

EFEITO DO ESTRESSE DA DESFOLHA ARTIFICIAL

SOBRE A REBROTA E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS NÓDULOS DE COPADA¹

ANTONIO ALVARO CORCETE PURCINO² e JULIAN QUENTIN LYND³

RESUMO - Determinou-se o efeito do estresse da desfolha na capacidade de rebrota, na nodulação, na atividade da nitrogenase e em alguns parâmetros do citosol no nódulo de *Cratylia floribunda* Mart ex-Benth. As plantas cortadas entre 5 e 7 cm do solo, a intervalos de 14 dias, mostraram boa capacidade de rebrota, produzindo mais matéria seca que aquelas não cortadas. Nas plantas que foram desfolhadas, o número de caules aumentou de 11,0 para 19,5, e a fração foliar, de 48,6% para 54,2%, enquanto naquelas não desfolhadas, a fração foliar decaiu de 55,4% para 29,4%, e a proteína no caule diminuiu de 8,2% para 6,2%. A percentagem de proteína nas folhas não foi influenciada pelo tratamento de desfolha nem pela idade das plantas entre os 70 e 154 dias após a germinação (DAG). Plantas que receberam quatro desfolhas (126 DAG) tinham um maior número de nódulos maduros e imaturos e maior peso de nódulos imaturos que as da mesma idade que não tinham sido desfolhadas. Nas plantas não desfolhadas, a percentagem de nodulação caiu de 21,8 para 14,4, e a atividade da nitrogenase, de 46,5 para 32,5 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4\text{g}^{-1}$ de nódulos frescos h^{-1} entre os 70 e 154 DAG. Nos nódulos maduros de plantas sem desfolha, a atividade da transaminase do aspartato (AST) α -Ketoglutarate e a quantidade de α KG aumentaram até os 126 DAG, e a atividade da transaminase da alanina (ALT) e da desidrogenase do glutamato (GDH) não foram influenciadas nem pelos tratamentos de desfolha nem pela idade das plantas.

Termos para indexação: transaminase de aspartato (AST), transaminase de alanina (ALT), desidrogenase do glutamato (GDH), *Cratylia floribunda*, fixação simbiótica de nitrogênio, ureídeo.

EFFECT OF DEFOLIATION STRESS ON REGROWTH AND SOME NODULE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF "COPADA"

ABSTRACT - The effects of defoliation stress on regrowth vigor, nodulation and nitrogenase activity, along with some nodule cytosol components of *Cratylia floribunda* Mart ex-Benth were evaluated. Plants clipped 5 to 7 cm above the ground, at fourteen-day intervals, yielded more dry matter herbage than plants never clipped. Clipped plants had increased number of stems from 11.0 to 19.5, and foliar, 48.6% to 54.2%, whereas nonclipped plants had decreased foliar fraction, 55.4% to 29.4%, and stem protein, 8.2% to 6.2%. Neither clipping treatments nor plant age influenced percent leaf protein between 70 days after emergence (DAE), and 154 DAE. Plants clipped four times (126 DAE) had a larger number of mature and immature nodules, as well as higher immature nodule weight than plants with the same age, but never clipped. Nonclipped plants showed decreasing percent nodulation, 21.8 to 14.4, and nitrogenase activity, 46.5 to 32.5 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4\text{g}^{-1}$ fresh nodule h^{-1} , between 70 and 154 DAE. The activity of aspartate transaminase (AST) and levels of α -Ketoglutarate (α KG) increased in mature nodules of nonclipped plant, but the activity of alanine transaminase (ALT) and glutamate dehydrogenase (GDH) in these nodules were not influenced either by clipping treatment or plant age between 98 DAE and 154 DAE.

Index terms: *Cratylia floribunda*, nitrogen fixation, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), glutamate dehydrogenase (GDH), ureide.

INTRODUÇÃO

O processo de fixação simbiótica de nitrogênio por parte de leguminosas forrageiras contribui

para a manutenção ou mesmo melhoria das condições da fertilidade do solo em áreas de pastagem (Döbereiner & Campelo 1977), além de permitir a produção de forragem de boa qualidade. Entretanto, a determinação da quantidade de nitrogênio fixado, quando a leguminosa é submetida a pastoreio intensivo, é difícil de ser realizada com precisão. O método da redução do acetileno como uma determinação indireta da atividade da nitrogenase apresenta algumas limitações (Bergersen

¹ Aceito para publicação em 26 de novembro de 1985.

