

# O nitrato influencia o metabolismo de compostos nitrogenados em calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) ao longo do ciclo de vida

**Regiane Aparecida Canatto**<sup>1</sup>

**Leandro Ferreira Aguiar**<sup>1</sup>

**Gilberto Costa Justino**<sup>2</sup>

**Lucas Anjos Souza**<sup>3</sup>

**Liliane Santos Camargos**<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas  
Avenida Ranulpho Marques Leal, 3484, Distrito Industrial, CEP 79601-100, Três Lagoas □MS, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Alagoas, Campus de Maceió, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
CEP 57010-020, Maceió □AL, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia  
Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas □SP, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira  
Avenida Brasil, 56, Centro, CEP 15385-000, Ilha Solteira □SP, Brasil

\* Autor para correspondência  
camargos@bio.feis.unesp.br

Submetido em 08/04/2013

Aceito para publicação em 13/12/2013

## Resumo

Em *Calopogonium mucunoides*, o metabolismo de nitrogênio foi significativamente alterado entre os diferentes estágios de desenvolvimento das plantas. Ao longo do ciclo de vida, mesmo na presença de nitrato, a planta manteve-se nodulada e altas concentrações de ureídeos foram identificadas nos tecidos e seiva de xilema, evidência de que a espécie é tolerante ao nitrato e que este não afeta a fixação de nitrogênio ao longo do desenvolvimento. A redução bioquímica de nitrato apresenta alterações ao longo do ciclo de vida, com mudança no sítio de redução junto com mudanças na concentração de aminoácidos solúveis totais. No entanto, a atividade de nitrato redutase constitutiva em nódulos desaparece com a exposição ao nitrato.

**Palavras-chave:** Leguminosa; Ureídeos; Nodulação

## Abstract

**Nitrate influences the metabolism of nitrogenous compounds in calopo (*Calopogonium mucunoides*) throughout the life cycle.** In *Calopogonium mucunoides*, nitrogen metabolism was significantly altered between the various plant development stages. Throughout the life cycle, even in the presence of nitrate, the plant kept itself nodulated and high ureide concentrations were identified in xylem tissues and sap, evidencing that the species is tolerant to nitrate and that this does not affect nitrogen fixation over development. Nitrate biochemical reduction presents alterations throughout the life cycle, with change in the reduction site along with changes in total soluble amino acid concentrations. However, constitutive reductase nitrate activity in nodules disappears with the exposition to nitrate.

**Key words:** Legume; Ureides; Nodulation

## Introdução

O nitrogênio (N) é o quarto elemento mais requerido para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois ele é componente estrutural de moléculas fundamentais como aminoácidos, bases nitrogenadas, fitormônios e clorofila. Embora o nitrogênio molecular ( $N_2$ ) seja o gás mais abundante da atmosfera, os organismos eucariontes não possuem mecanismos para utilização dessa forma de N, pois o  $N_2$  é uma molécula altamente estável. Sendo assim, o crescimento e desenvolvimento vegetal podem ser limitados pela reduzida disponibilidade deste elemento nos solos (KAMBATUKU et al., 2013).

O  $N_2$  só pode ser utilizado por organismos procariontes. Alguns destes organismos (*Rhizobium*) têm a capacidade de associarem-se às raízes de leguminosas, formando nódulos fixadores de  $N_2$  (LING et al., 2013). Entretanto, o nódulo entra em processo de senescência na presença de nitrato ( $NO_3^-$ ), uma vez que a planta passa a absorver preferencialmente este nutriente do solo. O  $NO_3^-$  absorvido pelas raízes é reduzido à amônia ( $NH_3$ ) a partir da atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) e, posteriormente, incorporado em compostos orgânicos pela via GS/GOGAT (MOKHELE et al., 2012). Plantas de climas tropicais fixando  $N_2$  tendem a sintetizar e transportar ureídeos, mas como o  $NO_3^-$  é um potente inibidor da fixação biológica de nitrogênio (FBN), em plantas noduladas, sua influência sobre esse último processo pode ser aferida pelo nível de ureídeos transportados pelo xilema, ótimos indicadores da FBN (LEIDI; RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2000; AMARANTE; SODEK, 2006; CAMARGOS; SODEK, 2010).

