

Metabolismo do Carbono nos Nódulos



Foto: Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1517-8498
Agosto/2008*

Documentos 253

Metabolismo do Carbono nos Nódulos

Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara
Veronica Massena Reis

*Seropédica – RJ
2008*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Maria Cristina Prata Neves e Robert Michael Boddey

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2008): 50 exemplares

A347m Alcântara, Rosa Maria Cardoso Mota de

Metabolismo do carbono nos nódulos / Veronica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 27 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 253)

1. Metabolismo. 2. Carbono. 3. Nódulo. I. Reis, V. M., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 572.4

Autores

Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara

M. Sc. em Solos e Nutrição de Plantas

Embrapa Meio Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 – Buenos Aires,
Teresina/PI – Brasil, CEP 64006-220.

e-mail: rmaria@cpamn.embrapa.br

Veronica Massena Reis

Eng^a Agrônoma, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da
Embrapa Agrobiologia.

BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,
Seropédica/RJ

e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa (2008-2011), desenvolvimento e inovação com a seguinte missão “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 253 intitulada “Metabolismo do carbono nos nódulos” discute processos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao custo energético da formação de nódulos e do seu funcionamento em leguminosas inoculadas com rizóbio. O entendimento destas vias metabólicas que regulam o balanço energético nas plantas é de suma importância para estudar a fixação biológica de nitrogênio visto que este processo consome grande quantidade de carboidratos derivados da fotossíntese. As informações disponíveis nesta publicação podem ajudar a estudantes, técnicos e pesquisadores a compreenderem melhor a importância de se buscar plantas mais eficientes na conversão de energia dos processos fotossintéticos, como forma obter cada vez mais, a substituição dos fertilizantes nitrogenados obtidos em processos químicos industriais por fixação biológica de nitrogênio na busca de uma agricultura sustentável.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

Introdução.....	7
O metabolismo do carbono e a fixação biológica de nitrogênio	8
Inter-relação entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio	13
Ação das enzimas no metabolismo do carbono	15
Influência de estresses abióticos no metabolismo do carbono	18
Conclusões	22
Referências Bibliográficas	22

Metabolismo do Carbono nos Nódulos

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara
Veronica Massena Reis*

Introdução

A base material e energética para a evolução da vida na Terra foi criada por meio da atividade fotossintética dos organismos autotróficos. Os produtos finais da fotossíntese são o oxigênio e o carbono assimilado, sendo ambos, igualmente importantes para todos os organismos vivos. O oxigênio tornou-se condição prévia para a respiração, enquanto que, os carboidratos tornaram-se substratos universais para a respiração e o ponto de partida para diferentes vias metabólicas.

Associado ao oxigênio e ao carbono, o nitrogênio é um elemento essencial aos seres vivos, sendo que do ponto de vista econômico e ambiental, é o nutriente que mais influencia a produção agrícola. Sua disponibilidade biológica no solo, juntamente com o fósforo (P), enxofre (S) e potássio (K) tem relação direta com a produtividade agrícola.

Este elemento é encontrado abundantemente na atmosfera na sua forma mais estável (N_2), constituindo cerca de 80% do seu volume total. No entanto, nesta forma é quimicamente inerte e não disponível para os seres vivos, visto que a maioria dos organismos não consegue incorporá-lo a esqueletos de carbono, a não ser que ocorra a redução do N_2 atmosférico a N-amoniacal (MAYS-FIGUEROA, 2004).

Existem, basicamente, duas alternativas para a realização da conversão do nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3): a fixação química (industrial) e a fixação biológica do nitrogênio (FBN). A FBN é o processo biológico de fixação do N_2 , no qual a energia utilizada é o ATP, produzido por energia solar e convertido em energia química, cujos fotossintatos são importantes porque: geram força redutora e ATP para o sistema nitrogenase; são substratos para o crescimento e manutenção das células microbianas e suprem esqueletos de carbono, ATP e força redutora para a assimilação de NH_3 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

No processo da FBN, a funcionalidade da fixação do N_2 é garantida pelo estabelecimento de um eficiente sistema vascular no interior do nódulo, que supre as bactérias fixadoras com nutrientes. A nutrição básica desses microrganismos constitui-se na fosforilação oxidativa dos produtos elaborados nas folhas pelo processo da fotossíntese (sacarose, glicose e ácidos orgânicos), liberando energia para as bactérias. Estas, por sua vez, fixam o N_2 , o qual, por meio da ação da enzima nitrogenase, é reduzido a NH_3 . Em seguida, a amônia fixada é assimilada na forma de ureídeos ou amidas, cuja origem é proveniente da ação da glutamina sintetase e da glutamato sintase. Cerca de 90% do nitrogênio total presente na seiva do xilema das leguminosas tropicais, é translocado na forma de ureídeos em direção à parte aérea da planta (VARGAS & HUNGRIA, 1997)

Para sua atividade, os bacteróides precisam de N gasoso (N_2) como matéria prima; produtos da fotossíntese, que são desdobrados na presença de oxigênio (O_2) para formar adenosina-trifosfato (ATP), gerando a energia necessária à redução do N_2 ; nitrogenase, como sistema enzimático que reduz N_2 a NH_3 ; um sistema doador de elétrons e, por fim, um substrato receptor da amônia produzida para sua posterior incorporação ao metabolismo nitrogenado da planta na forma de ureído (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O metabolismo do carbono nos nódulos é, portanto, a base do processo da FBN, haja vista que os nódulos necessitam assimilar carbono como fonte de energia para os microsimbiontes e para fornecer esqueletos de carbono para a assimilação do amônio produzido para o desenvolvimento e biosíntese de amido (SCHUBERT, 2002).