² Eng. - Agr., Ph.D., Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Caixa Postal 515, CEP 30000 Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Prof., Ph.D., Agronomy Department, Oklahoma State University, Stillwater - OK - 74078, EUA.

1970, Witty 1979, Minchin et al. 1983), pois a evolução de etileno, a partir da redução do acetileno pela nitrogenase, não se relaciona com a seqüência enzimática que incorpora amônia em aminoácidos no citosol do nódulo.

Estudos realizados com várias leguminosas estabeleceram a cinética enzimática para várias aminotransferases, oxiredutases e ligases (Ryan & Fottrell 1974, Brown & Dilworth 1975). Para as leguminosas forrageiras, que sofrem o estresse do pastoreio, o conhecimento dos biocontroles enzimáticos em nível nodular pode permitir o desenvolvimento de práticas de manejo que permitem aumentar a quantidade de nitrogênio fixado biologicamente (Vance et al. 1979, Lynd et al. 1980, Lynd & Odell Junior 1983). A depressão da atividade da nitrogenase, causada pela desfolha e/ou interações ontogenéticas entre fotossíntese e a fixação simbiótica do nitrogênio, já foi estabelecida em ervilha e feijão (Bethlenfalvay & Phillips 1977, Trinick et al. 1976). Por esse motivo, as leguminosas perenes necessitam ser avaliadas sob o aspecto de resposta fisiológica ao severo estresse de desfolha a que são submetidas quando utilizadas como forrageiras.

Além desse efeito, a desfolha influencia o desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, interfere no processo de infecção e desenvolvimento de novos nódulos.

Tendo em vista esses fatos, um dos principais critérios que se deve considerar para a seleção de leguminosas forrageiras é a sua capacidade de rebrota sob pastoreio intensivo, além da habilidade de sobreviver em competição com as gramíneas sob extremos climáticos (Williams 1967):

A leguminosa tropical, perene, *Cratylia floribunda* Mart ex-Benth, conhecida vulgarmente como copada, tem-se comportado, em trabalhos de introdução de germoplasma e de avaliação sob condições de casa de vegetação, como uma forrageira capaz de fixar altas quantidades de nitrogênio e de produzir grandes quantidades de forragem rica em proteína (Purcino & Lynd 1982, 1984).

Essa leguminosa, trepadeira, aparentemente cresce bem sob várias condições de textura e fertilidade do solo, tem uma capacidade de rebrota muito vigorosa, e a planta mãe prolifera rapidamente, pois estabelece raízes adventícias sempre

que o caule entra em contato com o solo (Ducke 1949, Costa et al. 1978).

Os nódulos dessa planta são bastante característicos e apresentam aspectos morfológicos que permitem fácil identificação de nódulos inativos (ausência de atividade da nitrogenase) e ativos (com atividade da nitrogenase) (Purcino & Lynd 1982).

O objetivo deste trabalho foi determinar, sob condições de campo, o efeito do estresse da desfolha por cortes, na capacidade de rebrota, nodulação, atividade da nitrogenase e alguns parâmetros do citosol do nódulo desta planta.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de copada, utilizadas no experimento, foram coletadas de plantas nativas encontradas na região semi-árida do norte do estado de Minas Gerais. A germinação foi feita em laboratório, e mais tarde cada plântula foi transferida para um vaso individual contendo 5 kg de solo. Durante o transplante, houve uma inoculação com 3 ml de um meio líquido contendo mais de 10^8 células viáveis de rizóbio. O solo foi caracterizado como um alfissolo barro-arenoso ('siliceous', 'thermic', 'psammentic paleustalf'), segundo Gray & Roostitlab (1976), e o experimento foi conduzido em condições de campo, durante o verão, em Stillwater, Oklahoma, EUA.

Como a copada tem sementes muito duras, que não germinam uniformemente, considerou-se, neste trabalho, a idade das plantas a partir do dia da emergência das sementes (DAG).

