

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

Liliane Santos de Camargos

***Calopogonium mucunoides*, um modelo de estudo para estresses abióticos em
climas tropicais.**

Ilha Solteira
2017

Liliane Santos de Camargos

***Calopogonium mucunoides*, um modelo de estudo para estresses
abióticos em climas tropicais.**

Documento apresentado à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Livre-Docente em Fisiologia do Metabolismo Vegetal do Departamento de Biologia e Zootecnia.

Ilha Solteira
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C172c Camargos, Liliane Santos.
Calopogonium mucunoides, um modelo de estudo para estresses abióticos em climas tropicais / Liliane Santos Camargos. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2017
59 f.

Tese (Livre-Docência) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Fisiologia Vegetal, 2017

Inclui bibliografia

1. Botânica. 2. Fisiologia vegetal. 3. Metabolismo vegetal.

Liliane Santos de Camargos

Calopogonium mucunoides, um modelo de estudo para estresses
abióticos em climas tropicais

**Documento apresentado à Faculdade de Ilha Solteira – UNESP,
como parte dos requisitos para obtenção do título de Livre-Docente
em Fisiologia do Metabolismo Vegetal do Departamento de Biologia
e Zootecnia.**

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Diolina Moura Silva

Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior

Prof. Dr. José Pires de Lemos Filho

Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida

Prof. Dr. Sérgio Luís de Carvalho

Ilha Solteira, 07 de junho de 2018.

À minha filha, Júlia, por compreender que a maternidade não é um fim em si mesmo;

Ofereço

Ao professor Ladaslav Sodek,
exemplo de profissional e de ser humano, em quem me inspiro diariamente
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A docência é uma das atividades com maior potencial de transformação do ser humano: transforma quem ensina e transforma quem aprende. Devo muito aos bons docentes que passaram por minha vida (e também aos “não tão bons”: estes me ensinaram a não ser como eles).

Agradeço a três de minhas professoras do ensino fundamental: à minha alfabetizadora, Margareth; à professora de matemática Maria de Lourdes Lopes, que percebeu em mim um potencial que nem eu mesma sabia que tinha (*in memoriam*) e à professora de história, Dirce, que despertou em mim um olhar crítico sobre a sociedade.

De forma similar, três docentes da graduação me transformaram positivamente: Leandro (que voltarei a citar), Odanir e Maria Angélica. Agradeço por me apoiarem durante a graduação e durante minha passagem pela UFMS como técnica; além de serem bons amigos com quem sei que posso sempre contar.

Aos meus grandes amigos Meire e Fabrício, que desde a graduação dividem comigo sonhos e conquistas.

Ao meu amigo-amor-irmão, Gilberto: pelo contato quase que diário, por ter se transformado em importante colaborador acadêmico, pelas discussões valiosas sobre tudo e por nele residir a certeza de que nunca estarei sozinha.

Aos amigos da Pós-Graduação: Patrícia, Alejandro, Elizabeth e Vanderlei. Os anos passaram mas a amizade permaneceu inabalável.

Aos amigos que a UNESP me trouxe: Flávia, Liliane, Meiri, Cleuza, Aline, Harry, Elvis, Rafael e Luciano. Agradeço pela cumplicidade, pela parceria “extramuros” da UNESP, e por estarem sempre dispostos a trocar meia dúzia de palavras de “conforto” quando a ansiedade é maior que o suportável.

Ao meu "tutor", João Andrade, um exemplo de profissional que encontrei na UNESP: obrigada pelos "conselhos", pela análise criteriosa de tudo que chega às suas mãos e pela ética profissional (artigo raro nos dias atuais).

À UNESP e à UFMS pela oportunidade de trabalho e desenvolvimento profissional.

À FAPESP, pelo fomento financeiro aos Projetos, sem o qual eu não conseguiria estruturar a linha de Pesquisa junto à UNESP; e pelas muitas bolsas de IC até aqui concedidas.

Ao CNPq pelo fomento ao primeiro projeto de Pesquisa (Edital Universal 2007).

Ao PIBIC (PROPP/UFMS e PROPe/UNESP).

Aos meus alunos de IC, que ajudaram a me construir enquanto orientadora, em especial ao pessoal que trabalhou com *Calopogonium mucunoides* e cujos dados compuseram este documento.

Ao meu “co-aluno” de IC, Lucas, exemplo de que uma boa orientação transforma a todos: hoje é um parceiro de projetos e amigo valoroso.

Ao meu orientador de mestrado, Ricardo Azevedo, por ter aberto as portas para mim em 2001 e por nunca tê-las fechado.

Ao professor Ladaslav Sodek, ser humano maravilhoso e minha referência profissional. Com ele aprendi a dar um passo por vez, a importância de consolidar uma linha de pesquisa e da humildade no meio acadêmico. Não há palavras suficientes para definir o quanto foi importante tê-lo como professor e como orientador no doutorado! Espero que eu consiga, algum dia, ter pelo menos 25% de sua qualidade técnica e profissional.

Ao Leandro, pelo apoio durante a construção de minha vida acadêmica e por ter contribuído direta ou indiretamente em diversos momentos.

À Miranda (R.I.P.) e à Perséfone, por alegrarem e trazerem uma desordem positiva à minha vida...

