

***Calopogonium caeruleum* apresenta baixa tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato**

Liliane Santos Camargos<sup>1</sup>, Agnis Cristiane Souza<sup>2</sup>, Lucas Anjos Souza<sup>3</sup>, Gilberto Costa Justino<sup>4</sup>, Leandro Ferreira Aguiar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira Departamento de Biologia e Zootecnia

<sup>2</sup> UFMS - Campus de Três Lagoas

<sup>3</sup>UNICAMP - Instituto de Biologia

<sup>4</sup>UFAL - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Email: camargos@bio.feis.unesp.br

**Resumo:** *Calopogonium caeruleum*, tribo Phaseolae, subfamília Papilionoideae, família Leguminosae (Fabaceae), amplamente utilizada na adubação verde e como forrageira. O objetivo desse trabalho foi identificar se a espécie apresenta tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato, inferido pela manutenção da nodulação e pela análise da translocação de ureídeos pela seiva de xilema. Foram estabelecidos dois tratamentos distintos: todas as plantas foram inoculadas e tratadas com solução nutritiva incompleta (sem nitrato) durante três semanas. Posteriormente foram divididas em dois lotes: um recebeu solução nutritiva incompleta, e a outra solução nutritiva completa (com nitrato) num período de aproximadamente 20 dias. Observou-se que plantas +NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram maior número de nódulos em relação aos nódulos presentes em plantas -N. No caso de ureídeos totais as plantas +NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram uma média de 2,40 µmoles/mL enquanto que as plantas - N apresentaram uma média de 4,08 µmoles/mL. Com base no exposto, em *C. caeruleum*, por não ocorrer abandono total da nodulação, a planta se mostrou parcialmente tolerante à presença de nitrato. A translocação de compostos nitrogenados via xilema se manteve elevada em plantas recebendo nitrato, podendo se inferir, pelos níveis de ureídeos presentes, que existe uma aparente tolerância do sistema de fixação à presença de nitrato.

**Palavras-chave:** Fixação de nitrogênio, ureídeos, compostos nitrogenados

***Calopogonium caeruleum* symbiotic system shows low tolerance to the nitrate**

**Abstract:** *Calopogonium caeruleum*, Phaseolae tribe, subfamily Papilionoideae, family Leguminosae (Fabaceae), is widely used in green manure and as forage. The aim of this study was to identify if the species have a symbiotic system's tolerance to the nitrate presence, inferred by the nodulation maintenance and analysis of the ureide translocation in the xylem sap. Two distinct treatments were established: all plants were inoculated and treated with incomplete nutritive solution (without nitrate) for three weeks. Plants were then divided into two groups: one received incomplete nutritive solution, and the other complete nutritive solution (with nitrate) in a period of about 20 days. It was observed that plants receiving NO<sub>3</sub><sup>-</sup> showed a larger number of nodules compared to nodules presented in plant -N. For total xylem ureide there was a significant variation, + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> plants had an average of 2.40 µmoles / mL while the plants - N had an average of 4.08 µmoles / mL. Based on the stated, in *Calopogonium caeruleum*, because there is no abandonment of nodulation, the plant was partly tolerant to the presence of nitrate. The translocation of nitrogenous compounds by xylem kept high in plants receiving nitrate, suggesting by the levels of ureides, that there is an apparent tolerance of the symbiotic system to the presence of nitrate.

**Key-words:** Nitrogen fixation, ureides, nitrogen compounds

### Introdução

A presença de nitrogênio mineral no solo é um dos principais fatores que afeta a nodulação e/ou a fixação (Camargos e Sodek, 2010). Desta forma, a identificação de espécies que apresentem tolerância do sistema de fixação à presença de nitrogênio mineral no meio é um dos primeiros passos para a identificação de quais os mecanismos que estão envolvidos no processo de tolerância ou sensibilidade do sistema simbiótico à presença de nitrato e amônia no solo.