Os tratamentos de desfolha foram realizados estabelecendo-se dois grupos distintos, de 36 plantas cada. No grupo "sem desfolha", colheram-se, em nove plantas de cada vez, as partes aéreas e raízes aos 70, 98, 126 e 154 DAG; e no grupo "com desfolha", a colheita das partes aéreas e raízes também foi realizada aos 70, 98, 126 e 154 DAG em nove plantas de cada vez, sendo que, entretanto, todas as plantas remanescentes sofreram uma desfolha adicional aos 70, 84, 98, 112, 126 e 140 DAG. Portanto, neste grupo, as plantas colhidas aos 98 DAG tinham sido desfolhadas aos 70 e 84 DAG, e as últimas plantas, que foram colhidas aos 154 DAG, tinham sido desfolhadas aos 70, 84, 98, 112, 126, 140 DAG.

O tratamento de desfolha foi realizado cortando-se a parte aérea das plantas 5 a 7 cm acima do solo.

Para se evitar a influência da hora de colheita nos parâmetros fisiológicos dos nódulos, todas as plantas foram colhidas três horas depois do amanhecer, com um intervalo de uma hora entre colheita e início das análises de redução de acetileno.

Após a colheita das plantas intactas, a parte aérea foi separada do sistema radicular, que foi lavado rapidamente para se retirar o excesso de solo, enxugado com papel

mata-borrão e colocado em vidro tampado com rolha de borracha (Trinick et al. 1976, Vance et al. 1976) A redução de acetileno foi determinada usando-se 0,1 atmosfera de C_2H_2 . A produção de etileno foi medida em intervalos de 30 min em um cromatógrafo a gás, modelo Perkin Elmer 3920, com coluna de Poropak.

Imediatamente após a análise de redução de C_2H_2 - C_2H_4 para determinação da atividade da nitrogenase, os nódulos foram separados das raízes, agrupados entre "maturos" e "imaturos", contados e pesados. Consideram-se como nódulos maduros aqueles que tinham mais de 1 mm de diâmetro, com coloração estriada branca e marrom-escuro, superfície rugosa (Fig. 1); e como imaturos, aqueles com menos de 1 mm de diâmetro, superfície lisa e coloração uniforme marrom claro. Estes nódulos imaturos mostram ausência de atividade ou atividade muito baixa para nitrogenase e alta atividade da redutase de nitrato, enquanto nódulos maduros possuem alta atividade da nitrogenase e atividade muito baixa de redutase de nitrato (Purcino & Lynd 1982). A Fig. 2 mostra um corte transversal de um nódulo maduro onde aparecem as lenticelas, o tecido vascular e as células infectadas pelo rizóbio.

A extração do citosol dos nódulos foi realizada como descrita por Vance et al. (1979). Alíquotas de nódulos frescos foram maceradas com água bi-destilada (g/ml 1:10 e temperatura de 0-5°C) em solução tampão de fósforo com pH de 7,41. O homogenizado resultante foi submetido a ultra-som com 7,3 pulsos de frequência em banho de gelo por 30 segundos, usando-se um Polytron Willems, modelo PT 10ST, seguido de centrifugação refrigerada a 5°C, por 10 min e 12×10^3 g. O sobrenadante, de cor clara e livre de células, foi colocado em tubos de ensaio e armazenado em temperatura de 0 a 5°C.

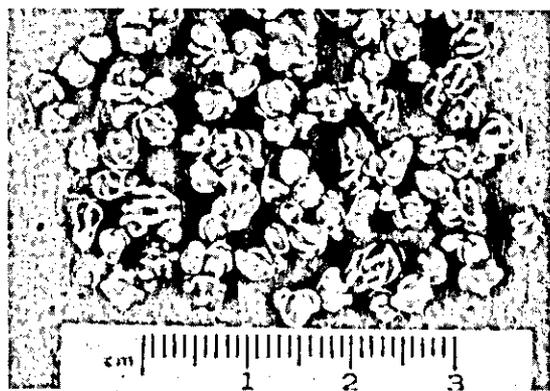


FIG. 1. Nódulos maduros de copada são maiores que 1 mm de diâmetro, estriados de branco e marrom-escuro, com superfície rugosa. Nódulos imaturos são lisos, menores de 1 mm de diâmetro, coloração marrom-clara. Nódulos maduros possuem alta atividade de nitrogenase e altas concentrações de ureídeos.