De acordo com revisão realizada por Liu et al. (2011), a presença de N mineral na rizosfera reduz a nodulação, o estabelecimento do nódulo e a atividade da enzima nitrogenase. Os danos ao aparato de fixação dependem da concentração de N no solo e, aparentemente, concentrações menores do que 2 mM de N combinado parecem não prejudicar as taxas de FBN. Entretanto, níveis superiores a 2 mM podem causar prejuízos à simbiose ou à FBN. A capacidade de fixar  $N_2$  na presença de altas doses de  $NO_3^-$  é uma importante característica e foi descrita para a espécie

*Calopogonium mucunoides* (CAMARGOS; SODEK, 2010). *Calopogonium mucunoides* é uma leguminosa típica de cerrado, utilizada como adubo verde e forrageira e que, apresenta alta capacidade de fixação de  $N_2$  (CAMARGOS; SODEK, 2010). Além disso, apresenta fácil adaptação a solos de baixo pH e pouco férteis, com altos níveis de alumínio tóxico (MEDA; FURLANI, 2005).

Como a absorção e assimilação de N e o acúmulo de compostos nitrogenados nos tecidos vegetais são fortemente regulados pela fonte e disponibilidade desse nutriente no solo (WILLIAMS; MILLER, 2001), o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito do  $NO_3^-$  sobre a nodulação e manutenção da FBN, bem como identificar possíveis alterações do sítio de redução de  $NO_3^-$  e sua relação com os níveis endógenos de compostos nitrogenados em três estágios diferentes do ciclo de vida de *C. mucunoides*.

## Material e Métodos

### Estabelecimento e coleta do experimento

As sementes de *C. mucunoides* foram germinadas em papel filtro, e as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 4 L contendo vermiculita, sendo que cada vaso recebeu apenas uma planta. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de nódulos retirados da mesma espécie, e tratadas com solução nutritiva de Hoagland modificada sem N (HOAGLAND; ARNON, 1938) para estabelecimento da simbiose, com aplicações de 100 mL, duas vezes por semana, e regadas diariamente. Assim, 20 dias após a inoculação foram estabelecidos dois tratamentos: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (sem N) e plantas recebendo solução nutritiva suplementada com nitrogênio ( $NO_3^-$  15 mM). Foram utilizadas três repetições para cada estágio analisado, sendo coletadas três plantas de cada tratamento (com e sem nitrogênio). As plantas foram coletadas nos seguintes intervalos: estágio vegetativo □ 45 dias após tratamento (E1), estágio reprodutivo □ 60 a 70 dias após tratamento (E2),

estágio de frutificação/formação de sementes – 90 dias após tratamento (E3). As folhas, raízes e nódulos foram coletados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para análises de quantificação de compostos nitrogenados.

### Extração de compostos nitrogenados

Através do método descrito em Bielecki e Turner (1966) os compostos nitrogenados foram extraídos para as análises de compostos solúveis. Para 0,5 g de material fresco, acrescentou-se 5 mL de MCW (60% metanol, 25% clorofórmio, 15% de água; v/v/v). O material foi triturado com auxílio de um almofariz de porcelana e em seguida centrifugado. Após a centrifugação, acrescentou-se 1 mL de clorofórmio + 1,5 mL de água, para cada 4 mL de sobrenadante. Aguardou-se a separação de fases e utilizou-se a fase hidrossolúvel para análise de compostos nitrogenados: aminoácidos totais, ureídeos (alantoína e ácido alantoico) e nitrito.

O precipitado foi ressuscitado em solução NaOH 0,1 M, a uma relação de 10 mL de solução para cada grama de amostra (tecido fresco); após homogeneização, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para quantificação de proteínas.

### Quantificação de compostos nitrogenados

O conteúdo de aminoácidos, nitrito, ureídeos (alantoína e ácido alantoico) e proteína total foram quantificados segundo a metodologia descrita em Yemm e Cocking (1955), Cataldo et al. (1975), Vogels e Van der Drift (1970) e Bradford (1976), respectivamente.