Quando considera-se o efeito sobre a nodulação, a presença de nódulos com aspecto funcional é o fator indicativo; em relação à fixação, vários autores relacionam a presença de ureídeos em seiva de xilema como fator indicativo da fixação biológica (Atkins et al., 1980; Pate et al., 1980; Atkins et al., 1983; Drevon et al., 1988; Schubert, 1986; Streeter, 1988; Dakora et al., 1992; Bacanamwo e Harper, 1997; Bacanamwo e Purcell 1999; Leidi e Rodríguez-Navarro, 2000; Amarante e Sodek, 2006) e que, conseqüentemente, os ureídeos presentes na seiva do xilema podem ser usados como indicadores desta atividade (Herridge e Rose, 2000; Herridge et al., 2005).

A literatura tem reportado casos em que em presença de até 5 mM de nitrato no meio observa-se manutenção da fixação biológica (Betts e Herridge, 1987; Dakora, 1998), sendo que, em soja, por exemplo, a presença de 15 mM de nitrato inibe por completo a nodulação e/ou a fixação (Sodek e Silva, 1996). Camargos e Sodek (2010) identificaram que *Calopogonium mucunoides* apresenta tolerância à presença de 15 mM de nitrato e, mesmo na presença de 30 mM se mantém nodulado e com atividade de N-fixação, ocorrendo apenas uma pequena redução na atividade da enzima nitrogenase.

O *Calopogonium caeruleum*, tribo Phaseolae, subfamília Papilionoideae, família Leguminosae (Fabaceae), é uma leguminosa tropical de ampla distribuição e muito utilizada em adubação verde. Apesar de apresentar crescimento rápido e aparente tolerância à seca (o que foi observado em experimentos preliminares), dados sobre o metabolismo de nitrogênio desta espécie são inexistentes.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar, em *Calopogonium caeruleum*, se há alterações no metabolismo de nitrogênio de plantas completamente dependentes da fixação, quando estas são expostas ao nitrato, com o propósito de identificar espécies que apresentam tolerância do sistema simbiótico à presença do nitrato.

### Material e Métodos

Sementes de *Calopogonium caeruleum* foram fornecidas pela EMBRAPA/CENARGEN, multiplicadas em área experimental e, então, colocadas para germinar em papel de filtro. Após a germinação, as plantas foram transferidas para vasos de com capacidade para 4 L contendo vermiculita, uma planta por vaso, em casa de vegetação sem controle de fotoperíodo, com um máximo de intensidade luminosa em torno de 2050  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  próximo do meio-dia. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de nódulos retirados da mesma espécie, e tratadas com solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1938), com aplicações de 100 mL de solução nutritiva, duas vezes por semana. Foram estabelecidos dois tratamentos: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N) e plantas recebendo 15 mM de nitrato ( $\text{NO}_3^-$  15 mM). Foram realizados cultivos entre o período de janeiro a maio de 2008. As coletas foram realizadas em maio após as plantas atingirem a fase adulta. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento. A seiva de xilema foi coletada segundo descrito por McClure e Israel (1979), em torno de 10:30 a.m. As raízes, as folhas e os nódulos foram separados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a  $-80^\circ\text{C}$  para análises posteriores.

Os compostos nitrogenados foram extraídos conforme descrito por Bielecki e Turner (1966), e quantificados conforme descrito por Yemm e Cocking (1955) Cataldo et al. (1975), Bradford (1976) e Vogels e Van Der Drift (1970), para aminoácidos, nitrato, proteína e ureídeos (totais, alanotina e ácido alantóico), respectivamente. A atividade da enzima nitrato redutase (NR) *in vivo* foi realizada conforme método descrito por Radin (1973). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

A inibição da nodulação e do crescimento dos nódulos (número e massa de nódulos por planta) pela presença de nitrato no meio é bastante conhecida em leguminosas (Streeter, 1988; Glyan'ko et al., 2009). Em *Calopogonium caeruleum*, em estágio vegetativo, a exposição ao nitrato afetou o número e massa dos nódulos, sendo que plantas do tratamento  $+\text{NO}_3^-$  apresentaram maior número e menor massa de nódulos, o que permite inferir que há nodulação, mas com nódulos menores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Nodulação, conteúdo de compostos do metabolismo de nitrogênio e atividade de nitrato redutase (NR) em tecidos de *Calopogonium caeruleum* durante o estágio vegetativo

