

**REDUÇÃO DO NITRATO, ASSIMILAÇÃO DO  
AMÔNIO E TRANSPORTE DO NITROGÊNIO  
EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA**

**EDNA MARIA ALVES**


**2001**

53043

375804FN

**EDNA MARIA ALVES**

**REDUÇÃO DO NITRATO, ASSIMILAÇÃO DO AMÔNIO E  
TRANSPORTE DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE  
SERINGUEIRA**



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre"

Orientador  
Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRAS  
2001

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Alves, Edna Maria

Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em  
plantas jovens de seringueira / Edna Maria Alves Dias. --Lavras : UFLA, 2001.  
57 p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Seringueira. 2. Absorção. 3. Redução de nitrato. 4. Transporte de nitrogênio.  
5. Amônia. I: Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.95  
-633.8952

**EDNA MARIA ALVES**

**REDUÇÃO DO NITRATO, ASSIMILAÇÃO DO AMÔNIO E  
TRANSPORTE DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE  
SERINGUEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Agronomia, área de  
concentração Fisiologia Vegetal, para  
obtenção do título de “Mestre”

**APROVADA** em 24 de agosto de 2001

Prof. Dr. Paulo Roberto Mosquim

UFV

Prof. Dr. Nelson Delú Filho

UFLA



Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

## **DEDICATORIA**

Aos meus pais, Erlon e Ivone, que me ensinaram ser a determinação o passo inicial para a vitória frente às dificuldades da vida,  
ao meu esposo Rosivaldo, pela compreensão  
e aos meus irmãos, Erlon, Antonio, Roberto, Erlane,  
Elton, Márcia e Cristiano, pelo amor e  
companheirismo durante minha  
caminhada

## **OFEREÇO**

Às minhas filhas, Milla e Dani, pelo ensino diário sobre o amor e as inúmeras demonstrações de compreensão e muito carinho

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, “Eu te amo, ó SENHOR, força minha. O SENHOR é a minha rocha, a minha cidadela, o meu libertador; o meu Deus, o meu rochedo em que me refugio; o meu escudo, a força da minha salvação, o meu baluarte. Invoco o SENHOR, digno de ser louvado, e serei salvo dos meus inimigos. Laços da morte me cercaram, torrentes de impiedade me impuseram terror. Cadeias infernais me cingiram, e tramas de morte me surpreenderam. Na minha angústia, invoquei o SENHOR, gritei por socorro ao meu Deus. Ele do seu templo ouviu a minha voz, e o meu clamor lhe penetrou os ouvidos. Então a terra se abalou e tremeu, vacilaram também os fundamentos dos montes e se estremeceram, porque ele se indignou...Trovejou, então o SENHOR, nos céus; o Altíssimo levantou sua voz e houve granizo e brasas de fogo... Do alto me estendeu ele a mão e me tomou; tirou-me das muitas águas ... Trouxe-me para um lugar espaçoso; livrou-me ... pois tenho guardado os caminhos do SENHOR ... O caminho de Deus é perfeito; a palavra do Senhor é provada; ele é escudo para todos os que nele se refugiam...O Deus que me revestiu de força e aperfeiçoou o meu caminho, ele deu a meus pés a ligeireza das corças e me firmou nas alturas. Ele adestrou as minhas mãos para o combate, de sorte que os meus braços vergaram um arco de bronze. Também me deste o escudo da tua salvação, a tua direita me susteve... alargaste sob meus passos o caminho, e os meus pés não vacilaram...Vive o SENHOR, e bendita seja a minha rocha! Exaltado seja o Deus da minha salvação... Glorificar-te-ei, pois, entre gentios, ó Senhor, e cantarei louvores ao teu nome.”(Salmo 18)

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade para realização do curso.  
Ao professor Luiz Edson Mota de Oliveira, pela orientação, apoio nos momentos decisivos e especialmente por mostrar-me o que estava além do que eu julgava ver.

Ao professor Nelson Delú Filho, pelo apoio e valiosas sugestões.

Aos professores do Departamento de Biologia, em especial aos do Curso de Fisiologia Vegetal, pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos professores Ladaslav Sodek e Paulo Mazzafera, da UNICAMP, pela cooperação e por ceder instalações e equipamentos daquela instituição e a Juliana Lima, pela ajuda valiosa.

Aos professores Abel Rebouças São José e Nair Tyoko Hojo Rebouças, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelo estímulo.

Aos amigos Breno e Jorge, pela cooperação a cada dia e amizade que viabilizou minha permanência e conclusão do curso.

À minha irmã Erlane, pelo amor e ajuda decisiva no “momento crítico”.

À Rúbia, pela amizade e também pela “participação especial” no “momento crítico”.

Aos amigos e companheiros de mestrado, Lucinéia e Moisés, Sílvia e Luciano, Fabiano e Juliana, Erivaldo, Cláudio, Sandra, Gabriela, Cíntia, Soami, Rubert, Nair, Alessandro, pela alegria da convivência.

Ao Evaristo Gomes Guerra Neto e aos funcionários Dartagnan, Izonel, Odorêncio, Joel e Lena, pela valiosa cooperação.

Aos estagiários, bolsistas, pelo acompanhamento e ajuda durante os trabalhos.

Finalmente, a todos aqueles com os quais convivi durante minha permanência na cidade de Lavras, pois cada um proporcionou-me uma alegria especial neste lugar. Faço representante destes o casal Ramon e Andréa, Nilce, o Pastor Eliel e as “companheiras”.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 Absorção e assimilação de nitrato.....	05
2.1.1 Redutase do nitrato.....	07
2.1.2 Regulação da redutase do nitrato.....	08
2.2 Enzimas de assimilação do amônio.....	11
2.3 Compostos nitrogenados transportados através do xilema.....	14
2.3.1 Influência das variações ambientais.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção e cultivo das plantas.....	19
3.2 Determinação do pH e N total da areia utilizada.....	21
3.3 Atividade da enzima redutase do nitrato.....	23
3.4 Enzimas de assimilação do amônio.....	23
3.4.1 Obtenção dos extratos enzimáticos.....	23
3.4.2 Ensaio da sintetase da glutamina (GS).....	24
3.4.3 Ensaio da sintase do glutamato dependente do NADH (NADH-GOGAT).....	25
3.5 Determinação de proteínas solúveis.....	25
3.6 Coleta do exsudato do xilema.....	25
3.7 Quantificação do nitrato em seiva do xilema.....	26
3.8 Quantificação de aminoácidos na seiva do xilema.....	27
3.9 Análise dos dados.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Atividade da redutase do nitrato (ARN).....	29
4.2 Proteínas em raízes e folhas.....	31
4.3 Atividade das enzimas sintetase da glutamina.....	34
4.4 Atividade da enzima sintase do glutamato.....	38
4.5 Nitrato transportado na seiva do xilema.....	40
4.6 Aminoácidos transportados através do xilema.....	42
5 CONCLUSÕES.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50



## RESUMO

ALVES, Edna Maria. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira.** Lavras:UFLA, 2001, 57p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)\*

No presente trabalho buscou-se identificar as alterações ocorridas na absorção, assimilação e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva contendo as formas de nitrato e/ou amônio. Foram avaliadas as atividades das enzimas redutase de nitrato, sintetase da glutamina e sintase do glutamato e composição da seiva do xilema. Os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento, em vasos plásticos contendo 3 litros de areia lavada, nos quais foram adicionadas soluções com concentração de 8 mM de nitrato e/ou amônio na proporção de 0/0, 8/0, 4/4 e 0/8. Verificou-se o efeito positivo do nitrato sobre a enzima redutase do nitrato. A presença do nitrogênio promoveu alterações na atividade das enzimas sintetase da glutamina e sintase do glutamato-NADH. Verificou-se também que plantas de seringueira transportam íons de nitrato através do xilema. Glutamina e asparagina foram os aminoácidos predominantes no xilema, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultivo.

---

\*Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA (Orientador); Nelson Delú Filho - UFLA

## INTRODUÇÃO

A expansão do cultivo de seringueira (*Hevea brasiliensis*) em regiões que apresentam condições edafoclimáticas desfavoráveis ao ataque do fungo causador da doença conhecida por mal das folhas (*Microcyclus ulei*, P. Hern v. Arx), demonstrou que a heveicultura, considerada restrita às áreas úmidas da Amazônia, poderia se estender para regiões com regime hídrico caracterizado por um período seco definido e elevado déficit hídrico (Cunha et al., 2000).

Tal expansão criou a necessidade de informações específicas quanto ao comportamento da cultura nessas regiões, desde aspectos relacionados com a germinação de sementes até a produção do látex.

A maioria das pesquisas está direcionada para a seleção de clones resistentes a doenças e mais produtivos. Poucos são os estudos disponíveis quanto às alterações produzidas no metabolismo da planta em resposta a variações ambientais e como tais alterações podem estar relacionadas com a produção do látex.

Considerando a importância do elemento nitrogênio para o crescimento de plantas e produção de biomassa, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer os mecanismos de absorção, assimilação e transporte.

As principais fontes de nitrogênio para as plantas são o  $N_2$  atmosférico ou nitrato do solo, liberado por meio da adição de fertilizantes ou degradação da matéria orgânica, os quais entram no metabolismo da planta pela fixação simbiótica do nitrogênio e redução do nitrato, respectivamente. O  $NH_4^+$  resultante é utilizado na biossíntese de aminoácidos, proteínas e metabólitos nitrogenados de baixo peso molecular.

A absorção e o transporte variam pelo fato de o nitrogênio disponível encontrar-se na forma de nitrato ou amônio (Shelp, 1987; Flaig e Morh, 1992;

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O nitrogênio representa um importante papel na agricultura por ser o nutriente que freqüentemente mais limita o crescimento das plantas (Kozłowski e Pallardy, 1996; Lea, 1997).