### Análise da atividade enzimática

A atividade, *in vivo*, da nitrito redutase (NR) foi realizada conforme o método descrito por Radin (1973). Os tecidos coletados foram infiltrados à vácuo em uma solução de tampão fosfato 0,1 M, contendo 100 mM de nitrito, em pH 7,5. O ensaio foi incubado no escuro por uma hora e após, o conteúdo de nitrito foi quantificado utilizando-se sulfanilamida 1% em HCl e naftiletlenodiamina 0,02%.

### Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi organizado em esquema fatorial inteiramente casualizado 2 x 3 (presença e ausência de nitrito x 3 estágios de desenvolvimento) com três repetições por tratamento, sendo que uma planta por vaso foi considerada para cada parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR®.

## Resultados

### Efeito do nitrito sobre atividade da enzima nitrito redutase (E.C. 1.6.6.1) e teor de nitrito livre em diferentes estágios fenológicos

Folhas: a atividade da enzima nitrito redutase foi afetada ao longo dos estágios fenológicos no tratamento suplementado com nitrito enquanto que no tratamento não suplementado por nitrito não houve variações na atividade dessa enzima; a suplementação de nitrito na solução nutritiva apenas influenciou positivamente a atividade de nitrito redutase durante o crescimento vegetativo (E1) (Tabela 1). O teor de nitrito foi menor em plantas não suplementadas com nitrito (Tabela 1).

Raízes: a atividade da enzima nitrito redutase diminuiu ao longo dos estágios fenológicos no tratamento suplementado com nitrito enquanto que no tratamento não suplementado por nitrito não houve variações na atividade dessa enzima. A suplementação com nitrito na solução nutritiva apenas influenciou a atividade da nitrito redutase durante o crescimento vegetativo (E1) (Tabela 2). O teor de nitrito aumentou ao longo dos estágios fenológicos em ambos os tratamentos (Tabela 2).

A suplementação com nitrito na solução nutritiva apenas influenciou a atividade da nitrito redutase durante o crescimento vegetativo (E1) (Tabela 2).

TABELA 1: Atividade da enzima redutase do nitrato (NR), concentração de nitrato, aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, ureídeos totais, alantoína e ácido alantoico em folhas de *Calopogonium mucunoides* em diferentes estágios de desenvolvimento: estágio vegetativo (E1), de florescimento (E2) e de frutificação (E3). Tratamentos com nitrato (+) e sem nitrato (-). Dados expressos em  $\mu\text{molar}$  de nitrito/ gMFh para NR; mg/gMF para proteínas; e  $\mu\text{moles/gMF}$  para nitrato, aminoácidos, ureídeos, alantoína e ácido alantoico. Letras maiúsculas comparam os estágios de desenvolvimento da planta, enquanto que letras minúsculas comparam condição de nitrato (+) ou (-) dentro de cada estágio.

FOLHA				
Estágio				
		E1	E2	E3
NR	+	976,80 Aa	376,33 Ba	473,00 Ba
	-	150,00 Ab	308,61 Aa	389,80 Aa
Nitrato	+	57,94 Aa	40,0 Ba	43,00 Aba
	-	5,98 Ab	3,85 Ab	4,35 Ab
Aminoácidos	+	0,46 Aa	1,28 Aa	0,70 Aa
	-	1,08 Aa	0,88 Aa	0,81 Aa
Proteínas	+	0,10 Aa	0,12 Aa	0,29 Aa
	-	0,14 Aa	0,13 Aa	0,17 Aa
Ureídeos	+	15,92 Aa	22,91 Aa	12,62 Aa
	-	24,12 Aa	14,16 ABb	10,72 Ba
Alantoína	+	8,70 Aa	11,54 Aa	7,78 Aa
	-	12,41 Aa	8,06 Aa	9,05 Aa
Ácido Alantoico	+	7,22 ABa	11,36 Aa	4,28 Ba
	-	11,71 Aa	6,10 ABb	1,67 Ba