O metabolismo do carbono e a fixação biológica de nitrogênio

A FBN é um dos processos mais importantes da natureza e os requerimentos essenciais para seu estabelecimento são: microrganismos procarióticos; presença da nitrogenase; exclusão do oxigênio molecular e fonte de carbono orgânico. Sua eficiência, portanto, se baseia no suprimento de fotoassimilados para os bacteróides nos nódulos; manutenção de baixas concentrações de oxigênio (O_2) no interior do nódulo e rápida exportação do nitrogênio fixado (RICHTER, 1993).

A estabilidade do gás N_2 é devida à presença de uma forte ligação tríplice entre as duas moléculas de N. Conseqüentemente, a redução biológica deste nitrogênio tem um custo energético muito alto, o que restringe este processo a apenas algumas espécies de procariotos que possuem a enzima nitrogenase, capaz de reduzir N_2 para a forma inorgânica combinada ao NH_3 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O metabolismo dos carboidratos nos nódulos fornece energia e poder redutor para os bacteróides e células corticais e também os esqueletos de carbono para o transporte do nitrogênio fixado. A sacarose, produto da fotossíntese é a principal fonte de energia para os nódulos, sendo metabolizada à dicarboxilados, enzimaticamente, no citoplasma vegetal. Estes dicarboxilados, então, suprirão a demanda energética dos bacteróides ativos no processo da FBN (REIS et al., 2006).

NEVES (1981) argumentou que embora a sacarose seja o carboidrato mais abundante nos nódulos, os bacteróides isolados são incapazes de metabolizar essa forma de carbono, já que não possuem invertase, que está presente, exclusivamente, no citosol da célula vegetal.

Outros estudos indicam que existem compostos reduzidos de carbono (C) em abundância nos nódulos, sendo possível a utilização de mais de um composto, bem como, variações qualitativas no fornecimento de compostos energéticos que dependem do desenvolvimento do nódulo e da espécie vegetal (REIS et al., 2006).

Neste aspecto, apesar de a sacarose ser considerada como a fonte primária de carbono para o crescimento, respiração, manutenção e fixação de nitrogênio, outros açúcares como, por exemplo, glucose, inositol, arabinose e frutose, ocorrem nos nódulos e podem servir de fonte de carbono para os bacteróides (NEVES, 1981).

No nódulo, os metabolismos do C e do N estão adaptados ao ambiente com baixo teor de oxigênio (O_2), sendo que a baixa concentração de O_2 no nódulo é mantida pela geração de uma barreira de difusão no córtex do nódulo, pelo direcionamento da glicólise para formação de malato, com subsequente formação redutiva do succinato quando o teor de O_2 é alto, e pela formação

de ATP no bacteróide e sintetase da leghemoglobina que se liga ao O₂ e controla a sua disponibilidade para o bacteróide (VANCE & HEICHEL, 1991).

O sinal essencial para o início da fixação é a redução da tensão de oxigênio dentro do nódulo. Em adição, proteínas chaves como NifA são diretamente inativadas pela presença de altas tensões de O₂ em alguns rizóbios. O resultado para qualquer tipo de bacteróide é a baixa expressão da dependência de O₂ para a ativação do complexo nitrogenase (proteína ferro e molibdênio-ferro) e a alta afinidade a terminal oxidase *cbb*₃.

O primeiro produto estável no processo de fixação do N₂ é a amônia que é transferida do bacteróide, através da membrana peribacterioidal para o citosol da planta hospedeira. A amônia é assimilada pela glutamina sintase (GS) no citoplasma da célula infectada, sendo convertida a glutamina. Em seguida ocorre a ação da glutamato sintase (GOGAT) que converte a glutamina em glutamato (HUNGRIA, 1994).

Tem sido estabelecido que a planta provenha carbono e fonte de energia para o bacteróide na forma de ácidos dicarboxílicos, particularmente malato e succinato (LODWIG & POOLE, 2003). Ácidos dicarboxílicos-C₄ entram diretamente no metabolismo via ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e isto sugere um modelo simples de metabolismo do bacteróide, que tem sido descrito como modelo clássico. Para usar um ácido dicarboxílico-C₄ como o malato, uma molécula é normalmente oxidada a oxalacetato através da malato desidrogenase e uma segunda molécula de malato pode ser oxidada e decarboxilada pela enzima málica a piruvato. Após a oxidação do piruvato a acetil-coA, esta pode ser condensada com oxalacetato a citrato, permitindo que o ciclo da TCA continue (PRELL & POOLE, 2006).

O glutamato contendo o N derivado da FBN é usado na síntese de compostos aminados que suprirão outros tecidos das plantas, sendo que a molécula usada no transporte deste N varia entre as diferentes espécies de leguminosas. Em geral, leguminosas de clima tropical exportam ureídos, enquanto as de clima temperado exportam amidas (UDVARDI et al., 1990).

De acordo com MOREIRA & SIQUEIRA (2006), as vias de assimilação da amônia diferem não apenas nos produtos exportados dos nódulos para o caule e folhas, via xilema, como também no custo energético desse transporte. Quando ureídos (alantoínas e ácidos alantóicos) são os carboidratos transportados a relação C:N é cerca de 1:1, enquanto que para amino-compostos (asparagina e glutamina) a relação é de 2:1, ou seja, os custos energéticos são diferentes.