Em geral, a maioria das espécies absorve nitrogênio sob a forma de nitrato e amônio, resultantes de processos de mineralização do N orgânico no solo. O  $\text{NH}_4^+$  disponível no solo, ou aquele resultante do processo de redução, é utilizado na biossíntese de aminoácidos que propiciam a manutenção do crescimento.

Em plantas lenhosas, compostos nitrogenados representam um pequeno percentual em relação ao peso seco. Entretanto, ainda assim, são importantes sob o ponto de vista fisiológico, na composição de proteínas estruturais, enzimas, aminoácidos, além de moléculas do metabolismo secundário, tais como alcalóides (Kozłowski e Pallardy, 1996).

As espécies leguminosas representam um grupo especial de plantas que utilizam o nitrogênio reduzido por microorganismos que se encontram em simbiose com o sistema radicular (Puiatti e Sodek, 1999).

A distribuição dos compostos biossintetizados, a exemplo dos compostos nitrogenados, entre o sistema radicular e parte aérea de uma planta, é determinante para o seu crescimento e desenvolvimento, sendo dependente da capacidade das células, tecidos e órgãos de produzir, exportar ou importar e metabolizar o carbono e nitrogênio reduzidos (Druart et al., 2000).

Steingrobe e Schenk (1993), citados por Baptista, Fernandes e Souza (2000), observaram correlação positiva entre o incremento do influxo máximo de N ( $V_{\text{max}}$ ) e o aumento do peso de matéria seca das raízes, em plantas de alface, em função do estágio de desenvolvimento.

Costa Netto (1997), avaliando o efeito da presença de nitrogênio exógeno sobre a remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de seringueira, verificou que o fornecimento de nitrogênio não favoreceu o acúmulo e distribuição de matéria seca nos estádios de emissão de radícula, pata de aranha e palito. No estágio de segundo lançamento foliar o autor encontrou que o fornecimento de amônio diminuiu a matéria seca total e aumentou os valores de nitrogênio total nos tecidos.

Utilizando plantas jovens de seringueira, Delú Filho (1994) verificou uma maior produção de matéria seca da parte aérea e raízes em resposta a maiores concentrações de nitrato, fornecido na solução nutritiva. Por outro lado, quando foram utilizadas combinações de 4/4 mM de nitrato e amônio, Lemos (1996) verificou que o acúmulo e distribuição de fitomassa foram favorecidos quando comparados com plantas que receberam apenas nitrato.

Baptista, Fernandes e Souza (2000), testando os cultivares de arroz agulha e bico ganga, observaram que a cultivar agulha apresentou maior capacidade de absorção de amônio sob condições de alta concentração de N na solução nutritiva. A cultivar bico ganga apresentou aumento de matéria seca em raízes e redução relativa do peso da parte aérea. Tal fato foi interpretado como uma adaptação da planta a ambientes com escassez de nitrogênio, obrigando-a a manter tecidos radiculares viáveis na tentativa de viabilizar o influxo de água, nitrogênio e outros nutrientes necessários ao crescimento.

## **2.1 Absorção e assimilação do nitrato**

Após absorção, o nitrato pode ser imediatamente reduzido e assimilado com a produção de aminoácidos e ser armazenado nos vacúolos das células da

raiz ou transportado para folhas, onde poderá ser reduzido ou ser armazenado nos vacúolos das células foliares (Atkins, 1990).

A redução do nitrato nas raízes e folhas é variável e depende da concentração de nitrato externo, idade, desenvolvimento e espécies de plantas. Em geral, à medida que a concentração externa de nitrato aumenta, a proporção que esse composto é transportado para folhas também aumenta. Altas taxas de redução de nitrato na raiz exigem fornecimento de esqueletos de carbono para assimilação do amônio. Logo, a taxa de respiração nestes tecidos deve ser elevada (Lea, 1997).

Em plantas lenhosas e espécies de origem de clima temperado, a redução do nitrato ocorre, principalmente, nas raízes quando comparadas com espécies herbáceas (Seith et al., 1994). O particionamento da assimilação de nitrato entre raízes e parte aérea é também dependente da disponibilidade de nitrogênio exógeno. Contudo, em muitas plantas superiores, o nitrato é reduzido em maior proporção nas folhas do que em raízes, em função da disponibilidade de poder redutor, de energia e de esqueletos de carbono produzidos pela fotossíntese (Oaks, 1994; Druart et al., 2000; Harris et al., 2000).

A absorção do nitrato pelas raízes é um processo amplamente estudado, porém as informações disponíveis sobre as propriedades envolvidas no processo de transporte não são conclusivas (Lea, 1997).

Mead e Preston (1994) estudaram a distribuição e retranslocação de N em pinheiro durante um período de aproximadamente 8 anos, utilizando N marcado sob a forma de  $^{15}\text{N}$ - uréia,  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ . Verificaram que a disponibilidade e absorção de  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  foi menor que a forma  $^{15}\text{N}$ -uréia ou do  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Em contraste ao N de outras fontes, o nitrogênio marcado na forma de  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  foi inicialmente translocado para folhas e, então, retranslocado para as regiões próximas. Nitrato é reconhecido por ser ocasionalmente

absorvido e transportado para folhas antes da redução, enquanto  $\text{NH}_4^+$  é primeiro incorporado em aminoácidos nas raízes e então estocado ou transportado.

Após sua absorção, o nitrato é reduzido a amônio, o qual é assimilado durante a biossíntese de aminoácidos. Essa redução ocorre em dois estágios, com o nitrito sendo o produto intermediário. As enzimas que catalisam as reações são a redutase de nitrato (RN) e redutase de nitrito (RNi), sendo induzidas pelo nitrato e nitrito, respectivamente (Aslam e Huffaker, 1984; Oaks, 1994). A enzima redutase de nitrito catalisa a reação que resulta na produção de amônio e está presente nas folhas e raízes, utilizando como poder redutor a ferredoxina reduzida, diretamente das reações fotoquímicas da folha, ou o NADPH gerado na rota das pentoses monofosfatadas.

As enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT) atuam como catalisadoras no ciclo do glutamato, no qual o glutamato é tanto substrato como produto final. Glutamina e glutamato são considerados produtos primários da assimilação do amônio (Pate et al., 1980).

### **2.1.1 Redutase do nitrato**

A atividade da redutase de nitrato, assim como a de outras enzimas envolvidas na assimilação do nitrato, pode sofrer alterações durante o desenvolvimento da planta ou órgão. A localização intracelular de RN tem sido aceita como enzima presente no citoplasma (Askerlund et al., 1991)

A estrutura bioquímica da RN é atualmente bem conhecida. Em plantas superiores, a RN dependente de NADH compreende duas subunidades idênticas com 110 – 115 kDa. Os cofatores de redox FAD, citocromo b5 e cofator Mo (CoMo), estão ligados a cada monômero na razão de 1:1:1. Os elétrons são passados do NADH para o nitrato (Lea, 1997).

Em cevada, Aslam et al. (1992) identificaram três sistemas diferentes na absorção de nitrato pela raiz. Em altas concentrações externas de nitrato, um sistema de baixa afinidade operou com  $K_m$  de 7  $\mu\text{M}$  para nitrato e mostrou ser constitutivo e não regulável. Em baixa concentração externa, um sistema de alta afinidade atuou com um  $K_m$  entre 15-34  $\mu\text{M}$ , mostrando ser induzido pelo nitrato.

O ritmo circadiano da atividade da RN foi verificado em diversos estudos (Hageman e Flesher, 1961; Queiroz et al., 1993; Delú Filho et al., 1997). Oscilações nos níveis de mRNA da RN, com valores máximos no final do período escuro, foram observadas por Galangau (1988).

### **2.1.2 Regulação da redutase do nitrato**

A atividade da RN é induzida pela presença de nitrato e luz (Hageman e Flesher, 1960), demonstrada pela síntese *de novo* e atualmente confirmada por meio da biologia molecular (Crawford, 1995). O suprimento do nitrato induz aumento do mRNA da RN em várias espécies de plantas. Em raízes, a resposta é rápida enquanto nas folhas a resposta ocorre após um curto período de tempo (Melzer et al., 1989).

Vários estímulos ambientais e do próprio desenvolvimento da planta regulam a assimilação de nitrato. Erskine et al. (1996), avaliando a utilização do nitrato por espécies arbóreas e arbustivas sob condições contrastantes de disponibilidade de água, verificaram que a enzima redutase de nitrato é influenciada por variações ambientais. A redução de sua atividade é característica de plantas estressadas e tem sido vista como uma adaptação bioquímica, limitando o acúmulo do nitrito e amônio e, em termos gerais, diminuindo o requerimento de carbono e energia em plantas sob severas

condições de estresse. Simultaneamente ocorre o acúmulo de íons de nitrato, os quais podem contribuir para ajustamento osmótico.

Em plantas de chicória expostas à luz, a atividade da redutase de nitrato (ARN) aumentou cerca de dez vezes durante as três primeiras horas. Isto confirma observações anteriores, as quais sugeriam que ARN apresenta alterações significativas poucas horas após as plantas serem levadas à condição de luz (Galangau et al., 1988; Druart et al., 2000).

Depois da luz, outros fatores também influenciam a expressão da RN. A maioria das plantas superiores expressa atividade da RN em tecidos fotossintéticos. Entretanto, algumas espécies, não leguminosas, variam grandemente em seu particionamento de assimilação de nitrato, entre raízes e parte aérea, conforme a idade das plantas (Andrews, 1986).

Hanisch Ten Cate e Breteler (1981) avaliaram o papel dos açúcares na utilização de nitrato. Vincentz et al. (1993) propuseram que a adição de frutose, glicose e sacarose em folhas de fumo, adaptadas ao escuro, é capaz de induzir a expressão da RN. Verificaram que a glutamina e o glutamato regularam negativamente a atividade da enzima em baixa luminosidade.