Tratamento	Nitrato	NRA	ALT	Proteína	Ureídeos totais	Alantoína	Ácido Alantóico	Matéria Fresca de Nódulos	Número de nódulos
Folhas:									
- N	7,75B	19,43B	0,55A	0,84A	9,15A	3,22A	5,93A		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	16,81A	124,73A	0,41A	0,71A	5,41B	3,47A	1,94B		
Raízes:									
- N	5,57B	15,87B	2,04A	0,29A	18,27A	12,41A	5,86A		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8,06A	76,30A	0,77B	0,05B	14,34A	9,24A	5,10A		
Nódulos:									
- N	2,53B	ND	3,72A	0,50A	9,98A	5,52A	4,46A	4,24A	79B
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26,46A	273,99	0,76B	0,41A	4,19B	3,13A	1,06B	1,22B	226A

Os valores são referentes à média de três repetições. Letras iguais para um mesmo parâmetro, dentro de um mesmo estágio de desenvolvimento, não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados expressos em  $\mu\text{M NO}_2^-/\text{gMF}\cdot\text{h}^{-1}$  (atividade de nitrato redutase),  $\text{mg/gMF}$  (proteína) e  $\mu\text{mol/gMF}$  (nitrato, aminoácidos, ureídeos totais, alantoína e ácido alantóico). NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: plantas recebendo 15 mM de nitrato; -N: plantas não expostas ao nitrato. NRA: atividade da enzima nitrato redutase; ALT: aminoácidos livres totais; ND: não detectado.

O fato de as plantas receberem nitrogênio antes e durante a nodulação, não foi um fator limitante para a formação de nódulos, tanto que os dois tratamentos apresentaram nodulação efetiva, isto é, não houve inibição da nodulação. Houve uma variação expressiva no número de nódulos encontrados nos tratamentos, semelhante ao já reportado para *Calopogonium mucunoides* (Camargos e Sodek, 2010). Também foi evidente que o fornecimento de nitrato levou à absorção e metabolização deste, pois pode-se constatar que nas folhas e nos nódulos das plantas que receberam solução nutritiva completa (+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) houve uma maior concentração de nitrato e maior atividade de nitrato redutase, acompanhada por uma redução nos níveis de aminoácidos e de proteínas, evidenciando ser o tecido foliar o sítio preferencial de redução de nitrato. Em feijão comum, foi relatado que o aumento da atividade de NR pode estar relacionado à inibição da fixação e posteriormente da nodulação (Leide e Rodríguez-Navarro, 2000), o que não pode ser aplicado para *Calopogonium caeruleum*, uma vez que a atividade de NR em nódulos mostrou ser estimulada por nitrato o que sugere um efeito positivo deste, onde a planta se manteve nodulada mesmo após 15 dias recebendo nitrato.

Não houve variação no conteúdo de aminoácidos livres totais translocados via xilema (Tabela 2), mas em raízes e nódulos observou-se maior concentração de aminoácidos livres totais no tratamento -N (Tabela 1). As concentrações de proteína total só foram superiores em

raiz, no tratamento -N, sendo que não houve variação entre os tratamentos nos tecidos de folhas e nódulos (Tabela 1).

**Tabela 2.** Conteúdo de compostos do metabolismo de nitrogênio translocados via xilema em *Calopogonium caeruleum* durante o estágio vegetativo

Tratamento	Nitrato	ALT	Ureídeos totais	Alantoína	Ácido Alantóico
Seiva de xilema					
-N	5,60B	1,8A	4,08A	1,85A	2,23A
+NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	60,93A	1,9A	2,40B	1,48A	0,92B

Os valores são referentes à média de três repetições. Letras iguais para um mesmo parâmetro, dentro de um mesmo estágio de desenvolvimento, não diferem pelo teste de Tukey a 5%. Dados expressos em µmol/mL. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: plantas recebendo 15 mM de nitrato; -N: plantas não expostas ao nitrato. ALT: aminoácidos livres totais; ND: não detectado.

Houve variação no conteúdo de ureídeos em tecidos (Tabela 1) e seiva de xilema (Tabela 2), onde o tratamento +NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, apresentou menor concentração de ureídeos totais em folhas, nódulos e seiva de xilema.