“Qualquer um que pretenda ter mais que uma compreensão extremamente superficial da vida, em todas suas manifestações, necessita da bioquímica”

Hans Krebs

RESUMO

Calopogonium mucunoides é uma leguminosa herbácea tropical, cuja capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade e elevada acidez motivou o início de nossas pesquisas, ainda durante o Doutorado. Após 2007, diversos trabalhos por nós conduzidos, resultaram na identificação de alguns aspectos da fixação biológica e do metabolismo de nitrogênio desta espécie na presença de N-mineral, bem como a tolerância de seu sistema simbiótico à presença de nitrato e amônio, sua capacidade de fixação de nitrogênio em diferentes faixas de pH, variando do ácido ao próximo da neutralidade, e, ainda, sua tolerância a elementos potencialmente tóxicos. Com isto, espera-se mostrar um panorama geral dos avanços obtidos no estudo do metabolismo de nitrogênio em *Calopogonium mucunoides* e as perspectivas futuras que a caracterização metabólica desta espécie pode abrir para novas abordagens e aplicações.

Palavras-chave: nitrato, ureídeos, nitrogenase, nitrato redutase, tolerância.

ABSTRACT

Calopogonium mucunoides is a tropical herbaceous legume whose adaptive capacity low fertility and high acidic soils motivated the beginning of our research, yet during the PhD. After 2007, several works conducted by us resulted in the identification of some aspects of the biological fixation and the nitrogen metabolism of this species in the presence of N-mineral, as well as the tolerance of its symbiotic system to the presence of nitrate and ammonium, its capacity to fix N at different pH ranges, ranging from acid to near neutrality and, yet, its tolerance to potentially toxic elements. Therefore, it is expected to show an overview of the advances obtained about nitrogen metabolism studies in *Calopogonium mucunoides* and the future perspectives based on metabolic characterization of this species that may open for new approaches and applications.

Keywords: nitrate, ureides, nitrogenase, nitrate reductase, tolerance.

SUMÁRIO

	pag.
INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO I: NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>Calopogonium mucunoides</i> É POUCO AFETADA POR NITRATO.	5
CAPÍTULO II: NITRATO INFLUENCIA O METABOLISMO DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM CALOPOGÔNIO (<i>Calopogonium mucunoides</i>) AO LONGO DO CICLO DE VIDA.	7
CAPÍTULO III: EFEITOS DO PH NA NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM <i>Calopogonium mucunoides</i> .	10
CAPÍTULO IV: MICORRIZAÇÃO ALTERA A COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS FOLIARES E INFLUENCIA NA TOLERÂNCIA AO CHUMBO EM <i>Calopogonium mucunoides</i> .	12
CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
REFERÊNCIAS	15
	19
APÊNDICE A: Artigo publicado no periódico <i>Symbiosis</i> (2010)	20
APÊNDICE B: Artigo publicado no periódico <i>Biotemas</i> (2014)	28
APÊNDICE C: Artigo publicado no periódico <i>Brazilian Journal of Botany</i> (2016)	36
APÊNDICE D: Artigo publicado no periódico <i>Theoretical and Experimental Plant Physiology</i> (2014)	42

INTRODUÇÃO

Calopogonium mucunoides é uma leguminosa herbácea, com hábito de crescimento rasteiro e trepador, ciclo perene, pertencente a tribo Phaseolae, subfamília Papilionoideae, família Leguminosae (Fabaceae). É uma espécie não endêmica, de ampla ocorrência no território brasileiro, o que denota sua plasticidade adaptativa em diferentes biomas (Flora do Brasil 2020, em construção).

A espécie é muito utilizada em adubação verde e como forrageira, sendo extremamente eficiente na produção de biomassa (Costa, 1995; Seiffert et al, 1985), tendo a atividade de nitrogenase com pico máximo no estágio de florescimento (Souza et al, 1996).

Até o início de nossos estudos, sabia-se que *Calopogonium mucunoides* tinha capacidade de adaptação extremamente versátil a diferentes ambientes, crescendo bem em solos de baixa fertilidade e com alta disponibilidade de alumínio, o que sugeria sua tolerância a esse elemento tóxico (Carvalho, 1985); além disso, também haviam relatos de sua alta adaptabilidade a uma grande faixa de pH de solo, variando de muito ácidos (pH 4,3) a alcalinos (pH 8,0), além de adaptar-se bem a salinidade (Souza-Filho & Dutra, 1998). Tais estudos, citados anteriormente, foram realizados para avaliação da capacidade de produção de biomassa para adubação verde ou forragem em condições adversas, sem aprofundamento nas questões fisiológicas e bioquímicas que permitem tal plasticidade adaptativa a essa espécie.

O fato de o nitrogênio ser um dos elementos que mais limita o crescimento e desenvolvimento das plantas, torna o estudo de espécies fixadoras de nitrogênio extremamente importante. Como *C. mucunoides* possui tolerância a condições consideradas como adversas para a fixação biológica de N, chamou-nos a atenção para a compreensão dos mecanismos envolvidos nesta tolerância. Como ponto de partida, Izaguirre-Mayoral & Vivas (1996) citavam que *C. mucunoides* tem alta abundância relativa de ureídeos (RUA) quando está fixando nitrogênio e certa tolerância do mecanismo de fixação de nitrogênio à exposição ao nitrato, diferentemente do que relatava a literatura para outras leguminosas fixadoras que abandonavam a fixação na presença de nitrato. Sendo assim, durante meu doutorado procurei entender a manutenção da fixação biológica da espécie nestas condições, uma vez que esse seria um aspecto extremamente interessante, tanto do ponto de vista ecológico quanto agrônomo.