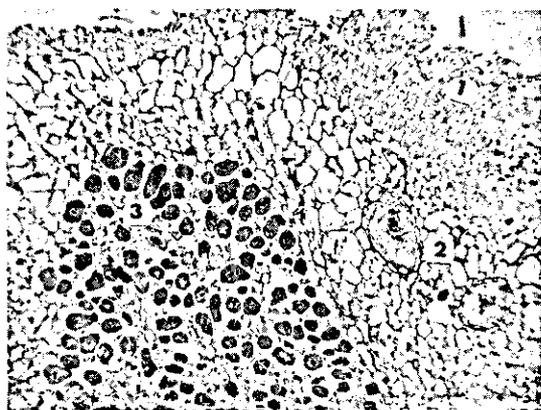


FIG. 2. Corte transversal de um nódulo maduro de copada (1) lenticelas, (2) tecido vascular, (3) células infectadas pelo rizóbio.

As atividades das seguintes enzimas foram determinadas: aminotransferase do aspartato (ALT, EC 2.6.1.1) (Bergmeyer & Bernt 1974 a), aminotransferase da alanina (AST, EC 2.6.1.2) (Bergmeyer & Bernt 1974 b) e desidrogenase do glutamato (GDH, EC 1.4.1.3) (Schmidt 1974). A quantificação das atividades catalíticas e a especificidade de substratos foram feitas de acordo com o proposto por Bergmeyer (1978).

As atividades enzimáticas do citosol do nódulo foram calculadas como Unidade Internacional (U), que é definida como a quantidade de enzima capaz de transformar $1,0 \mu\text{mol}$ de substrato específico por minuto a 27°C. O coeficiente de extinção do NADH a 340 nm foi de $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ e calculado com referência ao peso fresco de nódulos. A instrumentação utilizada nestas análises já foi descrita anteriormente (Purcino & Lynd 1982, Lynd & Odell Junior 1983). A determinação do alfa-cetoglutarato (αKG) foi realizada de acordo com Bergmeyer & Bernt (1974 c), e a composição dos ureídeos, de acordo com Trijebels & Vogels (1966).

Na parte aérea das plantas, foram determinados o número e o comprimento das ramas, a percentagem de proteína nas folhas e caules pelo método de Lowry et al. (1951), o peso seco da parte aérea e a fração foliar (peso seco folhas/caules, em percentagem).

Os resultados obtidos foram comparados pela análise de variância e testes de média, considerando-se que o experimento foi conduzido com tratamentos inteiramente casualizados, com nove repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à capacidade de rebrota da copada, em consequência dos cortes realizados a partir de 70 DAG, aparecem na Tabela 1. Estes dados mostram que houve uma produção de apro-

ximadamente 20 g de matéria seca por planta a cada intervalo de 14 dias. Como não existe diferença estatística significativa entre esses números, pode-se concluir que esta planta não mostrou nenhuma tendência de definhamento em consequência do estresse causado pela desfolha. A quantidade de matéria seca obtida com as desfolhas foi de 41,8 g para as plantas colhidas aos 98 DAG, de 81,8 g para as colhidas aos 126 DAG, e de 127,8 g para as colhidas aos 154 DAG, o que demonstra uma tendência de produtividade linear em função dos cortes e idade das plantas. Considerando-se a quantidade de material remanescente nos vasos por ocasião da colheita das plantas, obtiveram-se as seguintes produções totais de matéria seca na parte aérea aos 98, 126 e 154 DAG: 89,0 g, 143,2 g e 168,1 g, respectivamente.

Na Tabela 2 aparecem os efeitos dos tratamentos de desfolha e da idade das plantas nos parâmetros biométricos e percentagem de proteína.

No grupo que não sofreu desfolha, observou-se que a produção de matéria seca na parte aérea aumentou com a idade das plantas. Entretanto, este aumento foi causado, em sua maior parte, pelo aumento de peso dos caules, já que a fração foliar decresceu de 55,4% para 29,4%. Aparentemente, a qualidade da forragem produzida também diminuiu, pois, enquanto a percentagem de proteína nas folhas não sofreu influência da idade das plantas, a percentagem de proteína nos caules diminuiu de 8,2% para 6,2%, à medida que estes se tornaram mais lignificados. Neste grupo de plantas, o número de caules/planta não aumentou significativamente, mas o comprimento deles passou de 2,25 m, aos 70 DAG, para 7,87 m aos 154 DAG.