Vários autores sugerem que a sensibilidade do sistema de fixação em resposta à seca está relacionado ao acúmulo de ureídeos em tecidos, folhas e nódulos (Sinclair et al. 2003; Purcell et al., 2004; King e Purcell, 2005). Essa hipótese sugere que o aumento de ureídeos ou aminoácidos em folhas ou nódulos coincide com a redução na fixação de nitrogênio e que a recuperação da fixação depende do restabelecimento da concentração inicial dos compostos nitrogenados que regulam a fixação (King e Purcell, 2005). Hussain et al. (1992) relatam, que em soja, no cultivar nts1007, a aplicação de nitrogênio reduziu os teores de alantoína no caule e na raiz; no entanto esta relação não ocorre em *Calopogonium caeruleum*, uma vez que no tratamento sem nitrogênio, a variação de alantoína não é significativa em relação ao que recebeu nitrato. Observando-se os dados, fica evidente o não abandono da nodulação em presença de nitrato, ao contrário do observado em soja, durante o processo de abandono da fixação em resposta à seca (Sinclair et al., 2003; Purcell et al., 2004, King e Purcell, 2005), o que pode ser corroborado pelos níveis de ureídeos observados nos tecidos de *Calopogonium caeruleum* nos dois tratamentos, onde não observou-se variações significativas.

Vários são os trabalhos que demonstram uma relação estreita entre os teores de ureídeos translocados via xilema com a atividade de N-fixação (Atkins et al., 1980; Pate et al., 1980; Atkins et al., 1983; Drevon et al., 1988; Schubert, 1986; Streeter, 1988; Dakora et al., 1992; Bacanamwo e Harper, 1997; Bacanamwo e Purcell, 1999; Leidi e Rodríguez-Navarro, 2000; Amarante e Sodek 2006) e que, conseqüentemente, os ureídeos do xilema podem ser usados como indicadores desta atividade (Herridge e Rose, 2000; Herridge et al., 2005). Nas

leguminosas como soja (Puiatti e Sodek 1999; Amarante e Sodek, 2006) e outras leguminosas, como *Vigna* (Pate et al., 1992) e *Arachis* (Peoples et al., 1991), o nitrato causa uma grande redução nos teores de ureídeos no xilema, reflexo da inibição da fixação de N provocada pelo nitrato, enquanto ocorre aumento de  $\text{NO}_3^-$  nos exsudatos do xilema (Puiatti e Sodek, 1999).

A presença de nitrato também não afetou a forma de ureídeos presente nos tecidos, ou seja, os níveis de alantoína e ácido alantóico, entre os tratamentos. Este comportamento é diferente do observado para *Calopogonium mucunoides*, onde a fonte de nitrogênio mostra não afetar os níveis de ureídeos totais, mas a forma de ureídeo exportado e/ou presente nos tecidos (Camargos e Sodek, 2010).

Em *Calopogonium caeruleum*, a manutenção da alta concentração de compostos nitrogenados (como aminoácidos solúveis totais, ácido alantóico e ureídeos totais) translocados em seiva de xilema de plantas que receberam nitrogênio podem representar um indicativo aparente de eficiência do sistema de fixação na presença de nitrato.

### Conclusões

Embora haja redução na massa dos nódulos, a espécie apresenta tolerância ao nitrato, uma vez que não houve abandono da nodulação. A manutenção da nodulação e da translocação de ureídeos é fator indicativo de tolerância do sistema simbiótico a presença de nitrato.

### Referências

- AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v.50, n.3, p.405-410, 2006.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; GRIFFITHS, G.; WHITE, S.T. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated ( $\text{NO}_3^-$ -grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, n.5, p.978-983, 1980.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; PEOPLES, M.B.; JOY, K.W. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, n.4, p.841-848, 1983.
- BACANAMWO, M.; PURCELL, L.C. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, n.334, p.689-696, 1999.
- BACANAMWO, M.; HARPER, J.E. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n.2, p.371-377, 1997.