Inicialmente, observamos que a espécie mantinha a fixação de nitrogênio mesmo quando altas concentrações de nitrogênio mineral estavam disponíveis no meio, tanto na forma de nitrato quanto na forma de amônio e, além da fixação, absorvia e reduzia o nitrato quando este estava presente no meio. Nestas condições, a atividade de NR (redutase do nitrato) era máxima em folhas e raízes e em nódulos era próximo de zero, o que pensamos estar relacionado à tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato (Camargos, 2007). Como já mencionado, este aspecto se confirmava como um resultado ecológico e aplicado muito interessante.

Esta primeira constatação, com a descrição do comportamento metabólico na presença de N-mineral, e os primeiros dados, ainda resultantes do trabalho de tese foram publicados em 2010 (Camargos & Sodek, 2010). Este foi o ponto de partida para a caracterização da espécie quanto à tolerância do mecanismo de fixação de nitrogênio à exposição ao nitrato, mostrando que esta se refere tanto ao estabelecimento quanto à manutenção do sistema simbiótico à presença de N-mineral, tanto na forma de N-NO_3^- (N-nitrato), quanto na forma de N-NH_4^+ (N-amoniaco). Tais estudos indicaram que a espécie possui sistema simbiótico altamente tolerante à presença de nitrogênio mineral, não tendo a nodulação e fixação afetadas por amônio e mantendo inalteradas as taxas de fixação ao receber nitrato em concentrações de até 15 mM, apresentando redução na capacidade de fixação ao receber 30 mM de nitrato, mas não levando ao abandono completo da fixação (Camargos & Sodek, 2010).

Estudos posteriores visaram a caracterização do metabolismo de N ao longo do ciclo de vida, na presença de nitrato. Observamos que a atividade da enzima nitrato redutase é alterada durante o ciclo de vida, havendo mudança no sítio preferencial de redução de nitrato com o início do período reprodutivo (Canatto et al, 2014). Também observamos que a forma de ureídeo se altera, ora acumulando mais ácido alantóico, ora mais alantoína nos tecidos sem que ocorresse efetiva diminuição da capacidade de fixação.

Na sequência, buscamos investigar a plasticidade do processo de fixação a variações de pH, ou seja, como espécie de Cerrado, haveria manutenção das mesmas taxas de fixação de N_2 em pH ácido e neutro? Este foi o foco do estudo conduzido por Ferreira et al (2016) onde observamos que a maior capacidade de fixação é mantida em pH ácido, havendo diminuição do potencial de fixação com a elevação do pH do meio, mas sem abandono da fixação em função desta variação.

Com foco nestas informações, espera-se então que haja uma grande capacidade adaptativa quanto ao mecanismo de fixação biológica para esta espécie, podendo esta ser utilizada em diferentes ambientes com o objetivo de produzir biomassa, estabilizar o solo em

áreas degradadas ou melhorar sua fertilidade. A elucidação dos mecanismos metabólicos e/ou moleculares que possibilitam este comportamento, ou que levaram a espécie a este grau de adaptabilidade, pode ser utilizado, inicialmente, como modelo de estudo, podendo gerar futuramente perspectivas para possíveis manipulações moleculares de outras espécies com o intuito de introduzir estas características em plantas de interesse agrônomo.

Assim, os primeiros estudos envolvendo a adaptabilidade de *C. mucunoides* em áreas fortemente impactadas foram iniciados como colaboração, com foco na capacidade de crescimento e fixação de nitrogênio em solos contaminados por metais tóxicos, o que pode subsidiar um grande potencial de utilização da espécie. Souza et al (2014) observaram que a espécie cresce em solos contaminados com chumbo mas, nestas circunstâncias, seu metabolismo de nitrogênio é afetado, havendo alterações no padrão de aminoácidos produzidos e translocados.

Como existe esta alteração no metabolismo quando a planta está crescendo em solos contaminados por chumbo, que não desempenha qualquer papel nutricional na planta, haveria alguma alteração do metabolismo quando em situações de distúrbios no fornecimento/presença de alguns micronutrientes que, em concentrações elevadas, tem potencial de causar toxidez? Este é o foco de nossa pesquisa recente, não havendo no entanto dados publicados ainda, os quais, portanto, não integrarão este documento. Até então, temos observado que *C. mucunoides* é parcialmente tolerante a níveis tóxicos de cobre e altamente tolerante a níveis tóxicos de boro. O crescimento inicial não é afetado por concentrações de Cu até 120 mg/dm³ solo e por concentrações de B até 480 mg/dm³ solo.

Isto, em consonância com os dados já publicados por Souza et al (2014) nos dá um panorama promissor de utilização da espécie como fitorremediadora e, para além, como modelo de estudo para respostas metabólicas a estresses abióticos.

A organização deste documento parte, então, da apresentação dos dados de seu comportamento fisiológico e tolerância do sistema simbiótico à presença de N-mineral (Capítulo I), comportamento fisiológico ao longo do ciclo de vida com plantas fixando nitrogênio em condições de disponibilidade de nitrato (Capítulo II), comportamento fisiológico e fixação de nitrogênio em diferentes faixas de pH (Capítulo III) e, por último, as respostas fisiológicas quando crescendo em solos contaminados por chumbo (Capítulo IV). Com isto, espera-se mostrar um panorama geral dos avanços obtidos no estudo do metabolismo de nitrogênio em *C. mucunoides* e quais aspectos poderiam ter seu estudo aprofundado com vistas a geração de conhecimento e/ou tecnologias.