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 2: Atividade da enzima redutase do nitrato (NR), concentração de nitrato, aminoácidos solúveis totais, proteínas totais, ureídeos totais, alantoína e ácido alantoico em raízes de *Calopogonium mucunoides* em diferentes estágios de desenvolvimento: estágio vegetativo (E1), de florescimento (E2) e de frutificação (E3). Tratamento com nitrato (+) e sem nitrato (-). Dados expressos em  $\mu\text{mol}$  de nitrito/g/h para NR; mg/g MF para proteínas; e  $\mu\text{mol/g MF}$  para nitrato, aminoácidos solúveis totais, ureídeos, alantoína e ácido alantoico. Letras maiúsculas comparam as médias entre os estágios de desenvolvimento da planta, enquanto que letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos com nitrato (+) ou sem nitrato (-) dentro de cada estágio de desenvolvimento.

RAIZ				
Estágio				
		E1	E2	E3
NR	+	225,21 Aa	111,27 Ba	87,45 Ba
	-	54,40 Ab	48,16 Aa	54,00 Aa
Nitrato	+	2,76 Ba	2,61 Ba	12,58 Aa
	-	1,79 Ba	1,67 Ba	8,29 Ab
Aminoácidos	+	0,53 Aa	0,65 Aa	1,15 Aa
	-	0,80 Aa	0,15 Aa	0,22 Ab
Proteínas	+	0,11 Aa	0,05 Aa	0,04 Aa
	-	0,03 Aa	0,04 Aa	0,10 Aa
Ureídeos	+	11,47 Bb	17,16 ABb	19,75 Aa
	-	19,73 Aa	22,37 Aa	23,45 Aa
Alantoína	+	6,83 Ba	12,49 Ab	13,2 Aa
	-	10,60 Ba	17,09 Aa	15,75 Aa
Ácido Alantoico	+	4,63 Ab	4,68 Aa	6,55 Aa
	-	9,12 Aa	5,27 Aa	7,70 Aa

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Nódulos: a atividade de NR foi maior no estágio E3 que nos estágios E1 e E2 em ambos os tratamentos e apresentou diferença entre os tratamentos apenas no estágio E3.

### Efeito do nitrato sobre a concentração de compostos nitrogenados em diferentes estágios fenológicos

Folhas: variações ao longo do ciclo de vida foram observadas apenas no teor de ureídeos totais e ácido alantoico; enquanto que em relação aos tratamentos com e sem nitrato o teor de ureídeos totais e ácido alantoico foi maior no que recebeu nitrato, enquanto que o teor de

aminoácidos, proteínas e alantoína não foram afetados pela suplementação com nitrato (Tabela 1).

Raízes: variações ao longo do ciclo de vida foram observadas no teor de ureídeos totais e alantoína em ambos os tratamentos; já o teor de aminoácidos, ureídeos totais e ácido alantoico variaram em função da fonte de nitrogênio em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 2).

Nódulos: todos os compostos nitrogenados avaliados variaram em função do estágio de desenvolvimento; já variações em função da fonte de nitrogênio utilizada foram observadas apenas nos teores de aminoácidos e proteínas nos estágios E1 e E3 (Tabela 3).

TABELA 3: Atividade da enzima redutase do nitrato (NR), concentração de nitrato, aminoácidos solúveis totais, proteínas totais, ureídeos totais, alantoína, ácido alantoico e massa fresca em nódulos de *Calopogonium mucunoides* em diferentes estágios de desenvolvimento: estágio vegetativo (E1), de florescimento (E2) e de frutificação (E3). Tratamento com nitrato (+) e sem nitrato (-). Dados expressos em  $\mu\text{mol}$  de nitrato/g/h /g/h para NR; mg/g MF para proteínas; g/MF para massa fresca de nódulos; e  $\mu\text{mol/g}$  MF para nitrato, aminoácidos solúveis totais, ureídeos, alantoína e ácido alantoico. Letras maiúsculas comparam as médias entre os tratamentos com nitrato (+) ou sem nitrato (-) dentro de cada estágio de desenvolvimento.