Em chicória, cultivadas em sala de crescimento, a atividade da RN foi maior nas raízes da fase inicial de crescimento até aos 42 dias, confirmando que, nesse período, as raízes são responsáveis pela maior assimilação de nitrato e representa uma fonte de compostos nitrogenados. Contudo, após tal período, passou progressivamente a atuar como um dreno. Neste estágio do crescimento vegetativo, a arginina, a qual é conhecida por acumular-se em raízes maduras, esteve presente em pequenas quantidades. Em folhas, foi detectada maior quantidade de serina do que em raiz, talvez devido a fotorrespiração (Druart et al., 2000).

Em plantas jovens de seringueira, Delú Filho (1994) observou que a atividade da RN foi afetada positivamente pela presença do nitrato até a



concentração de 12 mM e ainda que a enzima é ativa apenas no sistema radicular, apresentando um ritmo circadiano. De modo semelhante, Lemos (1996), utilizando diferentes combinações de nitrato e amônio, como fonte de nitrogênio em plantas jovens de seringueira, verificou que a atividade da RN aumentou no tratamento em que foi utilizado apenas o nitrato e decresceu, abruptamente, no tratamento com 6 mM/ 2mM de nitrato e amônio.

A atividade da RN pode ser modulada *in vivo*, como demonstrado por Kaiser et al. (1991). A atividade da enzima declinou sob condições de baixa taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, consequência da falta de C para biossíntese. De modo semelhante, uma rápida queda na atividade da enzima foi determinada pela transferência de plantas da luz para o escuro. Esses autores conseguiram também demonstrar que a enzima pode ser inativada *in vitro* na presença de ATP e Mg<sup>2+</sup> e, em seguida, reativada na presença de AMP e Mg<sup>2+</sup>. Isto tem sugerido que a atividade da RN em folhas pode ser regulada *in vivo* de modo similar a fosfato sacarose sintase. A remoção de grupos fosfato pela fosfatase promoveria a reativação da RN (Huber et al., 1992).

Kaiser e Huber (1994) e Kaiser et al. (1999) conseguiram demonstrar que reações reversíveis de fosforilação e desfosforilação atuam no controle da ARN. Tem sido sugerido ainda que uma proteína identificada como 14-3-3 é capaz de se ligar diretamente a cátions divalentes, os quais podem explicar que a manutenção da forma inativa da RN fosforilada requer o cátion a pH 7,5. Esta ligação é possível a alterações na conformação da proteína produzida pelo cátion (Athwal et al., 2000).

Nesse sentido, alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar as propriedades de regulação da redutase de nitrato. Kandlbinder et al. (2000) verificaram mecanismos diferentes de regulação da RN comparando mamona e espinafre. A RN de folhas de espinafre é rapidamente inativada pela fosforilação da serina e, na seqüência, ocorre uma ligação da proteína 14-3-3 na

presença de cátions divalentes (Kaiser et al., 1999). Entretanto, a atividade da RN na presença de  $Mg^{2+}$  usualmente reflete atividade de defosforilação de RN. Na presença de tampão contendo excesso de EDTA, todas as formas de NR são ativas e a medida de sua atividade reflete o total de NR (NR max). O estado de ativação é a razão entre a NRA x 100/ NR max. Esses autores sugerem que a RN de mamona tem propriedades regulatórias diferentes do espinafre ou de outras plantas, uma vez que esta não é ativada pela preincubação com EDTA mais AMP, nem inativada com ATP. Adicionalmente, a RN de mamona foi ainda assim inativa em preparações purificadas e livres de proteínas 14-3-3. Dessa forma, mesmo apresentando um sítio de ligação da proteína 14-3-3 igualmente com espinafre, a inibição da RN de mamona pelo  $Mg^{+2}$  não requer proteínas 14-3-3.

As interações moleculares entre a RN, cátions divalentes e a proteína 14-3-3, foram verificadas, em tempo real, por meio de registros com ressonância magnética por Athwal et al. (2000). Eles consideraram ainda a possibilidade de que variações no pH podem ser importantes em diferentes condições ambientais, as quais podem alterar o pH citosólico, se os cátions divalentes não estão em condições de saturação.

## **2.2 Enzimas de assimilação do amônio**

A produção do amônio em plantas ocorre via fixação de nitrogênio e redução de nitrato. Uma pequena quantidade pode também ser absorvida do solo, sob condição ácida, particularmente por árvores. Estes processos são denominados de assimilação primária (Stewart et al., 1993; Kozlowski e Pallardy, 1996).

No ciclo de assimilação do amônio operam as enzimas sintetase da glutamina e sintase do glutamato (GS-GOGAT). A sintetase da glutamina

catalisa a conversão de glutamato em glutamina em uma reação dependente de ATP e um cátion divalente como cofator. A enzima é uma proteína octamérica com peso molecular de 350 a 400 kDa e tem alta afinidade por amônio ( $K_m$  3-5  $\mu$ M).

Inicialmente, foi sugerido que havia duas isoformas da enzima GS em plantas, uma localizada no citoplasma e outra no cloroplasto ou plastídeo (McNally e Hirel, 1983). Contudo, estudos recentes têm demonstrado que outras formas de GS podem ser encontradas. Em feijão (*Phaseolus vulgaris*), pelo menos quatro isoformas da GS foram identificadas, inclusive em radículas de plântulas em germinação e isoformas específicas para plantas noduladas (Bennett e Cullimore, 1989; Cock et al., 1991). Seith et al. (1994) encontraram a GS citoplasmática predominando em raízes de pinheiro.

A enzima sintase de glutamato catalisa a conversão de glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato. As duas diferentes formas de enzima estão presentes em plantas superiores, sendo que uma utiliza NADH como fonte de poder redutor e outra, a ferredoxina (Seith et al., 1994). A enzima dependente de ferredoxina é uma proteína monomérica com peso molecular de 140-160 kDa. Ela está localizada em cloroplastos de folhas e sua atividade aumenta durante o desenvolvimento da folha, sob condições de luz, resposta esta que pode ser dependente do fitocromo. A atividade da enzima dependente de NADH tem sido detectada em tecidos não verdes, a exemplo de raízes e cotilédones. É um monômero de peso molecular entre 200-225 kDa (Lea, 1997).

A liberação de amônio pode ocorrer também por meio da descarboxilação da glicina e formação de serina na fotorrespiração; do catabolismo de compostos de transporte a exemplo da asparagina, arginina e ureídeos; pela conversão de cistationina em homocisteína na biossíntese de metionina e treonina em 2-oxoglutarato na biossíntese de isoleucina e na

conversão da fenilalanina em cinamato, durante a síntese de lignina, catalisada pela enzima fenilalanina amônio liase, com produção de amônio (Wink,1997).

As proteínas são freqüentemente hidrolisadas durante a germinação de sementes ou durante a senescência foliar, liberando  $\text{NH}_4^+$  para novas biossínteses. O amônio pode ainda ser liberado pela atuação da desidrogenase do glutamato (GDH), que pode atuar também na oxidação do glutamato, quando o nível de 2-oxoglutarato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos é baixo devido à falta de carboidratos (Robinson et al., 1991).

A regulação da atividade da GS, de modo semelhante à RN, pode ser induzida por diferentes estímulos externos ou fisiológicos, dependendo do órgão da planta ou da isoforma da GS (Pujade-Renaud et al., 1994). A luz, por exemplo, produz um aumento no nível de mRNA da GS2 em folhas de ervilha, fumo e tomate (Becker et al., 1992).

Em soja, Miao et al. (1991) sugeriram que o aumento de expressão da GS em nódulos é causado pelo amônio gerado pela fixação do nitrogênio.

Em ervilha, tal regulação da expressão gênica não tem sido confirmada. Contudo, as isoformas GS1, GS3A e GS3B são apresentadas como as formas citosólicas e predominantes nas raízes, em nódulos e cotilédones.

Keys et al. (1978) calcularam que a taxa de produção de amônio durante a fotorrespiração é dez vezes maior que a de assimilação do nitrato. Contudo, o papel do amônio liberado pela fotorrespiração na regulação da atividade da GS não foi totalmente esclarecido.

Edwards et al. (1990) identificaram a expressão do promotor GS3A apenas em células do floema, indicando que ela tem um papel importante na síntese de glutamina requerida no transporte de nitrogênio e é particularmente importante em plântulas e nódulos fixadores de  $\text{N}_2$ .

A seringueira é uma espécie que apresenta grande capacidade de assimilação de amônio via GS/ GOGAT e GDH, em lâminas foliares, conforme

resultados obtidos por Delú Filho et al. (1998). Lemos (1999) verificou que a GS, em raízes de plantas jovens de seringueira, apresenta uma resposta positiva ao fornecimento de nitrogênio, sob a forma de nitrato, na solução de cultivo. Esse resultado sugere ainda, que, nas raízes, a GS é altamente dependente do amônio produzido via assimilação da RN. Quando foi fornecida uma combinação de 6mM/2mM de nitrato e amônio, a atividade da GS decresceu, aumentando progressivamente com a adição de amônio ao meio. Considerando a elevada atividade da GS encontrada nessas plantas, o autor discute a possibilidade de outras fontes de amônio estarem disponíveis nas folhas, em especial o  $\text{NH}_4^+$ , liberado através da fotorrespiração, como já discutido por Lea (1997).

Costa Netto (1997), avaliando o efeito da presença do nitrogênio exógeno sobre a atividade das enzimas de assimilação do amônio e remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plantas de seringueira, verificou que o fornecimento de nitrogênio não favoreceu o acúmulo e distribuição de matéria seca nos estádios de emissão de radícula, pata de aranha e palito. No estágio de segundo lançamento foliar, aquele autor encontrou que o fornecimento de amônio diminuiu a matéria seca e aumentou os valores de nitrogênio total, sendo que a GS nas raízes não apresentou resposta ao fornecimento desse elemento.