CAPÍTULO I

NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Calopogonium mucunoides* É POUCO AFETADA POR NITRATO.

Os estudos iniciados em 2003, com o ingresso no Doutorado, tiveram como ponto de partida a quase inexistência de informações sobre o metabolismo de nitrogênio e a resposta do mecanismo de fixação de nitrogênio em espécies tipicamente tropicais, especialmente quanto a sua tolerância ao N-mineral. Até então, todos os estudos deste tipo versavam sobre espécies oriundas de clima temperado e, em sua maioria, cultivadas (ervilha, alfafa, soja, etc). Algumas observações iniciais nos levavam a acreditar que o mecanismo de resposta de *C. mucunoides* à presença de N-mineral não se assemelhava ao perfil relatado na literatura: abandono da fixação de nitrogênio na presença de N-mineral e/ou não estabelecimento da relação simbiótica nestas condições (Bacanamwo & Harper, 1997; Chalk, 1998; Daimon & Yoshioka, 2001).

A tese de doutorado, defendida em 2007, já deixava claro que se trata de uma espécie altamente tolerante a presença de N-mineral. A nodulação e fixação não são afetadas por doses moderadas de nitrato ou amônio e, apenas quando são fornecidas concentrações elevadas de nitrato (30 mM), observa-se alguma resposta negativa, com diminuição da atividade da enzima nitrogenase neste caso (Camargos, 2007). O estudo foi aprofundado e publicado em 2010 (Camargos & Sodek, 2010) e trouxe para a literatura esta perspectiva de que, o que vinha sendo até então descrito, poderia não se aplicar a essa espécie de clima tropical. Neste trabalho (pelo qual inicio este documento), demonstramos que nenhuma espécie vegetal, até agora estudada, que estabelece relação simbiótica com bactérias do grupo do *Rhizobium*, tem sua nodulação e fixação de nitrogênio tão pouco afetada por nitrato como o que foi observado em *C. mucunoides*.

Mostramos também que este baixo efeito que o nitrato exerce sobre a N-fixação em *C. mucunoides* não pode ser atribuído a não absorção de nitrato ou a sua extrusão para o meio, uma vez que altas concentrações de nitrato foram observadas em seiva de xilema e na parte aérea da planta e não só no sistema radicular, indicando que a absorção e transporte de nitrato se manteve (Atkins et al, 1983). Na presença de nitrato, a atividade da enzima redutase do nitrato (NR) é observada em folhas e raízes e é próxima de zero em nódulos, diferentemente do que é observado em plantas não expostas ao nitrato; ou seja, mesmo a atividade de NR

constitutiva não se mantém em nódulos de plantas recebendo nitrato. Isto pode ser um indicativo deste aspecto de tolerância do sistema simbiótico de *C. mucunoides*?

Isto havia sido sugerido por nós em 2007 (Camargos, 2007), quando observamos que os estudos conduzidos por Serraj et al (1992) relataram que o mecanismo de inibição da nodulação por nitrato e a tolerância ao nitrato são regulados por fatores translocados a partir da parte aérea. Neste estudo, foi observado que ocorre incremento na atividade de nitrato redutase em nódulos de soja após a aplicação de nitrato, sendo que parece haver correlação entre atividade de NR e inibição da fixação por nitrato, no entanto, os mecanismos não são claramente definidos. Heckmann et al (1989) propõe que a redução de nitrato por atividade de NR citossólica culmina com a inibição da fixação, sendo esta afirmação corroborada por dados apresentados por Serraj et al (1992).

Como em *C. mucunoides* não há atividade de NR em nódulos de plantas supridas com nitrato, isto poderia vir a ser um indicativo de que, de fato, o incremento de NRA em nódulos desencadeia sua desestabilização, mas não pudemos confirmar de fato que é por essa razão que não ocorre o abandono da nodulação e fixação de N em calopogônio. O fato é que a planta se mantém fixando nitrogênio, exportando e acumulando ureídeos na parte aérea, absorvendo e reduzindo nitrato nas raízes além de translocar nitrato e o reduzir na parte aérea. Isto culmina com o fato de que plantas recebendo nitrato o utilizam como uma fonte “extra” de nitrogênio e isto faz com que o acúmulo de biomassa seja superior nestas em relação às plantas inteiramente dependentes da fixação biológica, como pode ser observado em Camargos & Sodek (2010).

A comprovação da tolerância e estabilidade do sistema simbiótico à presença de nitrato foi confirmada e isto abriu caminho para outros estudos neste sentido, como estará relatado na parte II deste documento.

CAPÍTULO II

NITRATO INFLUENCIA O METABOLISMO DE COMPOSTOS NITROGENADOS EM CALOPOGÔNIO (*Calopogonium mucunoides*) AO LONGO DO CICLO DE VIDA.

Os estudos que resultaram no trabalho publicado em 2014 (Canatto et al, 2014) tiveram como base o primeiro auxílio à pesquisa aprovado sob minha coordenação (Edital Universal CNPq 2007) e que envolveram as primeiras orientações de Iniciação Científica junto à UFMS. O mesmo só foi finalizado após minha contratação na UNESP e passa a refletir o progresso da hipótese lançada ainda em 2003 acerca da capacidade desta espécie em aproveitar o nitrato do meio sem abandonar a fixação biológica.