PIMENTEL (1998) cita que o custo de C para a FBN é estimado em 6 a 12 g de C g⁻¹N fixado, quando são incluídos os custos do crescimento e manutenção dos nódulos, portanto um custo alto quando comparado ao custo da redução de NO₃ nas folhas. Outros autores consideram que a eficiência do processo da FBN em termos de fotossintatos consumidos pode variar de 20 a 0,3 g de C g⁻¹N fixado, sendo que com grande freqüência é encontrada a variação de 6 a 8 g de C g⁻¹N fixado, o que corresponde a 1,2 a 1,5 mol de glicose por mol de NH₃ (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A FBN é, portanto, dependente da formação de fotoassimilados e conseqüentemente a taxa de fixação é proporcional à taxa fotossintética do vegetal. Alguns estudos indicam que o pico da FBN ocorre no início da floração, quando há maior taxa fotossintética. Nas fases subseqüentes, há uma diminuição da fotossíntese e a competição por carboidratos para os órgãos reprodutivos aumenta, diminuindo a FBN (PATE, 1996). No entanto, NEVES (1981) considera que em algumas leguminosas anuais, as taxas mais altas de fixação ocorrem durante o início da frutificação, quando também é observado maior acúmulo de nitrogênio nas plantas.

Estudos recentes têm analisado os genes responsáveis pelo transporte do C como substrato. WANG et al. (1989) identificaram os genes que controlam o transporte de ácidos de C4 – dicarboxílico (dct) do *Rhizobium meliloti* e determinaram a seqüência do nucleotídeo da região do controle do gene estrutural dctA e do gene regulatório dctBD. Observaram que existe um elevado grau de homologia com os genes do dct do *Rhizobium leguminosarum*, sendo que em células de vida livre, os genes regulatório do dctBD são requeridos absolutamente para a expressão do gene do dctA, enquanto que no ambiente do nódulo da raiz isto não acontece.

Em síntese, devido ao alto consumo energético da reação de fixação, o processo da FBN deve estar ligado a um suprimento contínuo e eficaz de carbono orgânico, para geração de ATP e poder redutor correspondente.

A nitrogenase no bacteróide catalisa a redução de seis elétrons do nitrogênio gás a amônio e está associado a redução de 2H^+ para H_2 utilizando 16-18 moléculas de ATP (DIXON & KAHN, 2004). Amônio é secretado para a planta e incorporado em amidas como a glutamina e asparagina (em vários legumes, especialmente aqueles com nódulos indeterminados) ou na forma de ureídos que são derivados das purinas (principalmente em legumes tropicais com formação de nódulos determinados) (LODWIG & POOLE, 2003). Existe uma grande discussão sobre a habilidade do bacteróide de assimilar amônia fixada para seu próprio uso. A via principal de assimilação é através da glutamine sintase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) que são reprimidas no bacteróide, e mutantes nestes genes são usualmente inafetados na fixação de nitrogênio. A atividade da glutamato dehidrogenase (que resulta na assimilação de amônio) não é detectada em rizóbio, mas tem sido aclamado que alanina, ao invés de amônio, é o produto excretado de bacteróides isolados de soja (PRELL & POOLE, 2006).

Algumas evidências têm sugerido que o metabolismo do bacteróide é um pouco mais complexo. Experimentos têm demonstrado que embora pequenas concentrações de malato e succinato estimulem a FBN, mesmo quantidades modestas de ácidos dicarboxílicos são inibitórias (BERGERSEN & TURNER, 1990). Bacteróides de soja parecem responder com um pulso respiratório quando altas concentrações de ácido dicarboxílico são adicionadas (BERGERSEN & TURNER, 1990). Isto pode estar relacionado com perturbações no metabolismo e/ou cadeia respiratória de bacteróides isolados, mas a alternativa é que a oxidação de ácidos dicarboxílicos por si só resulta em desbalanceamento do metabolismo sendo inibitório para o ciclo do TCA. Deve-se levar em consideração que bacteróides são células em estado de não crescimento e precisam atingir um balanço entre as entradas e saídas de carbono e energia. Por exemplo, um excesso de carbono e poder redutor pode simplesmente induzir a biosíntese de células em crescimento, mas podem causar problemas em células que não estejam em crescimento.

Inter-relação entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio

As vias metabólicas do carbono e do nitrogênio estão interligadas de várias maneiras. Ambas as vias utilizam a energia, os esqueletos de carbono e o poder redutor disponíveis no metabolismo celular. Estudos recentes têm demonstrado que o metabolismo do carbono e do nitrogênio são modulados de uma forma paralela e também, coordenada, nas plantas superiores.

A fixação simbiótica de N pela simbiose leguminosa - *Rhizobium* é um processo muito bem regulado que envolve significativamente o inter-relacionamento do metabolismo do C e N pela planta. Os nódulos de leguminosas que fixam N simbioticamente são modelos de como ocorre o metabolismo de C e N. Observa-se que embora os nódulos compreendam apenas uma pequena proporção do peso da planta, consomem 13 a 28% dos fotossintatos totais da leguminosa. Esta grande demanda do C é devido à redução do N_2 a NH_3^+ que requer um substancial *input* de energia (VANCE et al., 2005).

Segundo SCHULZE (2004), existem três teorias que explicam a regulação do metabolismo do C e N e o nível do papel da planta. A primeira teoria é a da regulação do suprimento do C, a qual afirma que a taxa de fixação do N é regulada pelo fornecimento de assimilados dos nódulos ou pelo metabolismo de assimilados dos compostos que podem ser usados pelos bacteróides. A segunda teoria considera a regulação do suprimento de O_2 e assume que a difusão de oxigênio dentro do nódulo é totalmente regulada e o principal fator regulador é a taxa de fixação de N. Por sua vez, a terceira teoria indica a regulação do *feedback* de N, sugerindo que o produto da fixação de N ou assimilação exerce um impacto regulador.