### **2.3 Compostos nitrogenados transportados através do xilema**

Após a redução do  $\text{NO}_3^-$  e assimilação do  $\text{NH}_4^+$  nas raízes, os compostos nitrogenados são transportados, via xilema, para parte aérea. Dependendo das condições ambientais e concentração externa de nitrato e amônio, os compostos transportados são essencialmente aminoácidos.

Em condições de alta concentração de  $\text{NO}_3^-$  este pode ser transportado para redução nas folhas em um grande número de espécies vegetais. O nitrato

não é encontrado livre no floema. Entretanto, a presença dessa molécula na seiva de xilema pode indicar a absorção e transporte a partir do sistema radicular e é característico de plantas que assimilam nitrato em suas folhas (Schmidt e Stewart, 1998).

Em geral, plantas formadoras de nódulos de fixação com microorganismos transportam ureídeos (McClure e Israel, 1979; Pate et al., 1980; Atkins et al., 1983; Vitória e Sodek, 1999).

Não há relatos na literatura sobre fixação simbiótica em plantas de seringueira. No entanto, Delú Filho (1994) encontrou três espécies de bactérias diazotróficas (*Azospirillum braziliensis*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*) no sistema radicular de plantas cultivadas em areia, embora não tenha sido possível determinar a real contribuição dessas bactérias para a manutenção do sistema.

Os compostos nitrogenados presentes no xilema podem indicar também as fontes externas utilizadas de nitrogênio (Stewart et al., 1993; Erskine et al., 1996; Schimdt e Stewart; 1998) e a reciclagem interna desse elemento. Com exceção de plantas fixadoras de  $N_2$ , pouco é conhecido sobre a capacidade de árvores tropicais armazenarem proteínas e de que forma o nitrogênio reciclado é transportado. Nessas espécies não há conhecimento dos mecanismos que possam determinar relações de sazonalidade de nitrogênio. Provavelmente, outros sinais além da luz e temperatura, podem ser responsáveis pela indução do armazenamento e mobilização de N nessas regiões.

Asparagina e glutamina (Pate et al., 1980; Puiatti e Sodek, 1999) parecem ser os compostos nitrogenados comumente transportados e são predominantes no xilema de raízes que reduzem o  $NO_3^-$  e plantas que assimilam  $NH_4^+$  do solo.

A arginina é o maior constituinte de seiva de xilema em várias espécies de clima temperado durante o outono e inverno, sendo considerada eficiente no

transporte e reserva de compostos nitrogenados em espécies lenhosas (Prima-Dutra e Botton, 1998).

Schmidt e Stewart (1998) levantaram uma questão relevante no processo de assimilação de nitrogênio: por que outras formas de compostos nitrogenados, além da asparagina e glutamina, são transportadas, se após o transporte são catabolizadas com liberação de  $\text{NH}_3$ , a qual é subsequente reassimilada em glutamina? Eles sugerem que a baixa relação C:N da arginina e ureídeos fazem com que essas moléculas sejam mais efetivas no transporte de nitrogênio. Além disso, a arginina é mais solúvel do que asparagina e glutamina.

A asparagina é um composto de reserva e transporte encontrado em muitas espécies de plantas (Lea et al., 1978). O grupo amida da glutamina pode ser transferido diretamente ao aspartato através da enzima sintetase de asparagina, reação esta dependente de ATP.

Asparagina e glutamina também representaram a maior fração de aminoácidos transportados na seiva de xilema de cafeeiro (90%) e 37,5 % do total de N. A asparagina, isoladamente, foi quatro vezes maior que a glutamina, conforme resultados obtidos por Mazzafera e Gonçalves (1999).

### **2.3.1 Influência das variações ambientais**

Os compostos nitrogenados transportados através do xilema indicam também alterações ambientais e sua sazonalidade. Há um grande interesse sobre a influência das mudanças estacionais e seus reflexos na concentração de nitrogênio e outros constituintes de folhas e tecidos lenhosos, especialmente de plantas perenes. Isso porque elas fornecem informações quanto às necessidades durante todo o ano e o período mais indicado para as adubações (Kozłowski e Pallardy, 1996). Assim, diversos estudos foram direcionados a fim de esclarecer tais aspectos.

Sellstedt e Atkins (1991) trabalhando com plântulas de 180 dias de *Casuarina cunninghamiana*, *C. equisetifolia* e *C. glauca* inoculadas com dois diferentes tipos de *Frankia*, analisaram os compostos nitrogenados transportados em xilema. As análises foram feitas em plantas noduladas e não noduladas de *C. glauca*, com ou sem variação nos níveis de nitrogênio. Encontraram alterações na composição de amino compostos no xilema das três espécies. A proporção de asparagina diminuiu com o aumento na concentração  $\text{NO}_3^-$  em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , tanto em plantas noduladas e não noduladas, enquanto a glutamina aumentou. Isso indica, possivelmente, uma capacidade limitada para transferência da amida da glutamina para asparagina, no aumento do suprimento do amônio no sistema radicular. Plantas supridas com nitrogênio combinado (nitrato/amônio) transportaram pequena parte do amônio através do xilema, enquanto que, em plantas não supridas com a mesma fonte do elemento, os níveis de amônio foram baixos.

Os aminos compostos transportados no xilema apresentam grande especificidade. Ainda assim, asparagina, glutamina e citrulina predominam, embora possam sofrer leves alterações dentro de uma população vegetal. Stewart et al. (1993), estudando as características da assimilação de nitrogênio inorgânico em uma sucessão vegetal, encontraram, como regra geral, que plantas herbáceas e não simbióticas apresentaram uma alta capacidade para reduzir o nitrato. Enquanto isso, espécies lenhosas com algum tipo de associação com micorrizas exibiram pequena capacidade para fazê-lo. Assim sendo, consideraram que espécies tardias no processo de colonização utilizam amônio ou outra forma de nitrogênio orgânico mais do que nitrato.

Em um estudo comparativo das frações de nitrogênio em três espécies lenhosas do cerrado brasileiro, Causin e Bustamante (1996) verificaram que, em folhas, os níveis de aminoácidos não sofreram grandes alterações durante o crescimento. Contudo, níveis mais elevados foram identificados entre os meses



de julho e setembro na espécie *Miconia ferruginata*, o que foi atribuído à frutificação. Com o avanço da estação seca houve redução nos níveis de nitrato nas folhas e aumentou rapidamente após a chuva, ou seja, a concentração de nitrato das folhas foi resposta direta das condições ambientais. Do mesmo modo, a concentração de nitrato no xilema diminuiu no período seco.

Schmidt e Stewart (1998), avaliando o transporte, armazenamento e mobilização de nitrogênio em lenhosas de áreas secas e úmidas da Austrália, encontraram no pico das estações secas, a arginina como principal composto nitrogenado em seiva de xilema de espécies decíduas que na estação chuvosa foi alterada para amidas. Espécies sempre verdes, com suprimento adequado de água, transportaram amidas na estação seca. O nitrato correspondeu a 7% do nitrogênio total no xilema de decíduas e 12% em espécies sempre verdes. Na estação seca, este valor chegou a 22%. Sugeriram ainda que o N recentemente assimilado é transportado principalmente como amida e nitrato. A arginina é a forma na qual o N armazenado é remobilizado e transportado em espécies caducifólias na estação seca.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção e cultivo das plantas

As plantas de seringueira foram obtidas a partir de sementes ilegítimas do clone RRIM 600, coletadas em março de 2000, em um plantio comercial na cidade de Tabapuã, estado de São Paulo.

As sementes foram lavadas em água destilada e colocadas para germinar em bandejas plásticas, contendo areia lavada com água de torneira durante três horas, seguida por uma lavagem em hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) por 12 horas. Novamente, água de torneira em abundância, seguida por nova lavagem em água destilada por três vezes.

As bandejas permaneceram nas salas de crescimento, com temperatura de  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ , com 60% a 80 % de umidade relativa do ar, fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons (DFF) de  $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , determinada a uma distância de 80 cm das lâmpadas fluorescentes, correspondendo à extremidade superior das bandejas.

Após germinação, ao atingirem o estágio “palito”, as plântulas foram retiradas das bandejas, selecionadas quanto à uniformidade de parte aérea e raízes e transferidas para vasos plásticos com capacidade de três litros, contendo areia lavada sob as mesmas condições descritas acima.

As plantas foram mantidas com água destilada até a implantação dos tratamentos (Costa Netto, 1997).

Os tratamentos foram iniciados aos sessenta dias após o transplante para os vasos, utilizando solução nutritiva completa de Bolle-Jones (1957), adaptada por Delú Filho (1994) e modificada por Lemos (1996), com concentração de 8 mmol/L de nitrogênio na forma de nitrato e/ou amônio e pH

6,5. Em cada vaso foram adicionados 1150 mL da solução nutritiva, de forma que houvesse um volume excedente de 400 ml, o qual era coletado em pratos plásticos colocados sob os vasos. Diariamente, a solução dos pratos retornava para o vaso, após o volume ter sido completado com água destilada. O pH foi medido diariamente e ajustado para o valor 6,5, quando necessário. A troca da solução nutritiva foi efetuada semanalmente (Delú-Filho,1994).

Foram instalados três experimentos. No primeiro experimento utilizaram-se três plantas por vaso, com três repetições e solução nutritiva contendo 8 mmol/L de nitrogênio na forma de nitrato (Lemos et al.,1999) e cuja composição é apresentada na Tabela 1. Foram avaliadas as atividades das enzimas redutase do nitrato, sintetase da glutamina, sintase do glutamato e composição da seiva do xilema nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 144 horas após o início dos tratamentos.