Souza et al (1996) já haviam relatado que alguma alteração ocorria ao longo do ciclo de vida de *C. mucunoides*, quando observou pico máximo de fixação biológica durante o florescimento, enquanto Camargos et al (2006), trabalhando com outra espécie de clima tropical, *Canavalia ensiformis*, observou um incremento de aminoácidos livres na parte aérea enquanto ocorria um decréscimo da atividade de NR no tecido foliar. Assim, buscamos estudar o comportamento fisiológico, quanto à fixação biológica e o N-metabolismo, de *C. mucunoides* ao longo do ciclo de vida.

Em *C. mucunoides*, observou-se que a espécie manteve a fixação de nitrogênio e também aproveitando nitrato durante todo o ciclo de vida, incrementando sua massa quando se utiliza as duas fontes de nitrogênio possíveis (fixação biológica e redução assimilatória de nitrato). O comportamento que nos chamou atenção durante o estudo foi a alteração na forma de ureídeo presente nos tecidos ao longo do ciclo de vida. Aparentemente, os níveis de alantoína e ácido alantóico são afetados diferencialmente durante seu desenvolvimento. Por exemplo: em nódulos, durante a fase vegetativa predominou ácido alantóico e na fase reprodutiva, alantoína. Poderia-se considerar esta alteração nos níveis de ureídeos como resposta negativa da fixação biológica e seu restabelecimento envolvendo novo incremento nos níveis de ureídeos, como proposto por King & Purcell (2005), mas não observamos alteração negativa no número e massa de nódulos, o que não corroboraria esta hipótese. A alteração no acúmulo de ureídeos totais em tecidos ao longo do ciclo de vida, com redução nos níveis endógenos de ureídeos presentes nos tecidos durante a fase reprodutiva, com exceção de raízes, onde os níveis foram maiores no estágio de frutificação, é pouco relatada

na literatura. Quiles et al (2009) observaram, em feijão (*Phaseolus vulgaris*), que os níveis de ureídeos totais variaram ao longo do 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 predominava ácido alantóico, 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 evidência 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, sugerindo 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 N₂.

Esta alteração do sítio preferencial de redução de nitrato ao longo do ciclo de vida, foi observada para *C. ensiformis* (Camargos et al, 2006), com o sistema radicular apresentando incremento na redução de nitrato com o início da fase reprodutiva e consequente diminuição da contribuição da parte aérea na redução assimilatória do nitrato nesta fase. Isto, como já evidenciado por Camargos et al (2006), corrobora o proposto por Forde & Walch-Liu (2009) que reportou ser esta resposta de atividade de NR em *Arabidopsis thaliana*, uma planta modelo de clima temperado, modulada pelo incremento de aminoácidos livres, em especial glutamato, ligada à transição para o florescimento. Canatto et al (2014) também observaram um incremento substancial na concentração de aminoácidos solúveis totais na parte aérea, que é acompanhado da diminuição na atividade da enzima nitrato redutase em tecido foliar com o

início do florescimento. 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, não é tão claro como o nitrato é reduzido em tecidos não-fotossintetizantes dada a demanda de elétrons para a fosforilação oxidativa. Os sítios mais adaptados à redução de nitrato são os tecidos fotossintetizantes (Wallace, 1986), já que o nitrato é reduzido a nitrito com gasto de dois elétrons e transferido ao cloroplasto onde é reduzido à amônia com gasto de seis elétrons; por outro lado, 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).

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.

Ainda que o trabalho publicado em 2014 envolvendo a resposta metabólica de *C. mucunoides* (Canatto et al, 2014) seja essencialmente descritivo, traz uma importante abordagem para o entendimento do metabolismo de espécies tropicais, já que demonstra que algumas respostas metabólicas observadas para *Canavalia brasiliensis* são também observadas em *C. mucunoides*, ressaltando assim o caráter diverso do comportamento metabólico de espécies tropicais em relação ao que era então reportado para espécies de clima temperado (Camargos et al, 2004; Camargos et al, 2006; Camargos et al, 2009).

CAPÍTULO III

EFEITOS DO PH NA NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM *Calopogonium mucunoides*.

Passamos então ao último trabalho publicado envolvendo o metabolismo de N desta espécie que foi oriundo do primeiro trabalho de Iniciação Científica sob minha orientação na UNESP. Desta orientação, que durou três anos, resultou não só este conjunto de dados, mas a concepção inicial da hipótese de que a espécie pode se adaptar a condições ainda mais variáveis (ou consideradas ainda mais adversas para outras espécies), o que passaremos a discutir no capítulo IV deste documento.

Ferreira et al (2016) descreve a capacidade de fixação de nitrogênio de calopogônio em condições de solo/substrato com diferentes faixas de pH. Até então, os trabalhos anteriores (parte I e parte II deste documento), trataram de experimentos desenvolvidos em condições de substrato inerte (vermiculita) e pH da solução nutritiva próximo da neutralidade, condição na qual a espécie cresce e fixa nitrogênio (em pH neutro ou próximo disto). É fácil concluir que a espécie cresce bem, mantém sua atividade de fixação de nitrogênio elevada e tem seu desenvolvimento pleno em condições de pH neutro (Camargos & Sodek, 2010; Canatto et al, 2014).