NÓDULO				
Estágio				
		E1	E2	E3
NR	+	0,00 Ba	3,58 Ba	110,43 Aa
	-	0,00 Ba	18,59 ABa	59,08 Ab
Nitrato	+	9,55 Ba	22,13 Aa	11,40 Ba
	-	5,06 Aa	6,30 Ab	7,75 Aa
Aminoácidos	+	3,43 Aa	1,64 Ba	1,81 Ba
	-	1,42 Ab	1,52 Aa	1,44 Aa
Proteínas	+	0,22 Ba	0,32 Aa	0,26 Ab
	-	0,14 Bb	0,26 Aa	0,33 Aa
Ureídeos	+	71,59 Aa	47,59 Ba	51,37 Ba
	-	75,34 Aa	50,68 Ba	60,00 Ba
Alantoína	+	26,31 Aa	28,81 Aa	29,62 Aa
	-	31,31 ABa	27,30 Ba	35,38 Aa
Ácido Alantoico	+	45,37 Aa	18,75 Ba	21,66 Ba
	-	44,03 Aa	23,38 Ba	24,62 Ba
Massa fresca	+	1,30 Ab	1,71 Aa	1,20 Ab
	-	2,43 Aa	2,03 Aa	2,22 Aa

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## Discussão

A redução de nitrato a amônia é um processo que envolve intenso gasto energético, sendo integrado ao fluxo de carbono assimilado pela fotossíntese, garantindo a manutenção de um crescimento ótimo (REDA, 2013). Os sítios mais adaptados à redução de nitrato são os tecidos fotossintetizantes (WALLACE, 1986). O nitrato é então reduzido a nitrito com gasto de dois elétrons e transferido ao cloroplasto onde é reduzido à amônia com gasto de seis elétrons. Os elétrons utilizados na redução de nitrato no citosol podem ser supridos pelo malato/oxaloacetato, tendo sido este mecanismo observado em *Chlamydomonas reinhardtii* (QUESADA et al., 2000). A redução de nitrato em tecidos não-fotossintetizantes tem sido amplamente reportada na literatura (ROBIN et al., 1979; OLIVER et al., 1983; WALLACE, 1986; CABA et al., 1995; PIWPUAN et al., 2013), entretanto, ainda não está claro como o nitrato é reduzido em tecidos não-fotossintetizantes dada a demanda de elétrons para a fosforilação oxidativa. Possivelmente, os níveis de compostos nitrogenados podem modular a atividade da enzima redutase do nitrato (NR) e a variação durante o ciclo de vida das plantas pode auxiliar no entendimento sobre a redução de nitrato em tecidos não-fotossintetizantes. Esta enzima é tipicamente induzida pelo substrato (DIAS et al., 2011) e quando sua atividade foi verificada em plantas que não receberam nitrato como fonte de nitrogênio, foi sugerida a presença de uma isoforma constitutiva da enzima (ANDREWS et al., 1990). Por outro lado, plantas que foram tratadas com solução nutritiva contendo nitrato ( $\text{NO}_3^-$  15 mM), o aumento da atividade da enzima nitrato redutase foi correlacionado com a absorção e o transporte de nitrato pela planta, o que aumentou a sua redução e incorporação no organismo (CAMARGOS; SODEK, 2010).

Os dados obtidos neste trabalho evidenciaram a modulação da atividade da enzima NR em função da presença do nitrato no meio. A análise dos resultados apontou para uma redução de nitrato preferencialmente na parte aérea. A participação efetiva das folhas na redução do nitrato em *C. mucunoides* foi evidente em todos os estágios de crescimento avaliados. Assim, de acordo com

o presente estudo, a atividade da NR foi induzida pelo substrato, como verificado em outras plantas recebendo nitrato como fonte de nitrogênio (TISCHNER, 2000; PIWPUAN et al., 2013). A preferência da espécie em reduzir nitrato na parte aérea foi verificada, inclusive em plantas que não foram tratadas com nitrato, indicando, portanto, existência de atividade de uma isoforma constitutiva de NR (ANDREWS et al., 1990).