As plantas que sofreram desfolha a intervalos de 14 dias sempre produziram maior crescimento aéreo que aquelas não desfolhadas com DAG correspondente. Nestas plantas, a quantidade total de matéria seca produzida passou de 89,0 g aos 98 DAG, para 168,1 g aos 154 DAG. Ao contrário do observado nas plantas sem desfolha, o número de caules/planta neste grupo aumentou de 11,0 para 19,5, e a fração foliar e a percentagem de proteína no caule e folhas não variaram significativamente com a idade das plantas. Pode-se deduzir, então, que a qualidade da forragem produzida no

tratamento que sofreu desfolha não tendeu a diminuir com a idade das plantas, como observado para o grupo que nunca sofreu desfolha.

O efeito dos tratamentos de desfolha e idade das plantas na nodulação e na atividade da nitrogenase aparece na Tabela 3.

No grupo de plantas que não sofreu desfolha, o número de nódulos maduros decresceu de 240 para 139, e o de imaturos decresceu de 211 para 112. Entretanto, apesar disso não se observaram mudanças estatisticamente significativas nos níveis da atividade da nitrogenase e na percentagem de nodulação.

No grupo de plantas com desfolha, a idade das plantas não influenciou a atividade da nitrogenase, nem a percentagem de nodulação, nem o número e peso de nódulos maduros e imaturos. Entretanto, quando se comparou o grupo de plantas com desfolha com as sem desfolha, dentro do mesmo DAG, notou-se, aos 126 DAG, que as plantas do grupo com desfolha apresentaram significativo aumento no número de nódulos maduros e imaturos e no peso de nódulos imaturos.

A influência da desfolha e idade das plantas na atividade das enzimas AST, ALT e GDH, e na concentração de α KG e ureídeos em nódulos maduros e imaturos, aparece na Tabela 4.

Considerando-se somente os nódulos maduros, no grupo de plantas sem desfolha, a atividade da AST aumentou de 10,6 Ug^{-1} de nódulos aos 70 DAG até 15,6 Ug^{-1} de nódulo aos 126 DAG, decaindo abruptamente para 9,4 Ug^{-1} de nódulo aos 154 DAG. Nas plantas com desfolha, a atividade da AST não mudou significativamente no decorrer do período experimental. Para plantas com o mesmo número de DAG, a atividade da AST não variou entre os grupos com e sem desfolha. As atividades da ALT e GDH nesse grupo de nódulos não foram influenciadas pelos tratamentos de desfolha nem pela idade das plantas. A quantidade de α KG presente no citosol destes nódulos, variou de maneira muito similar ao observado para a atividade da AST. No grupo de plantas sem desfolha, a quantidade de α KG aumentou de 0,32 $\mu mol g^{-1}$ de nódulo aos 70 DAG para 0,66 $\mu mol g^{-1}$ de nódulos aos 126 DAG, decaindo aos 154 DAG para 0,26 $\mu mol g^{-1}$ de nódulo. Nas plantas com desfolha, a maior quantidade de α KG foi observa-

da aos 126 DAG. Plantas com o mesmo DAG não diferiram no conteúdo de α KG entre os grupos com e sem desfolha. A quantidade de ureídeos presentes nestes nódulos variou consideravelmente, influenciada tanto pela idade das plantas quanto pelos tratamentos de corte da parte aérea. Nas plantas sem desfolha, a quantidade de ureídeos aumentou mais de três vezes, entre 70 DAG ($0,29 \mu\text{mol g}^{-1}$ de nódulo) e 154 DAG ($0,97 \mu\text{mol g}^{-1}$ de nódulo), enquanto que nas plantas com desfolha a quantidade de ureídeos aumentou entre 70 DAG ($0,11 \mu\text{mol g}^{-1}$ de nódulo) e 126 DAG ($0,29 \mu\text{mol g}^{-1}$ de nódulo), mantendo-se, então, estabilizada até o final do experimento.

Esses nódulos maduros de plantas que não sofreram desfolha sempre apresentaram maiores teores de ureídeos que aqueles de plantas que sofreram desfolhas, de mesmo DAG.