Quando realizado o experimento em três faixas de pH (alta acidez, acidez moderada e próximo da neutralidade) percebe-se que, talvez, o potencial máximo de crescimento e de aporte de nitrogênio novo (resultante da fixação biológica) pode não ter sido observado nos trabalhos anteriores. A espécie apresenta maior capacidade de fixação de nitrogênio (traduzida aqui por atividade da enzima nitrogenase) em pH mais ácido (pH 4,0). A nodulação nestas condições também é maior. Em pH moderadamente ácido e pH neutro (5,5 e 7,0, respectivamente) há diminuição da nodulação e da atividade de nitrogenase em relação ao pH 4,0, mas estes dois últimos não diferem entre si.

Qual o grau de adaptabilidade da espécie ao pH do solo? Com base neste estudo, diríamos que é elevado. Não observamos aqui o fator alumínio solúvel (ou trocável), que será tema de trabalhos futuros (dados ainda não publicados), mas podemos inferir que este fator não afetou fortemente o crescimento e a N-fixação, o que nos indica ser muito provável sua tolerância ao alumínio tóxico. Dados sobre tolerância inicial de *Calopogonium mucunoides* à presença de alumínio tóxico já indicavam que o mesmo não tinha seu crescimento inicial

afetado (Meda & Furlani, 2005), o que é um importante indicativo de sua capacidade de adaptação a pH ácido.

Ferreira et al (2016) observaram ainda que não há alteração nos teores totais de ureídeos nos tecidos de parte aérea e raiz, mas há alteração na forma de ureídeo (alantoína e ácido alantóico), como já relatado por Canatto et al (2014) nas condições de presença de nitrato no meio, ao longo do ciclo de vida. Outro fator que chama a atenção do trabalho publicado por Ferreira et al (2016) é que os teores de ureídeos totais em nódulos de plantas crescendo em pH 4,0 são menores que nas faixas de pH 5,5 e 7,0. É evidente que isto não se deve a queda nas taxas de fixação de nitrogênio ou nodulação, posto que em pH 4,0 estes dois parâmetros são maiores do que nos outros tratamentos, mas pode-se atribuir a uma maior translocação para os tecidos adjacentes (raiz) ou exportação para parte aérea.

A plasticidade da espécie, no quesito nodulação e crescimento, é evidenciada quando analisa-se o conjunto dos três trabalhos apresentados até aqui (Camargos & Sodek, 2010; Canatto et al, 2014; Ferreira et al, 2016) o que nos leva a questionar quais as possibilidades de investigação que podem ser geradas a partir deste conjunto de informações.

Um dos aspectos que tem nos chamado atenção é a possibilidade de utilização desta espécie como fitorremediadora. Isto vem sendo investigado atualmente (trabalho ainda em condução, dados não publicados) para solos contendo níveis tóxicos dos micronutrientes cobre e boro. Os dados iniciais, conforme já apontados na Introdução deste documento, demonstram tolerância moderada ao cobre e alta tolerância ao boro (suportando níveis de B de até 480 mg /dm³). Na última etapa deste documento apresentaremos uma breve abordagem do que já foi investigado (e publicado) em termos de tolerância ao chumbo, um metal que não possui função biológica. Trata-se de um trabalho em colaboração, mas que abriu a frente de possibilidades de investigação para a tolerância desta espécie a outros níveis de adversidades do meio que, para outras espécies, representam situações de estresses severos.

CAPÍTULO IV

MICORRIZAÇÃO ALTERA A COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS FOLIARES E INFLUENCIA NA TOLERÂNCIA AO CHUMBO EM *Calopogonium mucunoides*.

Esta última abordagem aqui apresentada é uma pequena parte do trabalho de mestrado de Lucas Anjos de Souza, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marlene A Schiavinato e co-orientação da Prof.^a Dr.^a Sarah Adrian Lopez Andrade. Por ter participado nesta etapa da análise e discussão dos dados de metabolização de aminoácidos na parte aérea nas condições de presença de chumbo no meio, com plantas micorrizadas e não micorrizadas, considerei relevante apresentar aqui estas informações (com concordância dos autores principais).

Apesar de tratar-se de um artigo publicado antes daquele apresentado na parte III, considero mais adequado que ele seja apresentado neste momento, no encerramento deste documento. O ponto principal que justifica esta abordagem é exatamente a capacidade de crescimento efetiva desta espécie em condições em que outras espécies não se estabeleceriam. Este é o aspecto que estamos investigando neste momento e cujos dados não comporão este documento (processo FAPESP 2015/17089-0), mas que tiveram como ponto de partida o trabalho aqui apresentado, publicado por Souza et al (2014).

Quando observamos os aspectos já abordados nas três outras partes deste documento, pode não ser surpresa o fato de calopogônio crescer efetivamente em tais condições, mas se nos depararmos isoladamente com os dados apresentados apenas no trabalho publicado por Souza et al (2014) o cenário já nos parecerá outro. O chumbo, como é de amplo conhecimento, não é um nutriente e não exerce qualquer papel benéfico para o vegetal. Não apenas isto: é um metal pesado, potencialmente tóxico e que pode ser transferido na cadeia alimentar. Em plantas, causa inúmeros distúrbios, como danos às membranas por peroxidação lipídica, por exemplo. Assim, identificar aspectos de tolerância de plantas a metais pesados é extremamente relevante em vários aspectos, sendo o mais discutido, atualmente, o seu uso como fitorremediadora.