Em estágio vegetativo, as folhas foram o sítio preferencial de redução de nitrato, o que já foi observado em *C. mucunoides* por Camargos e Sodek (2010). Este resultado já foi reportado para outras espécies tropicais, como *Canavalia ensiformes*, em que, durante o estágio vegetativo, o nitrato é reduzido preferencialmente em folhas (CAMARGOS et al., 2006). Entretanto, em *Arabidopsis thaliana*, a atividade de NR mostrase incrementada em raiz durante a fase inicial de desenvolvimento, alterando-se ao longo do ciclo de vida, sendo esta resposta acompanhada inversamente pelo incremento de glutamato livre (FORDE; WALCH-LIU, 2009), já em plântulas de *Juglans nigra* (espécie de arbórea), o nitrato é transportado à parte aérea, via xilema, sendo as folhas o principal órgão responsável pela redução do nitrato (NICODEMUS et al., 2008).

No estágio reprodutivo, a atividade de NR foliar continuou sendo o principal sítio de redução do nitrato. Entretanto, a atividade não foi diferente daquela verificada em plantas que não receberam nitrato.

Foi observado que, no estágio reprodutivo, a redução da atividade de NR em folhas, foi acompanhada por um alto nível de ureídeos, em plantas tratadas com nitrato. Da mesma forma, as raízes apresentaram uma redução na atividade desta enzima nessa fase e um aumento substancial dos teores de ureídeos. Em nódulos o oposto foi observado, pois o aumento da atividade de NR foi acompanhado pela redução dos teores de ureídeos. Assim, ao avaliar o acúmulo de ureídeos totais em tecidos ao longo do ciclo de vida, verificou-se a redução nos níveis endógenos de ureídeos presentes nos tecidos durante a fase reprodutiva, com exceção de raízes, onde os níveis de ureídeos foram maiores no estágio de frutificação. Quiles et al. (2009) observaram, em feijão (*Phaseolus vulgaris*), que os níveis de ureídeos totais variaram ao longo desenvolvimento das plântulas,

onde no início da germinação os níveis de ureídeos foram encontrados principalmente em cotilédones, e após o desenvolvimento da radícula, os teores de ureídeos distribuíram-se igualmente nos cotilédones e eixo embrionário.

Outro ponto a ser mais explorado é a influência da forma de ureídeo presente no tecido ou exportado via xilema. Ao longo do ciclo de vida da planta observou-se que ocorreu alteração na forma de ureídeo especialmente nos tecidos de nódulos, onde na fase vegetativa verificou-se presença predominante de ácido alantoico enquanto na fase de frutificação alantoína foi a forma predominante. Hussain et al. (1992) observaram que em soja, a aplicação de nitrogênio reduziu os teores de alantoína no caule e na raiz, no entanto em *C. mucunoides*, este efeito não ocorreu, configurando uma forte evidencia da capacidade da planta em fixar nitrogênio mesmo na presença de nitrato.

A partir dos resultados foi possível concluir que a redução do nitrato em plantas de *Calopogonium mucunoides* noduladas pode ser influenciada pela alteração fonte-dreno durante o desenvolvimento. Inicialmente, os nódulos, drenos fortes, apresentaram maior acúmulo de aminoácidos e atividade residual da enzima nitrato redutase; e no estágio reprodutivo, quando os frutos passaram a atuar como drenos, a atividade da NR dos nódulos aumentou, significativamente, um mecanismo para atender a demanda de compostos nitrogenados, o que foi acompanhado pela redução dos teores de aminoácidos e ureídeos nestes órgãos. A relação parece ser bastante forte, pois mesmo em nódulos de plantas que não receberam nitrato, a atividade da enzima nitrato redutase aumentou e foi, novamente, acompanhada da diminuição dos teores de aminoácidos e ureídeos. Plantas de *C. mucunoides* parecem potencializar a utilização do N mineral mesmo nos nódulos, sítio da redução do N<sub>2</sub>. O estudo da composição de aminoácidos livres torna-se importante para a compreensão dos mecanismos de regulação da atividade da NR durante o crescimento e o desenvolvimento desta espécie, sem que ocorra a inibição da atividade de fixação biológica de nitrogênio.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro recebido da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brasil, processo nº 2010/05299-6), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil, processo nº 470160/2003-9 e processo nº 473594/2007-2) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-Brasil, processo nº 41/100.098/2006). Regiane Aparecida Canatto recebeu bolsa (PIBIC/CNPq/UFMS-Brasil).