Um dos paradigmas da fixação simbiótica de N tem sido aquele que os bacteróides reduzem N_2 para amônia sem assimilação interna de aminoácidos. Isto tem sido recentemente um desafio para trabalhos com soja mostrando que apenas a alanina é excretada em experimentos com ^{15}N marcado. O caminho da síntese da alanina tem sido mostrado ser via alanina desidrogenase, estando diretamente ligada ao metabolismo do C e a assimilação de N no bacteróide (POOLE & ALLAWAY, 2000).

O custo biológico de C na fixação simbiótica do N é substancialmente maior do que o custo teórico do C devido à intrínseca complexidade do sistema simbiótico, incluindo o desenvolvimento do nódulo e a manutenção do metabolismo do C e N. Portanto, a aparente integração do metabolismo do N e C nos nódulos desempenha um papel chave nas leguminosas e no ciclo de C, bem como é considerado como fator crítico no crescimento e desenvolvimento (VANCE et al., 2005).

De acordo com VANCE (2004), os metabolismos de C e N estão altamente integrados na fixação de N₂ nos nódulos e apesar da sucrose ser o primeiro composto de C translocado para os nódulos, ela não é usada pelos bacteróides para suprir o requerimento de energia da nitrogenase. Além disso, a sucrose é metabolizada por malato e succinato, via sintase sucrose e glicose, em coordenação com o ciclo TCA.

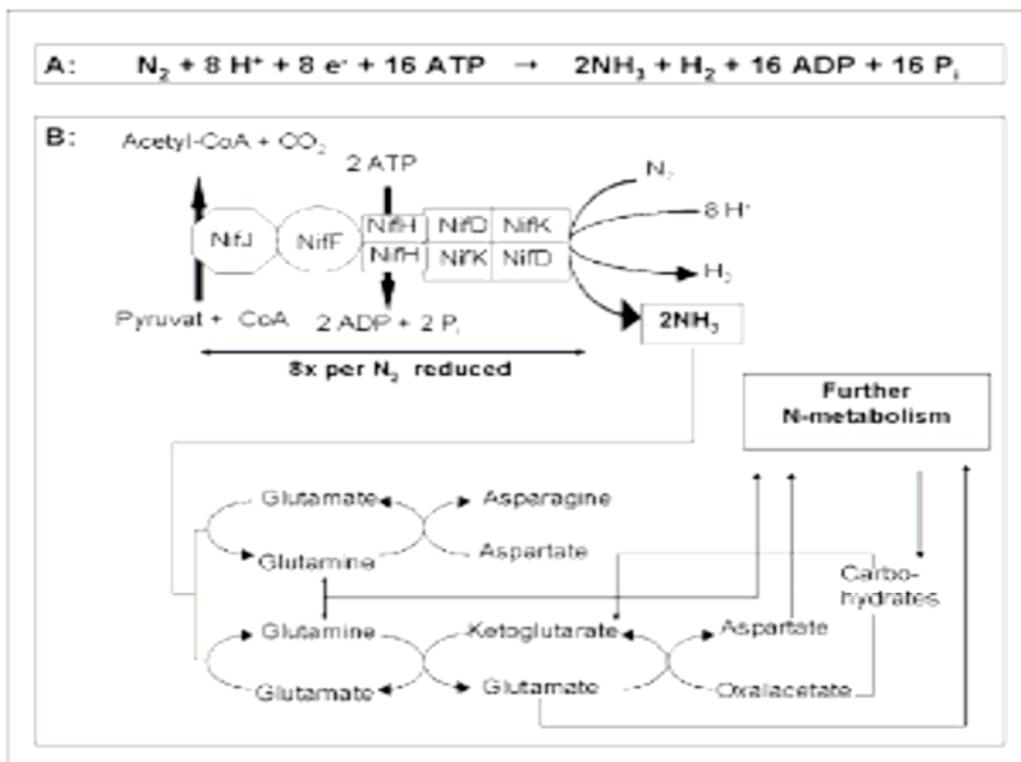


Figura 1: Reação e mecanismo molecular da fixação biológica de nitrogênio. A: reação de redução do N₂ B: estrutura esquemática da operação do complexo enzimático da nitrogenase e subsequente metabolismo do nitrogênio. Os elétrons são transportados da ferredoxina reduzida (ou flavodoxina) via azoferredoxina para molibdênioferredoxina. Cada mol de nitrogênio fixado requer 16 mol de ATP hidrolizado pela proteína NifH. O NH₃ produzido é utilizado na síntese de glutamina ou glutamato, respectivamente, para o metabolismo do N (KNEIP et al., 2007).

Em síntese, a inter-relação dos metabolismos de C e N tem como base o fato que o nitrogênio é usado na produção dos órgãos fotossintéticos e o carbono produzido nesses órgãos é necessário para fornecer a energia utilizada na fixação do nitrogênio, redução do nitrato e assimilação do nitrogênio em proteínas, além de fornecer os esqueletos de carbono necessários ao processo de assimilação (NEVES, 1981).

Conseqüentemente, a eficiência dos nódulos no consumo de carboidratos depende não só dos processos metabólicos relacionados com a utilização do carbono como, também, das vias metabólicas envolvidas na assimilação do nitrogênio e na formação dos compostos nitrogenados transportados do nódulo até a parte aérea.

Ação das enzimas no metabolismo do carbono

Para a fixação de N e assimilação de N fixado (amônia) dentro dos compostos orgânicos, a fonte de energia é fornecida nas formas de fotossintatos pela planta hospedeira. Em virtude dos nódulos das leguminosas apresentarem altas taxas de metabolismo de carbono e nitrogênio, muitas enzimas estão envolvidas na assimilação de C e N e têm mostrado atividade nos nódulos quando comparados com outros órgãos de plantas.