Dentre os aspectos que conferem tolerância, a associação com outros grupos de organismos é um fator a ser considerado e, no caso de *C. mucunoides*, os estudos conduzidos por Souza et al (2012) demonstraram que a presença de micorrizas no meio conferem

tolerância e aumentaram a extração de chumbo pela espécie, o que contribui para o crescimento da espécie em solos contaminados e sua capacidade de fitoextração.

Quanto ao metabolismo de nitrogênio, observamos que há alteração drástica no padrão de aminoácidos, com um significativo incremento de alanina e GABA (ácido gama-aminobutírico), sendo que este último é um aminoácido não proteico e que pode atuar como reserva de nitrogênio em situações de estresse nutricional, por exemplo (Amarante & Sodek, 2006). Quando se observa plantas não-micorrizadas (mais sensíveis às doses de chumbo), os níveis de GABA são muito inferiores, o que reforça a hipótese de que esse aminoácido auxilia no processo de aquisição de tolerância.

Quando se aborda o tema fitorremediação, a literatura reiteradamente aborda a importância de identificar espécies que sejam fitoextratoras e hiperacumuladoras (Salt et al, 1998; Gratão et al, 2005; Jabeen et al, 2009). Nós defendemos que não basta ser uma hiperacumuladora se seu hábito de crescimento é diminuto, o que já foi revisado e discutido por Souza et al (2013). Assim, entendemos que o fato de *C. mucunoides* apresentar alta capacidade de crescimento, aliado a sua plasticidade adaptativa aos estresses abióticos, pode justificar seu potencial de uso como fitorremediadora nos casos em que a mesma seja tolerante ao contaminante.

As respostas do metabolismo de nitrogênio de calopogônio às diferentes situações abordadas até aqui, nas quatro partes que compõem este documento, subsidiam nossa afirmativa de que trata-se de um promissor modelo vegetal para se avaliar situações de estresse, adaptabilidade e/ou tolerância a estresses abióticos e a solos ácidos e/ou alcalinos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os trabalhos que vem sendo conduzidos desde 2007 com *Calopogonium mucunoides*, a partir da obtenção do título de Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), têm aportado informações relevantes acerca do comportamento evolutivo da espécie: crescimento e desenvolvimento em solos de características físico-químicas adversas, mantendo-se como fixadora de nitrogênio na presença de N mineral (Camargos & Sodek, 2010) com pequenas alterações metabólicas ao longo do ciclo de vida (Canatto et al, 2014) tolerando variações de pH em um amplo espectro e mantendo sua capacidade de fixação biológica (Ferreira et al, 2016).

Todas estas características, reunidas, já conferem importantes diferenças quando comparada às leguminosas originárias de clima temperado, amplamente cultivadas, que serviram de base para a descrição do metabolismo de nitrogênio deste grupo botânico durante muitos anos. Isto nos leva a acreditar que é uma espécie que merece ter seu metabolismo investigado em condições adversas de crescimento, como é o caso da contaminação do solo por elementos tóxicos (Souza et al, 2014; Ferreira et al, dados não publicados; Silva et al, dados não publicados).

Neste momento, buscamos respostas que possam ser aplicadas a resolução de problemas que já nos trazem grandes preocupações: a recuperação de áreas degradadas. Mas considerando que a ciência não precisa, necessariamente, ser aplicada, tal comportamento metabólico não permitiria ‘eleger’ *Calopogonium mucunoides* como um belo modelo de estudo do metabolismo de leguminosas tropicais frente a estresses abióticos?

Assim, fica aqui um leque de possibilidades para trabalhos futuros, pois para cada resposta surgirão dez (ou mais) novas perguntas e é isto que move a ciência.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, L.; SODEK, L. 2006. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. *Biologia Plantarum* 50:405-410.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; PEOPLES, M.B.; JOY, K.W. 1983. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiology* 71:841-848.
- BACANAMWO, M.; HARPER, J.E. 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. *Physiologia Plantarum* 100:371-377.
- CABA, J.M.; LLUCH, C.; LIGERO, F. 1995. Distribution of nitrate reductase activity in *Vicia faba*: Effect of nitrate and plant genotype. *Physiologia Plantarum* 93:667-672.
- CAMARGOS, L.S. Alterações no metabolismo de compostos nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: efeitos na nodulação e na fixação. Tese de doutorado (UNICAMP – Campinas, SP), 2007.
- CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; CARMEZINI, J.A.; AZEVEDO, R.A. 2009. Variation in the ureide content of jack bean during the reproductive stages in response to nitrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52:581-585.
- CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; AZEVEDO, R.A. 2006. Site of nitrate reduction in jack bean (*Canavalia ensiformis*) changes from leaf to root during development. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34:131-137.
- CAMARGOS, L.S.; AGUIAR, L.F.; AZEVEDO, R.A. 2004. Variation in the amino acid concentration during development of *Canavalia ensiformes*. *Biologia Plantarum* 48:309-312.

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

CANATTO, R.A.; AGUIAR, L.F.; JUSTINO, G.C.; SOUZA, L.A.; CAMARGOS, L.S. 2014. O nitrato influencia o metabolismo de compostos nitrogenados em calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) ao longo do ciclo de vida. *Biotemas* 27(1):1-8.