## Referências

- AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, n. 3, p. 405-410, 2006.
- ANDREWS, M.; DEFARIA, S. M.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Constitutive nitrate reductase activity in the leguminosae. **Phytochemistry**, New York, v. 29, n. 1, p. 49-54, 1990.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CABA, J. M.; LLUCH, C.; LIGERO, F. Distribution of nitrate reductase activity in *Vicia faba*: Effect of nitrate and plant genotype. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 93, n. 4, p. 667-672, 1995.
- CAMARGOS, L. S.; AGUIAR, L. F.; AZEVEDO, R. A. Site of nitrate reduction in jack bean (*Canavalia ensiformis*) changes from leaf to root during development. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 34, n. 2, p. 131-137, 2006.
- CAMARGOS, L. S.; SODEK, L. Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 51, p. 167-174, 2010.
- CATALDO, D. A.; HARRON, 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**, New York, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- DIAS, T.; NETO, D.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A.; SHEPPARD, L.; CRUZ, C. Patterns of nitrate reductase activity vary according to the plant functional group in a Mediterranean maquis. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 347, n. 1-2, p. 363-376, 2011.
- FORDE, B. G.; WALCH-LIU, P. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 682-693, 2009.

- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California Agricultural Experimental Station, 1938. 39 p.
- 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.
- KAMBATUKU, R. J.; CRAMER, M. D.; WARD, D. Nitrogen fertilization reduces grass-induced N<sub>2</sub> fixation of tree seedlings from semi-arid savannas. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 365, n. 1-2, p. 307-320, 2013.
- 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.
- LING, J.; ZHENG, H.; KATZIANER, D. S.; WANG, H.; ZHONG, Z.; JUN ZHU, J. Applying reversible mutations of nodulation and nitrogen-fixation genes to study social cheating in *Rhizobium* -legume interaction. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013.
- LIU, Y.; WU, L.; BADDELEY, J. A.; WATSON, C. A. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. **Agronomy for Sustainable Developmental**, Paris, v. 31, n. 1, p. 155-172, 2011.
- MEDA, A. R.; FURLANI, P. R. Tolerance to aluminum toxicity by tropical leguminous plants used as cover crops. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 309-317, 2005.
- MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Review: nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 92, n. 3, p. 399-405, 2012.
- NICODEMUS, M. A.; SALIFU, F.; JACOBS, D. F. Nitrate reductase activity and nitrogen compounds in xylem exudate of *Juglans nigra* seedlings: relation to nitrogen source and supply. **Trees - Structure and Function**, Berlin, v. 22, n. 5, p. 685-695, 2008.
- OLIVER, A. J.; SMITH, S. E.; NICHOLAS, D. J. D.; WALLACE, W. Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*. Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **New Phytologist**, New York, v. 94, n. 1, p. 63-79, 1983.
- PIWPUAN, N.; ZHAI, X.; BRIX, H. Nitrogen nutrition of *Cyperus laevigatus* and *Phormium tenax*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, nitrate reductase activity and N uptake kinetics. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 42-51, 2013.
- QUESADA, A.; GOMEZ-GARCIA, L.; FERNÁNDEZ, E. Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 463-464, 2000.
- QUILES, F. A.; RASO, M. J.; PINEDA, M.; PIEDRAS, P. Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 135, n. 1, p. 19-28, 2009.
- RADIN, J. W. "In vivo" assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 51, n. 2, p. 332-336, 1973.
- REDA, M. Regulation of nitrate reduction in Arabidopsis WT and hck1 mutant under C and N metabolites. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 149, n. 2, p. 260-272, 2013.
- ROBIN, P.; BLAYAC, D.; SALSAC, L. Influence de l'alimentation nitrique sur la teneur en nitrate et l'activité nitrate réductase des racines et les feuilles de plantules de maïs. **Physiologie Végétale**, Paris, v. 17, n. 1, p. 55-66, 1979.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 2, n. 10, p. 1005-1024, 2000.
- VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 33, n. 1, p. 143-157, 1970.
- WALLACE, W. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and comparison with wheat. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 66, n. 4, p. 630-636, 1986.
- WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, Cambridge, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.