No início do processo de fixação de N, as reações são mediadas pela glutamina sintetase e glutamato sintase, sendo que atividades elevadas de glutamato desidrogenase (GDH) já foram detectadas nos nódulos de leguminosas, tendo sido observado que a assimilação via GDH ocorreria pela adição da amônia ao ácido 2-oxoglutarato, gerando glutamato (HUNGRIA et al., 1999). No entanto, devido às baixas concentrações de amônia encontrada nos nódulos e ao elevado Km da enzima (14 μ M) é pouco provável que essa via de assimilação seja utilizada (ATKINS, 1991).

Estudos indicam que a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), responsável pela fixação de dióxido de carbono nas plantas C₄ tem também sido encontrada desempenhando importante papel no metabolismo de carbono nos nódulos (KÜSTER et al., 1993).

GARG et al. (2004) verificaram por meio da purificação da PEPC em nódulos de leguminosas que esta é mediada pela fixação de CO₂ nos nódulos e resulta na síntese de ácido dicarboxílico, aspartato, malato e

fumarato, os quais podem ser transportados dentro dos bacteróides com a intervenção do transportador dicarboxilato (DCT).

Para maximizar o metabolismo de C e N em um ambiente limitado pela presença de O₂, tanto a planta como a bactéria de nódulos efetivos apresentam adaptações. A glicólise das plantas parece ser desviada para síntese do ácido málico com síntese redutiva do fumarato e succinato, enquanto que os bacteróides dos nódulos utilizam estes ácidos orgânicos como combustível para a energia da atividade da nitrogenase (VANCE & GANTT, 1992).

THUMMLER & VERMA (1987) verificaram que nos nódulos, a sintase sucrose é essencial para a síntese da sucrose translocada para a raiz no suprimento do metabolismo e que os níveis de sintase sucrose mRNA e proteína nos nódulos de soja são 10 a 20 vezes maior do que aqueles dos tecidos da raízes.

Atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC, EC 4.1.1.31), malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) e aspartato aminotransferase (AAT, EC 2.6.1.1), são muito altas nos nódulos e podem mediar o fluxo de carbono entre *pools* de aminoácidos e ácidos orgânicos (VANCE & GANTT, 1992).

SILVENTE et al. (2002) avaliando os eventos bioquímicos em nódulos de *Phaseolus vulgaris* inoculado com *Rhizobium etli* mutante (CFN 037) e rizóbio nativo (CE 3), verificaram que o conteúdo de ureídeos no xilema foi menor, enquanto que os aminoácidos foram maiores em plantas inoculadas com CFN 037 comparadas com CE 3. Dando suporte a esses resultados, enzimas envolvidas na síntese do ureídeos foram reduzidas, enquanto a atividade do aspartato aminotransferase, glutamato sintase, sucrose sintase e glucose-6-P desidrogenase foram maiores em nódulos induzidos com CFN 037.

KAVROULAKIS et al. (2000) estudando o papel da anidrase carbônica (CA) em nódulos de *Glycine max*, verificaram que nos estágios de desenvolvimento inicial dos nódulos a CA facilitava a reciclagem de CO₂, enquanto que em estágios mais avançados favorecia a difusão de CO₂ fora do sistema do nódulo.

BOLAND et al. (1978) avaliaram doze espécies de leguminosas e mediram os níveis da atividade da glutamina sintetase, do glutamato desidrogenase e do glutamato sintase NADH-dependente em extratos

do citoplasma do nódulo. Observaram que os nódulos de todas as espécies continham quantidades substanciais de glutamina sintetase, sendo que os níveis de glutamato sintase foram encontrados na faixa de 7 a 100% superiores aos da glutamina sintetase, enquanto que os níveis de glutamato dehidrogenase variaram extensamente entre 0,2 e 150% em comparação aos de glutamina sintetase. Concluíram que a assimilação da amônia ocorre por meio da glutamina sintetase e do glutamato sintase NADH-dependente, sendo estas enzimas catalisadoras universais das reações do metabolismo nos nódulos das leguminosas.

De acordo com diversos estudos, a rota principal da assimilação da amônia produzida pelos bacteróides é a via glutamina sintetase – glutamato sintase nas células hospedeiras. Entretanto, a dehidrogenase do glutamato pode também ser envolvida na assimilação da amônia. Estas enzimas ocorrem também em culturas *in vitro* de rizóbio e nos bacteróides onde participam provavelmente na síntese dos aminoácidos para o crescimento das bactérias ou dos bacteróides. O nitrogênio assimilado na glutamina ou no glutamato é exportado dos nódulos em uma variedade de formas, que incluem a asparagina, a glutamina, o aspartato, a homoserina e os alantoatos, nas proporções que dependem da espécie da leguminosa. Estudos sobre regulação do processo total focalizaram a expressão dos genes dos bacteróides no controle da atividade das enzimas, principalmente, a nitrogenase e as enzimas da assimilação do nitrogênio (RAWSTHORNE et al., 1980).

Um outro estudo indicou que em grão-de-bico (*Cicer arietinum*) associado a *Rhizobium* sp., toda a capacidade de síntese da sucrose estava no citosol dos nódulos e que a atividade específica das enzimas envolvidas na síntese da sucrose aumentava paralelamente com a atividade de redução do acetileno (ARA) nos nódulos. O mesmo ocorria com o conteúdo total do N de plantas até aproximadamente 7 semanas após o plantio, quando geralmente ocorria o florescimento. Consequentemente, o tamanho dos nódulos e o conteúdo de N nas plantas continuaram a aumentar, mas houve uma diminuição na ARA e na atividade específica das enzimas extraídas do nódulo (COPELAND et al., 1995).