No segundo experimento foram utilizadas duas plantas por vaso, com três repetições e o nitrogênio fornecido sob a forma de nitrato e/ou amônio, na concentração final de 8 mM de nitrogênio, nas seguintes proporções: 8mmol/L  $\text{NO}_3^-$ , 4 mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  e 8mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (Lemos et al., 1999). Como controle foram consideradas as plantas cultivadas em solução nutritiva na ausência do nitrogênio (Tabela 1). Foram realizadas as mesmas análises, exceto a quantificação do nitrato em seiva de xilema, sendo que as avaliações foram efetuadas aos 6 e 45 dias após o início dos tratamentos.

No terceiro experimento foram utilizadas plantas com um ano de idade, cultivadas em viveiro, em sacolas contendo substrato composto por 70% de solo e 30% de esterco de curral peneirado que receberam adubação básica composta por 1,0 kg de cloreto de potássio e 3,0 kg de super fosfato simples por  $\text{m}^3$  de mistura, no plantio. As plantas foram retiradas das sacolas e as raízes lavadas em água corrente em abundância. Foram colocadas duas plantas por vaso plástico, em um volume de 8L de solução nutritiva (Tabela 1) contendo o nitrogênio

fornecido sob a forma de nitrato e /ou amônio, com concentração final de 8 mmol/L de N, nas seguintes proporções: 8mmol/L  $\text{NO}_3^-$ , 4 mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  e 8 mmol/L  $\text{NH}_4^+$ . Ao final de sete dias foi coletado o exsudato do xilema e nestas amostras quantificados apenas aminoácidos.

### 3.2 Determinação do pH e N total da areia utilizada

O pH da solução da areia utilizada durante o experimento foi determinado segundo a metodologia descrita por Delú Filho (1994). Tomaram-se cinco amostras de 10 g cada, que foram transferidas para beckers de 40 mL contendo 25 mL de uma solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol/L. Após agitação por cinco minutos, os beckers foram colocados em repouso para decantação da areia e a leitura do pH efetuada no sobrenadante.

O teor de nitrogênio na areia utilizada foi determinado por meio da quantificação do elemento utilizando-se o método de micro-Kjhedal.

**Tabela 1.** Composição das soluções nutritivas (Lemos, 1996).

Sal	Solução estoque (mol.L <sup>-1</sup> )	Proporção de nitrato e amônio (m mol.L <sup>-1</sup> )			
		0/0	8/0	4/4	0/8
Volume da solução estoque (ml.L <sup>-1</sup> )					
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,50	-	6,0	-	-
KNO <sub>3</sub>	0,50	-	4,0	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50	-	-	8,0	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> )	0,50	-	-	-	2,0
CaSO <sub>4</sub>	0,01	150	-	100	150
KCl	0,50	2,0	-	-	4,0
MgSO <sub>4</sub>	0,50	2,5	5,0	2,5	2,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	2,0	2,0	2,0	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50	2,0	1,0	3,0	1,0
CaCl <sub>2</sub>	0,50	-	-	1,0	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50	-	-	-	1,0
Solução de micronutrientes (m mol.L <sup>-1</sup> )					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25,00	1,0	1,0	1,0	1,0
CuSO <sub>4</sub>	0,50	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA	20,00	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,50	1,0	1,0	1,0	1,0
MnSO <sub>4</sub>	2,00	1,0	1,0	1,0	1,0
ZnSO <sub>4</sub>	2,00	1,0	1,0	1,0	1,0
Elemento	Concentração total (mg L <sup>-1</sup> )				
N		0	112	112	112
P		31	31	31	31
K		117	117	117	117
Ca		60	120	60	60
Mg		30	60	30	24
S		120	96	120	198

### **3.3 Atividade da enzima redutase do nitrato**

A atividade da enzima redutase do nitrato foi determinada *in vivo*, em tecidos de raízes das plantas de seringueira. Foram utilizados 500 mg de tecido de raízes laterais, destacadas na inserção com a raiz principal e segmentadas com cerca de 5mm de comprimento e transferidos para recipientes plásticos de cor preta, com capacidade aproximada de 20 mL, contendo 5 mL de um meio de incubação composto por tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,5, 100 mmol/L de KNO<sub>3</sub> e 5% de n-propanol (v/v), segundo metodologia adaptada e sugerida por Cairo et al. (1994). As amostras foram levadas para infiltração a vácuo durante um minuto, repetido-se por duas vezes. Os tubos foram então transferidos para banho-maria a 30° C, com agitação no escuro. Aos 10 e 40 minutos foram retiradas alíquotas de 500 µL e adicionadas ao meio de reação contendo 1 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em HCl 1,5 N, 1 mL de N-2-naftil etilenodiamino di-HCl 0,02 % (p/v) e 1,5 mL de água MilliQ. O nitrito formado foi quantificado colorimetricamente, por meio de leitura em espectrofotômetro DU 640B, Beckman, USA, a 540 nm e comparadas contra uma curva padrão para nitrito. A atividade da enzima foi expressa em µmol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> .mg<sup>-1</sup> proteína.h<sup>-1</sup>.

### **3.4 Enzimas de assimilação do amônio**

#### **3.4.1 Obtenção dos extratos enzimáticos**

Foram avaliadas as atividades das enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato dependente do NADH (NADH-GOGAT). Foram utilizados tecidos de raízes para avaliações da sintase do glutamato e raízes e lâminas foliares, para sintetase da glutamina. O material foi coletado ao final de cada período de avaliação, sendo a primeira coleta após três horas de exposição à luz e considerado o tempo zero às 10:00 da manhã. O material vegetal foi

envolvido em papel alumínio, colocado em N líquido e armazenado em freezer - 80°C até o momento das análises.

O extrato bruto foi obtido tomando-se entre 0,5 a 1,0g do tecido vegetal, que foi macerado em graal com 5 mL de um meio contendo 4,75 mL de tampão Tris-HCL 0,1 mol/L, pH 7,5; 2 mmol/L de Ditioneitol (DTT); 1 mmol/L de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e 10% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e em seguida, centrifugado a 16.000g por 20 minutos a 4°C. Durante a extração as soluções e equipamentos foram mantidos a temperatura de 4°C.

### **3.4.2. Ensaio da sintetase da glutamina (GS)**

Para o ensaio da GS foi utilizada uma alíquota de 300 µL do extrato bruto em um meio de reação contendo 200 µL de Tris-HCL 0,5 mol/L, pH 7,5; 100µL de 2-mercaptoetanol 0,1 mol/L; 50 µL de sulfato de magnésio 0,4 mol/L; 150 µl de NH<sub>2</sub>OH.HCl; 0,1 mol/L; 100 µL de ATP 0,1 mol/L e 100 µL de glutamato 0,5 mol/L, sendo o volume final do ensaio de 1000 µl.

O meio de reação foi levado ao banho-maria por 30 minutos a 30°C, com agitação. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de solução contendo cloreto férrico 0,3 mol/L, 0,67 mol/L de HCl e 0,20 mol/L de ácido tricloro acético, seguida de centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O quelato Fe-L-gutamil-Y-hidroamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm (Ratajczack,1981) e a atividade enzimática expressa em µmoles GHA mg<sup>-1</sup>proteína.min<sup>-1</sup>.

### **3.4.3. Ensaio da sintase do glutamato dependente do NADH (NADH-GOGAT)**

Tomou-se uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do extrato cru obtido de raízes, ao qual foi adicionado um meio contendo 500  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 7,5; 100  $\mu\text{L}$  de glutamina 15 mmol/L; 100  $\mu\text{L}$  de 2-oxoglutarato 15 mmol/L; 100  $\mu\text{L}$  de cloreto de potássio 10 mmol/L. O meio foi incubado por três minutos a 25°C e em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de NADH, sendo monitorada a oxidação do poder redutor a cada minuto, durante 10 minutos, por espectrofotometria, em comprimento de onda a 340nm(UV). A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{moles GLU mg}^{-1}\text{proteína.min}^{-1}$ .

### **3.5 Determinação de proteínas solúveis**

A determinação da proteína solúvel foi realizada pelo método Bradford (1976), utilizando a albumina serina bovina como padrão e nos mesmos extratos brutos utilizados para os ensaios enzimáticos. As amostras foram incubadas com o reagente Comassie G-250 em temperatura ambiente por cinco minutos e absorvância determinada a 595nm.

### **3.6 Coleta do exsudato de xilema**

O exsudato de xilema foi obtido por meio de metodologia adaptada de Scholander et al. (1965), Milburn e Ranasinghe (1996) e Stoermer et al. (1997). As plantas foram decapitadas a uma altura aproximada de 8 cm e retiradas dos vasos. As raízes foram lavadas em água deionizada, para retirada do excesso de areia. Procedeu-se a retirada dos tecidos da casca do caule, que se destacavam com facilidade até o ponto de inserção do sistema radicular. Esse material foi



transferido para uma bomba de pressão do tipo Scholander, deixando a extremidade cortada do caule acima da câmara. Efetuou-se um novo corte na extremidade do caule que foi lavado com água MilliQ em toda sua extensão (Rennenberg, Schneider e Weber, 1996). Foi aplicada uma pressão entre 0,3 a 0,5 bar, testada anteriormente, para favorecer o início da coleta (Stoermer et al.1997). O primeiro fluxo foi descartado a fim de eliminar possível contaminação. Com uma seringa descartável inserida na região central do xilema e com uma suave sucção, transferiu-se exsudato para o interior da seringa. Os exsudatos foram coletados por um período entre 15 e 20 minutos e colocadas em microtubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até realização das análises.

### **3.7 Quantificação de nitrato em seiva do xilema**

O nitrato foi quantificado em plantas tratadas com 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  e monitoradas do tempo zero até 144 horas (6 dias). Foi utilizada a metodologia de Cataldo (1975) reduzindo o volume dos reagentes, considerando o volume disponível das amostras. Tomou-se um volume de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de ácido salicílico a 5% diluído em ácido sulfúrico concentrado (g/v) e deixado em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foram adicionados, lentamente, 4,75 mL de NaOH 2M e, após resfriamento em temperatura ambiente, foi efetuada leitura em espectrofotômetro com absorvância de 410 nm. Foi utilizada como parâmetro uma curva padrão com concentração entre 0-240  $\text{nmol.L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ .

### 3.8 Quantificação de aminoácidos na seiva do xilema

Os aminoácidos do xilema foram separados e analisados por meio de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), por fase reversa e derivatização de aminoácidos com orthophthalaldeído (OPA) baseado no método descrito por Puiatti e Sodek (1999). O OPA reage com aminas primárias na presença do 2-mercaptoetanol para formar o produto isoindol.

As amostras foram obtidas com 10 a 20  $\mu\text{L}$  da seiva do xilema adicionando-se 60 a 70  $\mu\text{L}$  de OPA em um tempo de reação de 1,5 minuto. Após a reação tomou-se, em uma microseringa, o volume de 10  $\mu\text{L}$  do tampão, 10  $\mu\text{L}$  da amostra preparada e novamente 10  $\mu\text{L}$  do tampão. O volume total (30  $\mu\text{L}$ ) foi injetado no equipamento e iniciada a separação. Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-2 (5 $\mu\text{m}$ , 4x250mm) e a eluição realizada em gradiente linear a 0,8 ml/minuto, sendo a solução eluente composta de metanol 65% e tampão fosfato-acetato com pH 7,25, 50 mmol/L acetato de sódio, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 ml ácido acético, 20 ml de tetrahydrofuran e 20 ml de metanol em 1 litro de água. O gradiente foi obtido alterando-se a proporção do metanol 65% em relação ao tampão. A proporção aumentou de 20% a 60% entre 0 e 25 minutos, de 60% a 75% entre 25 a 31 minutos e 75% a 100% entre 31 e 50 minutos. O efluente da coluna foi monitorado através de um detector de fluorescência Shimadzu (modelo RF 350), operando com excitação em 250 nm e emissão em 480 nm. Os dados obtidos foram comparados com o Padrão Sigma S18 com 2,5  $\mu\text{mol aa/ml}$  (diluído dez vezes) e foram expressos em percentual do total de aminoácidos recuperados, excluindo-se a prolina, a qual não forma derivado em OPA.

### **3.9 Análise dos dados**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA), sob fator único, sendo os valores médios contrastados pelo teste de Tukey. Tanto na ANAVA quanto no teste Tukey o nível de significância foi de 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade da redutase de nitrato (ARN)

A Figura 1 apresenta a atividade da enzima redutase de nitrato em raízes de plantas de seringueira na presença de 8 mM de  $\text{NO}_3^-$  avaliada durante um período de 144 horas (seis dias), expressa em função da proteína quantificada (atividade específica). Observa-se que a atividade máxima da enzima ocorreu no intervalo de tempo entre 12 e 24 horas. Nos tempos 48 e 72 horas verificou-se uma redução da atividade e voltou a aumentar no tempo 144 horas (seis dias).

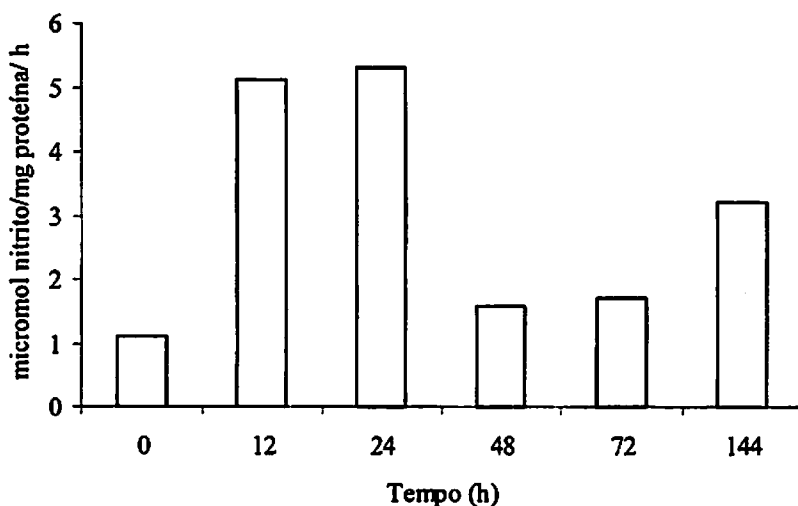


FIGURA 1. Atividade específica da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva com 8mmol/L de  $\text{NO}_3^-$  durante um período de 144 horas – média de três repetições (UFLA/MG, 2001).

Uma resposta rápida da enzima, em raízes, na presença do nitrato, como verificado no presente trabalho, foi anteriormente descrita por Melzer et al. (1989). Os resultados aqui encontrados demonstram a indução da enzima pelo seu substrato. Resposta semelhante foi encontrada por Delú-Filho et al. (1997) em raízes de plantas jovens de seringueira quando os autores verificaram que a atividade da RN foi estimulada positivamente pelo aumento da concentração do nitrato ao meio de cultivo até 12mmol/L. Há indicações também de que a enzima é pré-existente nas raízes como pode ser verificado no tempo zero. Tal informação necessita de confirmação sobre a existência do nitrato nas sementes, o qual não foi quantificado no presente trabalho.

Por outro lado, a redução verificada no tempo de 48 horas pode ser consequência de uma regulação da RN pelo próprio nitrato como sugerido por King et al. (1993) ou pelo acúmulo de substâncias resultantes da redução e assimilação. A queda na ARN, nessas condições, parece ser um interessante mecanismo de preservação ou manutenção da integridade celular, uma vez que o nitrato, sendo acumulado nos vacúolos, é muito menos tóxico do que o nitrito e amônio, produtos estes resultantes da rota assimilatória do nitrato. Simultaneamente, a síntese do glutamato e glutamina estaria regulando negativamente a ARN, como descrito por Vicentz et al. (1993).

A Figura 2 apresenta a ARN nas raízes de plantas de seringueira na presença de nitrato e/ou amônio avaliada aos 6 e 45 dias. Houve uma maior atividade da enzima RN quando a fonte de nitrogênio utilizada foi apenas nitrato e reduziu quando na presença do amônio, confirmando os resultados anteriormente obtidos por Lemos et al. (1999).

Verifica-se também que a atividade da RN aos seis dias foi levemente superior quando comparada com os valores aos 45 dias. Tal comportamento foi discutido por Druart et al. (2000), trabalhando com plantas de chicória, quando o autor verificou que na fase inicial de crescimento até os 42 dias a ARN foi maior

e após esse período diminuiu, indicando alterações na assimilação e particionamento do nitrogênio.

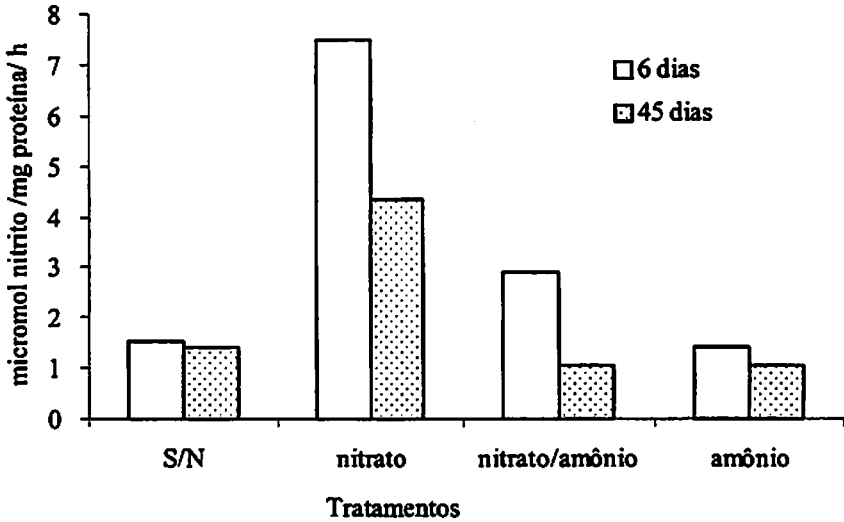


FIGURA 2. Atividade específica da redutase de nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mmol/L  $\text{NO}_3^-$  (nitrate); 4mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (nitrate/amônio) e 8mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (amônio) aos 6 e 45 dias após indução dos tratamentos – média de três repetições (UFLA/MG, 2000).

#### 4.2 Proteínas em raízes e folhas

As plantas cultivadas na presença de 8 mM de nitrato por um período de 144 horas apresentaram os maiores valores de proteínas em folhas entre os tempos 12 e 48 horas, diminuiu no tempo 72 horas e aumentou no tempo 144 horas.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que há uma pequena quantidade de proteínas solúveis nas raízes de plantas jovens de seringueira quando comparadas com os valores encontrados nos tecidos foliares.

A menor disponibilidade de proteínas solúveis em raízes ocorre no tempo entre 12 e 24 horas. Comparando com a ARN no período correspondente tem-se um indicativo que a assimilação do nitrogênio ocorreu utilizando-se esqueletos de carbono a partir da hidrólise de proteínas. Por outro lado, raízes são altamente dependentes de poder redutor e energia metabólica produzidos na parte aérea e que estão presentes em quantidades restritivas nesses tecidos. É possível que haja uma demanda adicional requerida da parte aérea e retranslocadas, via floema, para o sistema radicular com a finalidade de atender à alta atividade biossintética verificada nesses tecidos e também à síntese de compostos orgânicos, em especial aminoácidos e amidas que serão transportados via xilema, ou seja, grande parte da proteína é utilizada, não permitindo seu acúmulo na fase inicial de desenvolvimento das plantas.

TABELA 2. Proteínas solúveis em raízes e folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva com 8 mmol/L de nitrato, durante um período de 144 horas.