Nos nódulos imaturos observou-se apenas que a quantidade de alfa-cetoglutarato aumentou de $0,26 \mu\text{mol g}^{-1}$ de nódulo aos 70 DAG para $0,52 \mu\text{mol g}^{-1}$ de nódulo aos 126 DAG, no grupo de plantas que não sofreu desfolha. Por outro lado, as plantas do grupo com desfolha mostraram maior atividade da desidrogenase do glutamato ($0,52 \text{Ug}^{-1}$ de nódulo) que as plantas do grupo sem desfolha ($0,24 \text{Ug}^{-1}$ de nódulo) aos 126 DAG.

TABELA 1. Rebrotas da parte aérea seguida de desfolha em intervalos de 14 dias, a partir de 70 dias após a germinação da semente.

Dias após a emergência (DAG)	Peso seco, em g, da rebrota foliar de 14 dias aos		
	98 DAG	126 DAG	154 DAG
84	22,6 ¹	23,2	19,8
98	19,2	18,8	18,4
112		20,0	24,8
126		19,8	26,2
140			18,2
154			20,4
Peso seco das desfolhas	41,8	81,8	127,8
Peso seco na colheita final	47,2	61,4	40,3
Peso seco total	89,0	143,2	168,1

¹ Os pesos secos das rebrotas foliares, em intervalos de 14 dias, não são estatisticamente diferentes entre si. Os pesos secos totais são estatisticamente diferentes entre si para $P < 0.001$.

TABELA 2. Efeito da desfolha e idade das plantas nas características da copada.

Parâmetro	Grupo sem desfolha DAG				Grupo com desfolha DAG		
	70	98	126	154	98	126	154
Peso seco total da parte aérea, g	48,2 f	68,2 e	92,8 cd	98,6 c	89,0 d	143,2 b	168,1 a
Fração foliar, %	55,4 ba	51,2 cba	40,8 c	29,4 d	48,6 bc	58,2 ba	54,2 ba
Proteína na folha, %	26,6 a	27,6 a	26,4 a	25,4 a	29,0 a	28,4 a	23,2 a
Caules por planta	4,5 d	5,5 d	5,0 d	6,5 dc	11,0 cb	15,5 ba	19,5 a
Comprimento do caule, m	2,25 c	3,70 b	6,61 a	7,87 a	1,73 c	2,07 c	1,7 bc
Proteína no caule, %	8,2 b	8,1 b	7,2 bc	6,2 c	9,4 ba	10,4 a	8,2 b

Dentro de cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 3. Efeito da desfolha e idade das plantas na atividade da nitrogenase (red. C_2H_2) e em alguns componentes da nodulação.

Parâmetros	Grupo sem desfolha DAG				Grupo com desfolha DAG		
	70	98	126	154	98	126	154
Nodulação, % ¹	21,8 ba	23,6 ba	20,4 ba	14,4 b	24,6 a	26,8 a	21,4 a
Atividade nitrogenase $\mu\text{moles } C_2H_4 \text{ g}^{-1} \text{ nod h}^{-1}$	46,5 ba	58,0 ba	48,5 ba	32,5 b	61,0 a	62,5 a	38,5 ba
Nódulos maduros							
N.º por planta	240 a	210 cba	161 bc	139 c	242 a	248 a	190 cba
Peso fresco g^{-1} planta	8,10 b	9,08 bc	11,84 ba	11,08 ba	10,12 ba	11,22 ba	12,62 a
Nódulos imaturos							
N.º por planta	211 a	191 ba	121 b	112 b	209 a	229 a	162 ba
Peso fresco g^{-1} planta	0,70 dcb	0,68 dcb	0,42 cd	0,32 d	0,84 ba	1,12 a	0,68 dcb

¹ Nodulação (%) relação peso fresco nódulos/raiz + nódulos.

Dentro de cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 4. Efeito da desfolha e idade das plantas em alguns parâmetros do citosol do nódulo.