CARVALHO, M.M. 1985. Melhoramento na produtividade das pastagens através de adubação. *Informe Agropecuário* 11(132):23-32.

CHALK, P.M. 1998. Characterization of novel inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.) II. Variation in N₂ fixation, NO₃ uptake and their interactions. *Euphytica* 103:45-54.

COSTA, N.L. 1995. Nitrogen fertilization and association of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) with tropical forage legumes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30:401-408.

DAIMON, H.; YOSHIOKA, M. 2001. Responses of root nodule formation and nitrogen fixation activity to nitrate in a split-root system in peanut (*Arachis hypogaeae* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 187:89-95.

FERREIRA, T.C.; AGUILAR, J.A.; SOUZA, L.A.; JUSTINO, G.C.; AGUIAR, L.F.; CAMARGOS, L.S. 2016. pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*. *Brazilian Journal of Botany* 39(4):1015-1020.

FORDE, B. G.; WALCH-LIU, P. 2009. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. *Plant, Cell and Environment* 32(6):682-693.

GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.T.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1):53-64.

HECKMANN, M.O.; DREVON, J.J.; SAGLIO, P.; SALSAC, L. 1989. Effect of oxygen and malate on NO₃- inhibition of nitrogenase in soybean nodules. *Plant Physiology* 90:224-229.

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

IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L.; VIVAS, A.I. 1996. Symbiotic N₂-fixation in tropical legume species growing at high geographic elevation. *Symbiosis*. 21:49-60.

JABEEN, R.; AHMAD, A.; IQBAL, M. 2009. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Botanical Review* 75(4):339–364.

KING, C.A.; PURCELL, L.C. 2005. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology* 137:1389-1396.

MEDA, A.R.; FURLANI, P.R. 2005. Tolerance to aluminium toxicity by tropical leguminous plantas used as cover crops. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48:309-317.

OLIVER, A.J.; SMITH, S.E.; NICHOLAS, D.J.D.; WALLACE, W. 1983. Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*. Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytologist* 94:63-79.

PIWPUAN, N.; ZHAI, X.; BRIX, H. 2013. Nitrogen nutrition of *Cyperus laevigatus* and *Phormium tenax*: Effects of ammonium versus nitrate on growth, nitrate reductase activity and N uptake kinetics. *Aquatic Botany* 106:42-51.

QUESADA, A.; GOMEZ-GARCIA, L.; FERNÁNDEZ, E. 2000. Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. *Trends in Plant Science* 5:463-464.

QUILES, F.A.; RASO, M.J.; PINEDA, M.; PIEDRAS, P. 2009. Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 135:19-28.

ROBIN, P.; BLAYAC, D.; SALSAC, L. 1979. 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* 17:55-66.

SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49:643–668.

SEIFFERT, N.F.; ZIMMER, A.H.; SCHUNKE, R.M.; BEHLING-MIRANDA, C.H. 1985. Nitrogen recycling in mixed pastures of *Calopogonium mucunoides* and *Brachiaria decumbens*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 20:529-544.

SERRAJ, R.; DREVON, J.J.; OBATON, M.; VIDAL, A. 1992. Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) – *Bradyrhizobium symbiosis*. Journal of Plant Physiology 140:366-371.

SOUZA, E.S.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; FIGUEIREDO, M.D.B.; DELYRA, M.D.C.P. 1996. N₂-fixation and growth of the *Calopogonium* (*Calopogonium mucunoides* Desv.) and of the *Clitoria* (*Clitoria ternatea* L.) after successive cuts. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia 25:1036-1048.

SOUZA, L.A.; ANDRADE, S.A.L.; SOUZA, S.C.R.; SCHIAVINATO, M.A. 2012. Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. Acta Physiologiae Plantarum 34:523–531.

SOUZA, L.A.; CAMARGOS, L.S.; SCHIAVINATO, M.A.; ANDRADE, S.A.L. 2014. Mycorrhization alters foliar soluble amino acid composition and influences tolerance to Pb in *Calopogonium mucunoides*. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 26:211-216.

SOUZA, L.A.; PIOTTO, F.A.; NOGUEIROL, R.C.; AZEVEDO, R.A. 2013. Use of non-hyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents. Scientia Agricola 70(4): 290-295.

SOUZA-FILHO, A.P.S.; DUTRA, S. 1998. Germinação de sementes de Calopogônio (*Calopogonium mucunoides*). Pasturas Tropicales 20(3):26-30.

WALLACE, W. 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and comparison with wheat. Physiologia Plantarum 66:630-636.

<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22853> . Acesso em 01 de março de 2017.

APÊNDICE¹

A - Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. *Symbiosis* (2010) 51:167–174. doi: 10.1007/s13199-010-0063-5

B - O nitrato influencia o metabolismo de compostos nitrogenados em calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) ao longo do ciclo de vida. *Biotemas* (2014) 27: 1-8. doi:10.5007/2175-7925.2014v27n1p1

C - pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*. *Braz. J. Bot* (2016) 39:1015–1020. doi:10.1007/s40415-016-0300-0

D - Mycorrhization alters foliar soluble amino acid composition and influences tolerance to Pb in *Calopogonium mucunoides*. *Theor. Exp. Plant Physiol.* (2014) 26:211-216. doi:10.1007/s40626-014-0019-x

¹Os anexos foram removidos em respeito aos direitos autorais