Influência de estresses abióticos no metabolismo do carbono

As bactérias evoluíram em uma ampla variedade de estratégias metabólicas para lidar com os ambientes variados. Algumas são especialistas e somente sobrevivem em ambientes restritos; outras são generalistas e sobrevivem em circunstâncias ambientais diversas. As espécies *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* podem sobreviver e competir por nutrientes em solo e em rizosfera de plantas, mas também, podem formar uma simbiose benéfica com leguminosas em um ambiente altamente especializado (PRELL & POOLE, 2006).

Manejos que diminuem o fornecimento de fotossintatos invariavelmente decrescem a atividade dos nódulos, enquanto aqueles que incrementam a fotossíntese irão aumentar a fixação e a longevidade dos nódulos.

Fatores ambientais tais como a disponibilidade de luz e CO₂, assim como o estado nutricional têm um impacto profundo sobre o suprimento de energia, esqueletos de carbono e outros substratos que suportam o metabolismo de carbono e de nitrogênio.

Vários autores têm demonstrado que em condições de estresses abióticos (déficit hídrico, temperatura e salinidade) o decréscimo na fixação simbiótica também reduz a mRNA, proteína e níveis de atividade da sintase sucrose nos nódulos de soja (GONZÁVEZ et al., 1995). Outros experimentos mostraram mudanças periódicas na fixação de nitrogênio, sendo esta mais intensa durante o dia do que a noite (GORDON, 1991).

NAYA et al. (2007) estudando o comportamento do metabolismo de C nos nódulos de alfafa (*Medicago sativa*), submetida a estresse hídrico, observaram que as plantas expostas a moderada seca (21,3 MPa) não apresentavam efeito na atividade da sucrose sintase (SS), mas mostravam inibição na atividade da nitrogenase (243%), na acumulação de succinato (136%) e sucrose (158%) e na regulação de genes de citosol codificado CuZn-superóxido dismutase (SOD). Por outro lado, a intensificação do estresse (22,1 MPa) diminuiu as atividades da nitrogenase (282%) e da SS (230%), mas aumentou o malato (140%), succinato (168%) e sucrose (1435%). O estresse

hídrico não afetou o gene *nifH* mRNA e a expressão do nível de leghemoglobina, embora tenha diminuído as proteínas MoFe e Fe.

No mesmo estudo foi verificado que a adição de água às plantas conduziu a recuperação parcial das atividades das proteínas (75%) e da nitrogenase (64%) e uma completa recuperação da sucrose, com diminuição do malato (248%) em relação ao controle (NAYA et al., 2007).

STREETER (2003) observou que em plantas de soja (*Glycine max* L.) submetidas a estresse hídrico, por um período de 4 semanas, durante o desenvolvimento reprodutivo e sem qualquer suprimento de N - mineral, ocorria uma depressão de 30 - 40% no conteúdo das folhas e vagens e um aumento de 50% na acumulação de polissacarídeos nos nódulos de plantas estressadas, indicando um severo declínio na atividade da fixação de N durante o estresse hídrico. O autor concluiu que o impacto negativo sob os nódulos foi devido à depressão do suprimento de C para os bacteróides.

Por outro lado, ao final do período de estresse hídrico foi observado que a concentração de carboidratos, aminoácidos e ureídeos foi significativamente aumentada nos nódulos das plantas estressadas, confirmando que sob condições de déficit hídrico, a atividade de fixação de N nos nódulos foi diminuída porque a demanda por N fixado foi menor para sustentar o desenvolvimento (STREETER, 2003).

Anteriormente GONZÁLEZ et al. (1998) haviam investigado o efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo de carbono e nitrogênio nos nódulos de *Pisum sativum*, onde as plantas foram mantidas a -1.0 MPa por um período de 14 dias. Constataram que as atividades de fosfoenolpiruvato carboxilase, glutamato sintetase, alcalino invertase, piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase, uridina pirofosforilase e malato desidrogenase, nos nódulos, não foram afetadas pelo estresse hídrico, enquanto que a sucrose sintase (SS), enzima que hidrolisa a sucrose para sustentar o metabolismo no nódulo, diminuiu para 50% na atividade e 25% no conteúdo.

O mesmo grupo de estudo verificou em um segundo experimento, no qual as plantas foram mantidas a -1.5 MPa, por um período de 14 dias que a SS diminuiu em 75% junto com a glutamato sintetase e a aspartato aminotransferase, que diminuíram 60% e 40%, respectivamente. Coincidentemente com o declínio destas atividades,

houve um elevado aumento no conteúdo de sucrose nos nódulos e um pequeno aumento nos níveis de aminoácidos livres (GONZÁLEZ et al., 1998).

Tem sido sugerido, recentemente que o declínio na atividade de SS e, portanto, um reduzido potencial para metabolizar sucrose, pode ser um importante fator para a resposta dos nódulos de soja a déficit hídrico. Estes resultados sugerem que estas observações podem ocorrer também em leguminosas com nódulos indeterminados (GONZÁLEZ et al., 1998)

Com relação à salinidade, FERRI et al. (2000) examinaram o efeito da salinidade sobre o crescimento, a fixação de N e o metabolismo de carbono no citosol dos nódulos e nos bacteróides de *Phaseolus vulgaris*. O objetivo do estudo foi averiguar se os compostos acumulados, sob estresse salino, aumentavam a respiração do bacteróide e se esta capacidade mudava a resposta para salinidade. Foi então observado que as atividades da enzima no citosol foram reduzidas nos tratamentos com sal, enquanto que no citosol do bacteróide, as atividades da enzima aumentaram com a alta concentração de sal em todos os tratamentos.