Parâmetro	Grupo sem desfolha DAG				Grupo com desfolha DAG		
	70	98	126	154	98	126	154
Nódulos maduros							
AST - U g^{-1} nódulo	10,6 cba	12,8 cba	15,6 a	9,4 c	15,4 a	13,6 ba	12,3 cba
ALT - U g^{-1} nódulo	0,52 a	0,62 a	0,54 a	0,45 a	0,52 a	0,54 a	0,38 a
GDH - U g^{-1} nódulo	0,48 a	0,52 a	0,48 a	0,36 a	0,44 a	0,34 a	0,42 a
$\mu\text{mol } \alpha\text{KG g}^{-1}$ nódulo	0,32 ed	0,46 dcb	0,66 a	0,26 e	0,58 cb	0,66 a	0,38 edc
$\mu\text{mol ureídeo g}^{-1}$ nódulo	0,29 d	0,59 d	0,89 b	0,97 a	0,11 f	0,29 d	0,28 ed
Nódulos imaturos							
AST - U g^{-1} nódulo	14,2 a	15,6 a	14,4 a	12,6 a	15,2 a	16,4 a	12,4 a
ALT - U g^{-1} nódulo	0,42 ba	0,44 ba	0,32 b	0,34 b	0,64 a	0,32 b	0,52 ba
GDH - U g^{-1} nódulo	0,38 cba	0,39 cba	0,24 c	0,23 b	0,32 cb	0,52 a	0,33 cb
$\mu\text{mol } \alpha\text{KG g}^{-1}$ nódulo	0,26 b	0,32 ba	0,52 a	0,36 ba	0,46 ba	0,32 ba	0,46 ba
$\mu\text{mol ureídeo g}^{-1}$ nódulo	0,02 b	0,03 a	0,02 b	0,03 a	0,03 a	0,03 a	0,03 a

Dentro de cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.

Os dados da Tabela 4 mostram, entretanto, que os níveis de ureídeos nos nódulos maduros foram de 3,6 a 44,5 vezes maiores que nos nódulos considerados imaturos, o que provavelmente corrobora a observação anterior (Purcino & Lynd 1982), segundo a qual os nódulos imaturos têm baixa capacidade de fixar nitrogênio. Vários autores já sugeriram que os ureídeos proporcionam um meio

eficiente de transporte de nitrogênio, com baixa relação C:N, contrastando com a glutamina e asparagina, dois dos aminoácidos encontrados em maiores concentrações no xilema das leguminosas (Sprent 1980, Newcomb & Tandon 1981, McClure et al. 1980). É interessante observar que as primeiras descrições botânicas desta planta, feitas no século passado (Bentham 1859, Bentham & Hooker

1865, Hooker & Jackson 1893), já mencionavam a presença de cristais, os quais são componentes oticamente ativos associados aos ureidoglicolatos (alantoinatos e uréia-glioxalatos) (Purcino & Lynd 1982).

Da mesma maneira, o papel do alfa-cetoglutarato na assimilação do nitrogênio recém-fixado, via GDH ou GS-GOGAT, já foi bastante discutido na literatura (Brown & Dilworth 1975, Ryan & Fottrell 1974, Rawsthorne et al. 1980).

Várias leguminosas perenes como a copada têm recebido pouca atenção por parte dos pesquisadores. Entretanto, esta planta é nativa no Brasil sob várias condições de clima e solo (Purcino & Lynd 1984), indicando seu potencial como material forrageiro; mas, para que este potencial possa ser utilizado, é necessário que suas características fenológicas e fisiológicas sejam mais claramente estabelecidas em nível de campo.

CONCLUSÕES

1. As plantas que sofreram desfolha em intervalos de quatorze dias produziram maior crescimento aéreo do que as plantas não desfolhadas e de DAG correspondente.

2. A idade das plantas que receberam tratamento de desfolha não influenciou a nodulação nem a atividade da nitrogenase.

3. Nas plantas que não receberam tratamento de desfolha, o número de nódulos maduros e imaturos decresceu entre 70 e 154 DAG.

4. A idade das plantas e os tratamentos de desfolha tiveram grande influência nos parâmetros bioquímicos, tanto dos nódulos maduros como dos imaturos.

