K.E., Austin, A.T., Lefroy, R.D.B., Gimeno, B.S., Ashmore, M.R. & Ineson, P.** 2006. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts *Global Change Biology* 12: 470–476.
- Poorter, H., Remkes C. & Lambers, H.** 1990. Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecologia (Berl.)* 83: 553-559.
- Poorter, H. & Nagel, O.** 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 595-607.
- Prell J., Bourdès A., Karunakaran, R., Lopez-Gomez, M. & Poole, P.** 2009. Pathway of  $\alpha$ -Aminobutyrate Metabolism in *Rhizobium leguminosarum* 3841 and Its Role in Symbiosis. *Journal of Bacteriology* 191 (7): 2177–2186.
- Ribeiro, S.L.C.** 2007. Dinâmica sazonal das trocas gasosas e do potencial hídrico em espécies arbóreas de um Cerrado *sensu stricto* na Gleba Pé-de-Gigante, P.E. Vassununga, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Santos, C.E.R.S., Stamford, N.P., Neves, M.C.P., Runjanek, N.G., Borges, W.L., Bezerra, R.V. & Freitas, A.D.S.** 2007. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 4: 249-256.

- Schmidt, S. & Lamblea, R.E.** 2005. Nutrient dynamics in Queensland savannas: implications for the sustainability of land clearing for pasture production. *The Rangeland Journal* 24: 96-111.
- Schmidt, S. & Stewart, G.R.** 1998. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. *Tree Physiology* 18 : 403-410.
- Schubert, K.R.** 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and Metabolism. *Annual Review Plant Physiology* 37:539-574.
- Silva, J.M.C. & Bates, J.M.** 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical hotspot. *BioScience* 52 (3): 225-233.
- Sodek, L.** 2004. Metabolismo do nitrogênio. In: G.B. Kerbaury (org.), *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 94-113.
- Sprent, J.** 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* 174: 11-25.
- Tajima, S., Nomura, M. & Kouchi, H.** 2004. Ureide Biosynthesis In Legume Nodules. *Frontiers in Bioscience* 9: 1374-1381.
- Taiz, L., Zeiger, E.** 2004. Assimilação dos Nutrientes Minerais. In: \_\_\_\_\_. *Fisiologia Vegetal*, 3<sup>o</sup> edição. Porto Alegre: ArtMed, p.285-307.
- Vance, C.P. & Heichel, G.H.** 1991. Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 42: 373-392.
- Vance, C.P.** 2002. Root–Bacteria Interactions: Symbiotic N<sub>2</sub> Fixation. In: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. *Plant roots: the hidden half*. 3 ed. 1136 p.
- Vessey, J.K. & Bolman, M.I.** 2006. Differential Effects of Nitrate and Ammonium Supply on Nodule Initiation, Development, and Distribution on Roots of Pea (*Pisum sativum*), *Canadian Journal of Botany* 84 (6): 893–903.
- Vitousek, P.M., Chair, J.A., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. & Tilman, G.D.** 1997. Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Causes and Consequences. *Ecological Applications* 7: 737-750.
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L. Rastetter, E.B. & Sprent, J.I.** 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1–45.
- Vogels, G.D., Van Der Drift, C.** 1970. Differential analyses of glyoxylate derivates. *Analytical Biochemistry* 33:143-157.
- Walsh, K.B.** 1995. Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biology and Biochemistry* 27 (4/5): 637-655.

- Werner, R.A. & Schmidt, H.L.** 2002. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry* 61:465-484.
- Wirén, N.V., Gazzarrini, S. & Frommer, W.B.** 1997. Regulation of Mineral Nitrogen Uptake in Plants. *Plant and Soil* 196:191-199.
- Yemm, E.W., Cocking, E.C.** 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80:209-213.
- Zanella, F.** 2004. Feijão-de-porco [*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.] cultivado com diferentes fontes de nitrogênio: fixação de N<sub>2</sub>, fotossíntese e crescimento. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Zilli, J.E.** 2008. Fixação biológica de nitrogênio pode aumentar a competitividade do Agronegócio em RR. EMBRAPA Roraima. Disponível em: [http://www.cpafr.embrapa.br/index.php/cpafr/artigos/fixa\\_o\\_biol\\_gica\\_de\\_nitrog\\_ni\\_o\\_pode\\_aumentar\\_a\\_competitividade\\_do\\_agroneg\\_cio\\_em\\_rr](http://www.cpafr.embrapa.br/index.php/cpafr/artigos/fixa_o_biol_gica_de_nitrog_ni_o_pode_aumentar_a_competitividade_do_agroneg_cio_em_rr). Acesso em: 24 de novembro de 2008.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)