Os dados apresentados confirmaram que o succinato e o malato são os substratos preferidos para a respiração dos bacteróides em feijão comum, mas estes bacteróides podem também utilizar glicose, em condições salinas (FERRI et al., 2000).

HAASE et al. (2007) analisando o efeito de concentrações de CO₂ na estimulação da fixação simbiótica e no metabolismo de carbono avaliaram a qualidade e a quantidade da exudação da raiz e a fonte do carbono para os nódulos de *Phaseolus vulgaris*, em concentrações atmosféricas ambientais (400 μmol mol⁻¹) e elevadas concentrações de CO₂ (800 μmol mol⁻¹). Concluíram que elevadas concentrações de CO₂ reduziam o N do tecido e aceleravam a expressão de sintomas da deficiência de N - limitante, mas não afetavam a produção de biomassa da planta.

Ainda nesse estudo, verificaram que o ¹⁴CO₂ não revelou nenhuma indicação para um aumento geral na exudação da raiz, com estimulação subsequente do crescimento da rizosfera microbiana, tendo por resultado o aumento da competição do N na rizosfera para CO₂ elevado. Sendo que nos nódulos, o elevado CO₂ aumentou a

acumulação do malato como uma fonte principal do carbono para o microssimbionte e do malonato com funções essenciais para o desenvolvimento do nódulo (HAASE et al., 2007).

Com o objetivo de verificar a influência do ozônio (O_3) sobre o metabolismo de carbono e nitrogênio, PAUSCH et al. (1996) cultivaram soja (*Glycine max* [L.] Merr.) em solo enriquecido com ^{15}N dentro de câmaras e expostas a três regimes de O_3 : metade do O_3 ambiental, O_3 ambiental, e 2 x O_3 ambiental. A fixação do nitrogênio foi estimada usando o método da diluição do isótopo ^{15}N e verificaram que o ozônio afetou significativamente a dinâmica de absorção e partição do N, em curto e em longo prazo. A exposição do ozônio também reduziu a quantidade do N-fixado, mas não afetou significativamente o N total ou % de N nos órgãos e nas plantas inteiras. Para o grão maduro, o rendimento de semente diminuiu significativamente em todos os parâmetros de N, exceto N - fixado.

Esses resultados sugerem que a atividade total do nódulo foi afetada e que a absorção total de N foi mantida apesar das diminuições significativas na % N - fixado. Portanto, a fixação de N foi inibida pela translocação dos fotossintatos reduzidos dos nódulos. No entanto, os fotossintatos translocados foram suficientes para manter taxas moderadas de absorção de N, mas não adequados para manter taxas elevadas da fixação de N, com maior custo de energia. Em síntese, o estudo do metabolismo do carbono sustentou a hipótese de que o mecanismo da ação O_3 envolve uma inibição da translocação do carbono das folhas a outros órgãos (PAUSCH et al., 1996).

PIMENTEL et al. (1995) cita que se o metabolismo do carbono é dependente de fatores abióticos, a FBN é, sem dúvida, influenciada por esses fatores. Considerando a falta de água esta pode causar inicialmente um aumento na FBN devido a maior disponibilidade de gases, porém com a desidratação mais severa, ocorre uma redução drástica da fotossíntese e conseqüentemente uma diminuição do fornecimento de fotossintatos. Ou seja, qualquer efeito sobre a produção de fotoassimilados da planta, vai reduzir a FBN, devido a menor disponibilidade de esqueletos de C e ATP (KRAMER & BOYER, 1995).

Conclusões

As pesquisas referentes ao metabolismo de carbono, nos nódulos, têm evoluído muito neste início de século, principalmente associadas ao uso da biologia molecular nas investigações que visam o aumento da eficiência da FBN.

Vários estudos indicam que o entendimento do processo do metabolismo de C na planta hospedeira, bem como, da atividade metabólica para a assimilação de N na bactéria em simbiose, poderão indicar manejos sustentáveis que contribuirão para uma maior economia no uso de fertilizantes nitrogenados.

Nesse contexto, destaca-se que para as leguminosas que necessitam de uma complementação de N mineral, o aumento da capacidade fotossintética da planta e conseqüentemente dos fotoassimilados contribui para o incremento na atividade da nitrogenase e conseqüentemente uma melhor eficiência na FBN.

Eficiência esta, que poderá ser alcançada por meio da seleção de cultivares e de estirpes de rizóbios mais eficazes, principalmente quando se considera que cultivares mais eficientes na produção e transporte de fotoassimilados poderão incrementar a FBN.

Referências Bibliográficas

ATKINS, C. A. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. (Ed.). **Biology and biochemistry of nitrogen fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 293-319.

BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L. Bacteroids from soybean root-nodules - respiration and N₂ fixation in flow-chamber reactions with oxyleghaemoglobin. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences**, London, v. 238, n. 1293, p. 295–320, jan. 1990.

BOLAND, M. J.; FORDYCE, A. M.; GREENWOOD, R. M. Enzymes of nitrogen-metabolism in legume nodules: a comparative study. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 5, n. 5, p. 553-559, 1978.

COPELAND, L.; LEE, H. S.; COWLISHAW, N. Carbon metabolism in chickpea nodules. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4-5, p. 381-385, 1995.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Review Microbiology**, London, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

FERRI, A.; LLUCH, C.; OCAÑA, A. Effect of salt stress on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, n. 4, p. 396-402, 2000.

GARG, N.; SINGLA, R.; GEETANJALI. Nitrogen fixation and carbon metabolism in legume nodules. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delho, v. 42, n, 2, p. 138-142, 2004.