Tempo (h)	Proteínas (mg.g <sup>-1</sup> MF)					
	0	12	24	48	72	144
Raízes	1,30	1,00	0,42	1,61	1,52	1,13
Folhas	50,81	70,22	57,63	47,00	33,24	69,54

A Figura 3 apresenta os resultados correspondentes às proteínas solúveis quantificadas em folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mmol/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

(nitrato); 4mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (nitrato/amônio) e 8mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (amônio), aos 6 e 45 dias após indução dos tratamentos.

Não foi verificada uma resposta significativa entre os tratamentos nos valores de proteínas solúveis em raízes avaliadas aos 6 dias após início dos tratamentos. Contudo, observa-se um aumento aos 45 dias nas raízes de plantas cultivadas com nitrogênio na combinação nitrato/amônio. Tal resultado foi também constatado por Lemos (1996), tendo ocorrido uma tendência de maior acúmulo de proteínas totais e de matéria seca em plantas cultivadas em solução na qual foi adicionado o amônio.

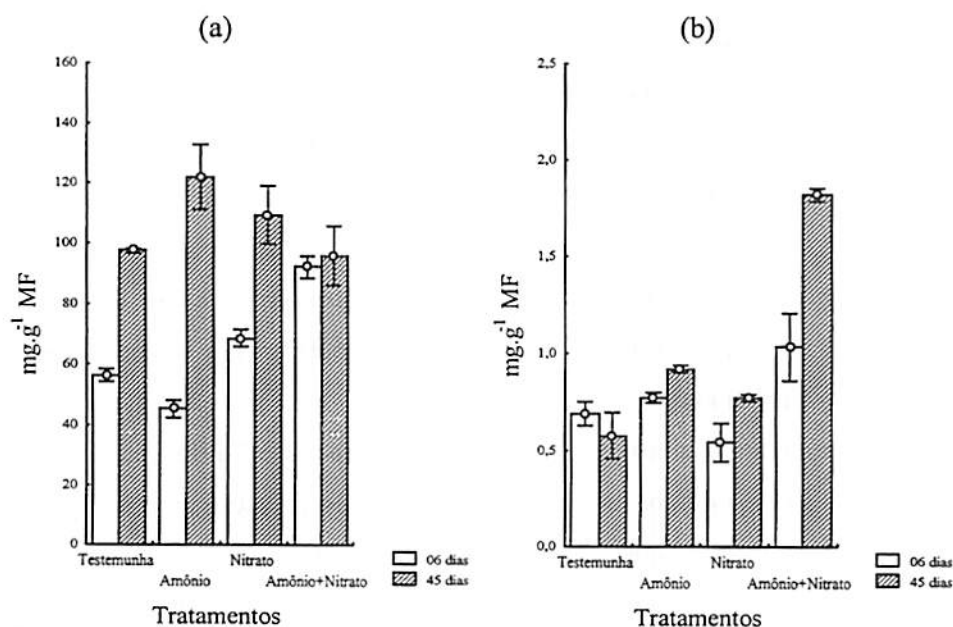


FIGURA 3. Proteínas solúveis em folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de seringueira em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mmol/L  $\text{NO}_3^-$  (nitrato); 4mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (nitrato/amônio) e 8mmol /L  $\text{NH}_4^+$  (amônio), aos 6 e 45 dias após indução dos tratamentos (UFLA/MG, 2001).



### 4.3 Atividade da enzima sintetase da glutamina

As plantas cultivadas na presença de 8mmol/L de  $\text{NO}_3^-$  por um período de 144 horas apresentaram a máxima atividade da enzima sintetase da glutamina, em raízes, no tempo 24 horas (Figura 4).

Atividade específica da GS nas raízes foi superior quando comparada com a atividade da enzima em lâminas foliares, especialmente até 24 horas após adição do nitrato. Trabalhos anteriores indicaram uma atividade enzimática nas raízes muito baixa (Delú-Filho et al. 1997, Lemos et al. 1999 e Costa Netto 1998). Entretanto, no presente trabalho, a apresentação dos resultados considerando a atividade específica parece demonstrar melhor a eficiência do sistema de assimilação do nitrogênio nas raízes de plantas jovens de seringueira.

Possivelmente, pelas condições de cultivo, particularmente com relação à baixa radiação fotossinteticamente ativa a que as plantas estavam submetidas, a produção de compostos de carbono não foi suficiente para atender a assimilação de todo amônio disponível após 24 horas do início do tratamento. Provavelmente, também, a falta de energia metabólica e esqueletos de carbono para assimilação de todo nitrato reduzido foi responsável por uma redução da atividade da enzima após o tempo 24 horas.

Considerando ainda que trabalhos anteriores (Delú-Filho et al., 1998; Lemos et al., 1999) demonstraram que a assimilação do nitrogênio, em plantas jovens de seringueira, ocorre basicamente no sistema radicular, há aqui uma indicação de que outras partes da planta respondem pela demanda gerada nestes tecidos.

Em folhas, não houve alterações significativas na atividade da enzima. Deve ser considerada ainda a liberação do amônio, via fotorrespiração, o qual estaria também respondendo pela alta atividade da GS em folhas como já discutido por Lea (1997). Especialmente porque foi constatado po meio da

análise da seiva do xilema, que não houve o transporte do amônio para a parte aérea dessas plantas (dados não apresentados).

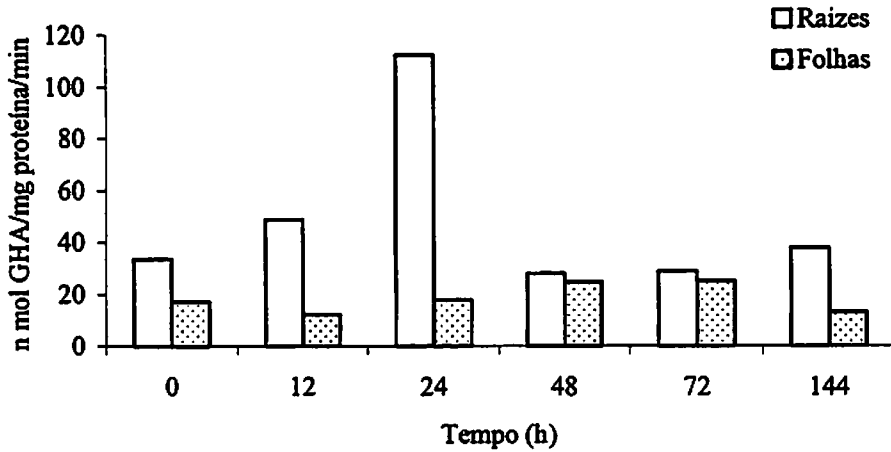


FIGURA 4. Atividade da enzima glutamina sintetase (GS) em raízes e folhas de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva com 8mmol/L de  $\text{NO}_3$ , durante um período de 144 horas (UFLA/MG, 2001).

Seith et al. (1994), trabalhando com plantas de beterraba, consideraram que a atividade da GS na ausência de nitrato é parte de um mecanismo para reassimilar o amônio liberado durante a proteólise e metabolismo de proteínas. Já a síntese da GS na presença da luz e nitrato indica a dominância da assimilação do nitrato.

A assimilação do nitrogênio e, conseqüentemente, a produção da glutamina poderia explicar a redução da atividade da GS, em raízes, no tempo de 48 horas, uma vez que esse aminoácido tem ação reguladora na atividade da enzima, como já relatado na literatura (Lea, 1997).

Vézina et al. (1987) encontraram um efeito positivo do nitrato sobre a atividade da enzima em ervilha. Purcino et al. (1992), trabalhando com sete cultivares de milho encontraram também um efeito positivo do nitrato sobre a concentração da GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub>.

A atividade da enzima nas plantas cultivadas em solução nutritiva contendo nitrato e/ou amônio é apresentada na Figura 5. Verifica-se que, aos seis dias, a atividade da GS, em folhas, foi alterada na presença do nitrogênio com redução de sua atividade no tratamento que recebeu o nitrato e aumento significativo nas plantas que receberam o amônio exclusivamente. No entanto, aos 45 dias não apresentou resposta clara aos tratamentos.

Em raízes, aos seis dias, as plantas que receberam apenas o nitrato apresentaram uma maior atividade específica da enzima, no entanto aos 45 dias as maiores atividades foram encontradas nas plantas que receberam apenas amônio e plantas cultivadas na ausência do nitrogênio (Figura 5). A atividade da enzima em plantas cultivadas em solução contendo apenas amônio indica que a seringueira mantém um processo de assimilação ativo do N, evitando neste caso o acúmulo de amônio nos tecidos radiculares.

Em plântulas de pinheiro Seith et al. (1994) encontraram ação positiva na atividade da GS em raízes após 21 dias da adição do nitrato e amônio em comparação às plantas controle, especialmente em raízes. Em plantas de *Pisum sativum*, Vézina et al. (1987) encontraram atividade da GS 3,6 vezes maior em raízes com nitrato, as quais não responderam à aplicação de amônio. Em contraste Mack e Tischner (1990) encontraram um efeito estimulante do amônio na atividade da GS em raízes primárias e laterais de beterraba quando comparadas com plantas na presença de nitrato.