REFERÊNCIAS

- BENTHAM, G. Leguminosae. In: MARTINS, K.F.P. von, ed. *Flora Brasiliensis*. Leipzig, Monachus, 1859. p.157.
- BENTHAM, G. & HOOKER, J.D. *Genera Plantarum*. s.l., s. ed., 1865. 536p.
- BERGERSEN, F.J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23:1015-25, 1970.
- BERGMEYER, H.U. Determination of substance concentration of metabolites, and determination of catalytic activity of enzymes. In: BERGMEYER, H.U. & GAWEHN, K. *Principles of enzymatic analysis*. Weinheim, Chemie, 1978. p.40-78.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. Glutamate - oxaloacetate transaminase, UV assay manual method. In: BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 2. ed. New York, Academic Press, 1974a. v.2, p.728-33.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. Glutamate - pyruvate transaminase, UV assay manual method. In: BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 2. ed. New York, Academic Press, 1974b. v.2, p.742-58.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. 2 - oxoglutarate, UV spectrophotometric determination. In: BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 2. ed. New York, Academic Press, 1974c. v.3, p.1577-80.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Ontogenetic interactions between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Plant Physiol.*, 60: 419-21, 1977.
- BROWN, C.M. & DILWORTH, M.J. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacterioids. *J. Gen. Microbiol.*, 86:39-48, 1975.
- COSTA, N.M.S.; FERREIRA, M.B. & CURADO, T.F.C. Leguminosas nativas do Estado de Minas Gerais; coleta e avaliações preliminares de alguns gêneros. Belo Horizonte, EPAMIG, 1978.
- DÖBEREINER, J. & CAMPELO, A.B. Importance of legumes and their contribution to tropical agriculture. In: *TREATISE on dinitrogen fixation*. New York, J. Wiley, 1977. p.191-200.
- DUCKE, A. Notas sobre a flora neotrópica. II. As leguminosas da Amazônia. Belém, Inst. Agr. do Nordeste, 1949. (Boletim técnico, 18)
- GRAY, F. & ROOZITILAB, M.H. Benchmark and key soils of Oklahoma; a modern classification system. s.l., Oklahoma Exp. Stn., 1976. 36p. (MP, 97)
- HOOKE, J.D. & JACKSON, B.D. *Index Kewensis*. London, Oxford Univ. Press, 1893. v.1, p.637.
- LOWRY, O.N.; NIRA, J.; ROSEMBROUGH, A.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
- LYND, J.Q.; MCNEW, R.W. & ODELL JUNIOR, G.V. Defoliation effects on regrowth, nodulation and nitrogenase activity at anthesis with hairy vetch. *Agron. J.*, 72:991-4, 1980.
- LYND, J.Q. & ODELL JUNIOR, G.V. Regrowth, nodulation, and nitrogenase activity of *Strophostyles helvola* with rigorous defoliation. *Agron. J.*, 75: 129-32, 1983.
- MCCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. & VOLK, R.J. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans. *Plant Physiol.*, 66:720-5, 1980.

- MINCHIN, F.P.; WITTY, J.F.; SHEEKY, J.E. & MULLER, M. A major error in the acetylene reduction assay; decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.*, 34:641-9, 1983.
- NEWCOMB, E.H. & TANDON, S.R. Uninfected cells of soybean root nodules; ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science*, 212:1394-6, 1981.
- PURCINO, A.A.C. & LYND, J.Q. Efeito da fertilidade do solo no crescimento, nodulação e bioquímica dos nódulos de *Cratylia floribunda* Benth. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 19(6):669-78, jun. 1984.
- PURCINO, A.A.C. & LYND, J.Q. Growth stage effects on nitrogenase, nitrate reductase, and ureide content in nodules of "Copada". *Soil Sci.*, 133:186-94, 1982.
- RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; COOKSON, C. & COMBS, J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry*, 19:341-55, 1980.
- RYAN, E. & FOTRELL, P.F. Subcellular location of enzymes involved in the assimilation of ammonia by soybean root nodules. *Phytochemistry*, 13:2647-52, 1974.
- SCHMIDT, E. Glutamate dehydrogenase; UV assay. In: BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. 2. ed. New York, Academic Press, 1974. v.2, p.650-6.
- SPRENT, J.I. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some leguminosae. *Plant Cell Environ.*, 3:35-43, 1980.
- TRIJBELS, F. & VOGELS, G.D. Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 113:292-301, 1966.
- TRINICK, J.J.; DILWORTH, M.J. & GROUNDS, M. Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of *Lupinus* species. *New Phytol.*, 77:359-70, 1976.
- VANCE, C.P.; HEICHEL, G.H.; BARNES, D.K.; BRYAN, J.W. & JOHNSON, L.W. Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa*, L.) following harvest. *Plant Physiol.*, 64:1-3, 1979.
- WILLIAMS, W.A. The role of the leguminosae in pasture and soils improvement in the neotropics. *Trop. Agric., Trinidad*, 44:103-15, 1967.
- WITTY, J.F. Acetylene reduction assay can overestimate nitrogen-fixation in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 11:209-10, 1979.