GONZÁLEZ, E. M.; APARICIO-TEJO, P. M.; GORDON A. J.; MINCHIN, F. R.; ROYUELA, M.; ARRESE-IGOR C. Water-deficit effects on **carbon** and nitrogen metabolism of pea nodules. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 327, p. 1705-1714, 1998.

GONZÁLEZ, E. M.; GORDON, A. J.; JAMES, C. L.; ARRESE-IGOR, C. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. **Journal of Experimental Botany** , Oxford, v. 46, n. 291, p. 1515-1523, 1995.

GORDON, A. J. Enzyme distribution between the cortex and the infected region of soybean nodules. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 241, p. 961-967, 1991.

HAASE, S.; NEUMANN, G.; KANIA, A.; KUZYAKOV, Y.; RÖMHELD, V.; KANDELER, E. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 9, p. 2208-2221, sep. 2007.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia Agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 249-279. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ANDRADE, D. de S.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M. de O.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas de grãos. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA, 1999. p. 597-620.

KAVROULAKIS, N.; FLEMETAKIS, E.; AIVALAKIS, G.; KATINAKIS, P. Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 1, p. 14-22, jan. 2000.

KNEIP, C.; LOCKHART, P.; VOSS, C.; MAIER, U. G. Nitrogen fixation in eukaryotes – new models for symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, Article Number n. 55, ap. 2007.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995.

KÜSTER, H.; FRÜHLING, M.; PERLICK, A. M.; PÜHLER, A. The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissue of *Vicia faba*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 6, n. 4, p. 507-514, jul./aug. 1993.

LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids, **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 1, p. 37–78, 2003.

MAYZ-FIGUEROA, J. Fijación biológica de nitrógeno. **Revista Científica UDO Agrícola**, Maturín, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2004.

MOREIRA, F. M de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NAYA, L.; LADRERA, R.; RAMOS, J.; GONZÁLEZ, E. M.; ARRESE-IGOR, C.; MINCHIN, F. R.; BECANA, M. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 2, p. 1104-1114, jun. 2007.

NEVES, M. C. P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico rhizobium-leguminosas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Campinas, v. 5, p. 79-92, 1981.

PATE, J. S. Photoassimilate partitioning and consumption in nitrogen-fixing crop legumes. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 467-478.

PAUSCH, R. C.; MULCHI, C. L.; LEE, E. H.; MEISINGER, J. J. Use of ^{13}C and ^{15}N isotopes to investigate C_{13} and N_{15} isotopes to investigate O_3 effects on C and N metabolism in soybeans. 2. Nitrogen uptake, fixation, and partitioning. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 61-69, nov. 1996.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: EDUR, 1998. 150 p.

PIMENTEL, C.; LOUGUET, P.; LAFFRAY, D. Trocas gasosas diurna e em 4 estádios de desenvolvimento, em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Resumos...** São Carlos: SBFV; Lavras: UFLA, 1995. p. 364.

POOLE, P.; ALLAWAY, D. Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobium. **Advances in Microbial Physiology**, v. 43, p. 117-163, 2000.

PRELL, J.; POOLE, P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 161-168, apr. 2006.

RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F. R.; SUMMERFIELD, R. J.; COOKSON, C.; COOMBS, J. Carbon and nitrogen-metabolism in legume root-nodules. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 341-355, 1980.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. de M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (ED.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p. 153-174.

RICHTER, G. **Metabolisme des végétaux: physiologie et biochimie**. Lausanne: Polytechniques Romandes, 1993. 526 p.

SCHUBERT, M. **Carbon partitioning in nitrogen-fixing root nodules**. 2002. 149 f. Tese (Doutorado) - Universität zu Göttingen, Göttingen.

SCHULZE, J. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 167, n. 2, p. 125-137, apr. 2004.

SILVENTE, S.; BLANCO, L.; CAMAS, A.; ORTEGA, J. L.; RAMIREZ, M.; LARA-FLORES, M. *Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 7, p. 728-733, jul. 2002.

STREETER, J. G. Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. **Symbiosis**, Rohovot, v. 19, n. 2- 3, p. 175-196, 2003.

THUMMLER, F.; VERMA, D. P. S. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. **Journal of Biology Chemistry**, v. 262, n. 30, p. 14730-14736, oct. 1987.

UDVARDI, M. K.; YANG, L. J. O.; YOUNG, S.; DAY, D. A. Sugar and amino-acid-transport across symbiotic membranes from soybean nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 3, n. 5, p. 334-340, sep./oct. 1990.

VANCE, C. P. Root nodule N and C metabolism: nutrient cycling required for development and function. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION, 19th, 2004, Bozeman. **Abstract...** Bozeman: USDA/ARS, 2004. p. 39.

VANCE, C. P.; GANTT, J. S. Control of nitrogen and carbon metabolism in root-nodules. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 266-274, jun. 1992.

VANCE, C. P.; HEICHEL, G. H. Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 373-392, 1991.

VANCE, C. P.; MILLER, S. S., LIU, J.; GANTT, J. S.; SAMAC, D. A. Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules. In: MODEL LEGUME CONGRESS, 2005, California. **Abstract...** California: USDA/ARS, 2005. p. 43.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.) . **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 295-360.

WANG, Y. -P.; BIRKENHEAD, K.; BOESTEN, B.; MANIAN, S; O'GARA, F. Genetic analysis and regulation of the *Rhizobium meliloti* genes controlling C₄-dicarboxylic acid transport. **Gene**, v. 85, n. 1, p. 135-144, dec. 1989.

Embrapa

Agrobiologia

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