BETTS, J.H.; HERRIDGE, D.F. Isolation of soybean lines capable of nodulation and nitrogen fixation under high levels of nitrate supply. **Crop Science**, Madison, v.27, n.6, p.1156-1161. 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n. 1-2, p.248-258, 1976.

BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.17, n.2, p.278-293, 1966.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.6, n.1, p.71-80, 1975.

CAMARGOS, L.S.; SODEK, L. Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. **Symbiosis**, Netherlands, v.51, n.2, p.167-174. 2010.

DAKORA, F.D. Nodule function in symbiotic Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* L.) and Kersting's Bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) is tolerant of nitrate in the root medium. **Annals of Botany**, London, v.82, n. 5, p.687-690. 1998.

DAKORA, F.D.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. Effect of NO<sub>3</sub> on N<sub>2</sub> fixation and nitrogenous solutes of xylem in two nodulated West African geocarpic legumes, Kersting's bean (*Macrotyloma geocarpum* L.) and Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.). **Plant Soil**, Netherlands, v.140, n.2, p.255-262, 1992.

GLYAN'KO, A.K.; VASIL'EVA, G.G.; MITANOVA, N.B.; ISHCHEENKO, A.A. The influence of mineral nitrogen on legume-rhizobium symbiosis. **Biology Bulletin**, New York, v.36, n.3, p.250-258. 2009.

HERRIDGE, D.; ROSE, I. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research**, Netherlands, v.65, n.2-3, p.229-248. 2000.

HERRIDGE, D.F.; ROBERTSON, M.J.; COCKS, B.; PEOPLES, M.B.; HOLLAND, J.F.; HEUKE, L. Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. **Australian Journal of Experimental Agricultural**, Collingwood, v.45, n.2-3, p.269-277. 2005.

HOOGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, University of California Agricultural Experimental Station. 39 p. 1938.

HUSSAIN, A.K.M.A.; YAMAKAWA, T.; IKEDA, M.; ISHIZUKA, J. Effects of nitrogen application on physiological-characteristics of nitrate-tolerant mutants of soybean. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, Kyushu, v.37, n.2, p.139-147. 1992.

KING, C.A.; PURCELL, L.C. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, n.4, p.1389-1396. 2005.

LEIDI, E.O.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. **New Phytologist**, New York, v.147, n.2, p.337-346. 2000.

MCCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.64, n.3, p.411-416. 1979.

PATE, J.S.; ATKINS, C.A.; WHITE, S.T.; RAINBIRD, R.M.; WOO, K.C. Nitrogen, nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v.65, n.5, p.961-965. 1980.

PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; CHONG, K.; FAIZAH, A.W.; SURATMINI, P.; NURHAYATI, D.P.; BAGNALL, D.J.; BERGERSEN, F.J. Re-evaluation of the role of ureides in xylem transport of nitrogen in *Arachis* species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n.4, p.560-567. 1991.

PUATTI, M. **Mecanismos envolvidos na inibição da nodulação e fixação de N<sub>2</sub> pelo NO<sub>3</sub>- em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Santa Rosa) cultivadas em hidroponia**: Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1997. 222f. (Tese - Doutorado em Biologia Vegetal).

PURCELL, L.C.; SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R.; DE, A. Soybean N<sub>2</sub> fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. **Crop Science**, Madison, v.44, n.2, p.484-492. 2004.

RADIN, J.W. "In vivo" assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. **Plant Physiology**, Rockville, v.51, n.2, p.332-336, 1973.

SCHUBERT, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.539-574. 1986.

SINCLAIR, T.R.; VADEZ, V.; CHENU, K. Ureide accumulation in response to Mn nutrition by eight soybean genotypes with N<sub>2</sub> fixation tolerance to soil drying. **Crop Science**, Madison, v.43, n.2, p.592-597. 2003.

SODEK, L.; SILVA, D.M. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.8, n.1, p.187-191. 1996.

STREETER, J.G. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. **CRC Critical Review of Plant Science**, Philadelphia, v.7, n.1, p.1-23, 1988.

VOGELS, G.D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.33, n.1, p.143-157, 1970.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, Cambridge, v.80, n. 948, p.209-213, 1955.

---

**Recebido para publicação em:** 12/11/2012

**Aceito para publicação em:** 21/12/2012