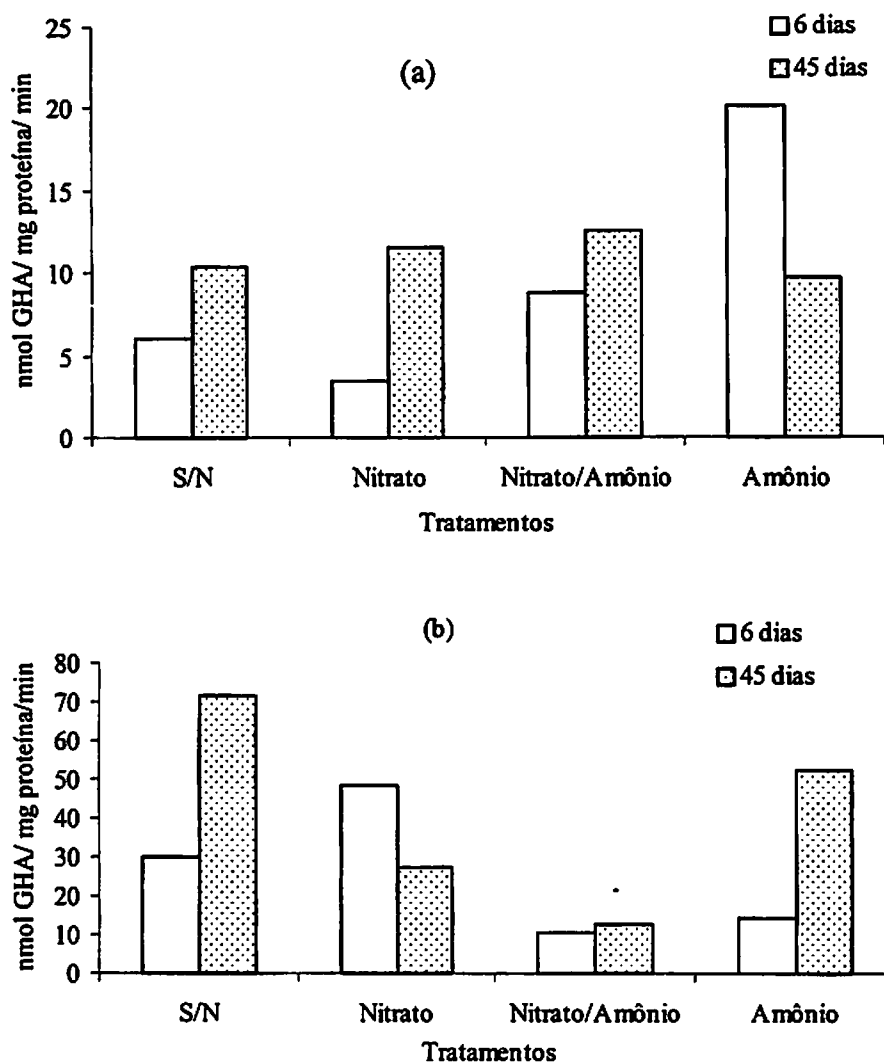


FIGURA 5. Atividade da enzima sintetase da glutamina (GS) em folhas (a) e raízes (b) de plantas jovens de seringueiras cultivadas em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mmol/L  $\text{NO}_3^-$  (nitrato); 4mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (nitrato/amônio) e 8mmol/l  $\text{NH}_4^+$  (amônio) aos 6 e 45 dias após indução dos tratamentos (UFLA/MG, 2001).

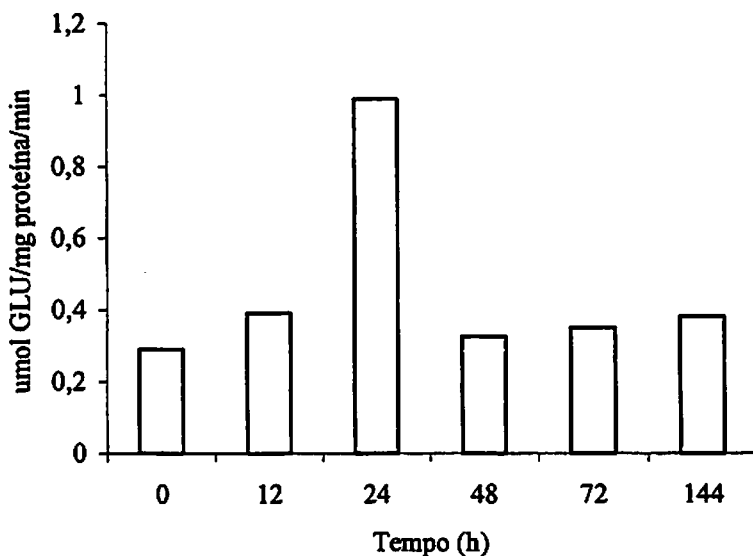
Delú Filho (1994) discute, ainda, a baixa atividade da enzima nos tecidos de raiz, em baixa concentração de nitrato. Ela pode ser resultado do processo regulatório que atua em condições de baixo fornecimento de C e/ou N para a planta, mantendo a enzima em sua forma inativa como alternativa para outras rotas metabólicas, como para o processo de absorção e redução do nitrato após o fornecimento exclusivo desse íon para a planta que estimula a glicólise, havendo, portanto, aumento da demanda de C metabolicamente ativo. Ratajczak et al. (1981) observaram que a atividade da GS foi inibida na presença de baixa concentração de  $\text{NH}_4^+$ . Porém, quando foi fornecida sacarose ao meio, houve aumento expressivo na atividade da enzima.

Estes trabalhos demonstram que a atividade da enzima apresenta comportamento diferenciado entre espécies e até mesmo entre órgãos da planta em relação à fonte de nitrogênio utilizada.

#### **4.4 Atividade da enzima sintase do glutamato**

Com relação ao comportamento da enzima GOGAT-NADH, em raízes de plantas que receberam solução nutritiva contendo 8mM de nitrato por um período de 144 horas, verifica-se uma resposta crescente até em torno de 24 horas e reduzindo, em seguida, como pode ser observado na Figura 6.

Os resultados encontrados na literatura relacionados ao efeito do nitrato sobre a atividade da enzima não são conclusivos. Há relatos de que o nitrato exerce influência positiva sobre a *síntese de novo* e ativação (Oaks, 1994) como observado no período de tempo até 24 horas. Contudo, a redução que se segue pode ser justificada pela baixa disponibilidade de poder redutor em consequência das condições de cultivo a que as plantas estavam submetidas, como já discutido anteriormente.



**FIGURA 6.** Atividade da enzima GOGAT- NADH em raízes de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva com 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , durante um período de 144 horas (UFLA/MG, 2001).

A Figura 7 apresenta a atividade da enzima GOGAT-NADH em raízes de plantas cultivadas na ausência de nitrogênio; 8mM  $\text{NO}_3^-$ ; 4 mM  $\text{NO}_3^-$  + 4mM  $\text{NH}_4^+$  e 8 mM  $\text{NH}_4^+$  aos 6 e 45 dias após indução dos tratamentos.

Verifica-se que a atividade da enzima foi levemente aumentada na presença de nitrato aos seis dias, sendo que aos 45 dias houve redução da atividade específica da enzima nas plantas que receberam solução nutritiva contendo nitrato e amônio. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em trabalhos anteriores. Delú Filho et al. (1998) verificaram que a presença do nitrato não produziu efeito algum sobre a atividade da GOGAT-NADH em raízes de seringueira. Lemos et al. (1999) encontraram que a adição gradativa do amônio e redução da concentração do nitrato aumentaram progressivamente a

atividade da enzima até a concentração de 2mM/ 6mM de nitrato e amônio e estabilizaram-se no tratamento só com amônio.

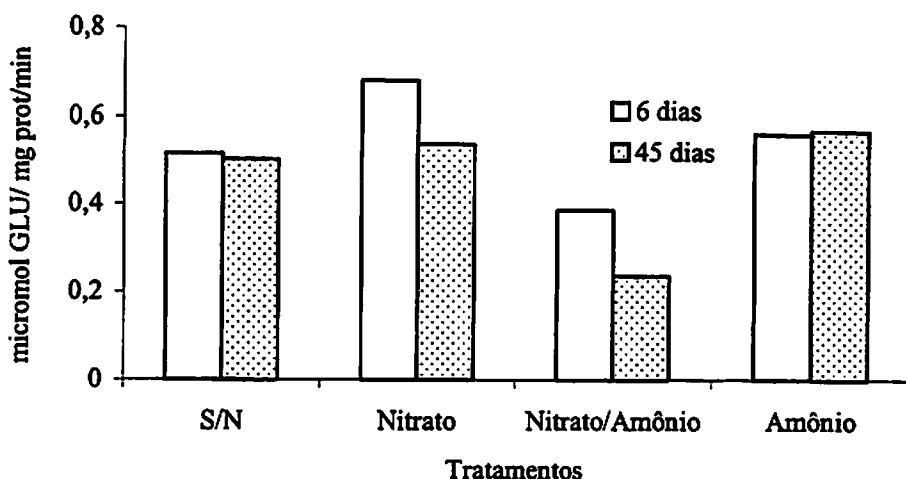


FIGURA 7. Atividade da enzima sintase do glutamato-NADH em plantas jovens de seringueiras cultivadas em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mmol/L  $\text{NO}_3^-$  (nitrato); 4mmol/L  $\text{NO}_3^-$  + 4mmol/L  $\text{NH}_4^+$  (nitrato/amônio) e 8mmol/l  $\text{NH}_4^+$  (amônio) aos 6 e 45 dias após indução dos tratamentos (UFLA/MG, 2001).

#### 4.5 Nitrato transportado na seiva de xilema

Os resultados apresentados na Figura 8 mostram o transporte de nitrato no xilema de plantas de seringueira cultivadas na presença de 8 mM  $\text{NO}_3^-$  por um período de 144 horas. Verifica-se que as maiores quantidades de nitrato foram transportadas no tempo 24 horas após o início dos tratamentos e diminuíram entre 48 e 72 horas, com um novo aumento em 144 horas.

Segundo trabalho realizado por Mead e Preston (1994), o nitrato absorvido nas raízes pode ser transportado para folhas, especialmente em plantas que recebem nitrogênio sob esta forma e seu transporte está relacionado com a concentração externa do íon, idade e desenvolvimento. Em geral, à medida que aumenta a concentração externa, a proporção que é transportado também aumenta.

Deve ser considerado ainda que altas taxas de redução de nitrato na raiz exigem fornecimento de esqueletos de carbono, energia e poder redutor para assimilação do amônio produzido. Assim, os resultados sugerem que o transporte foi também um mecanismo de controle para evitar o acúmulo de íons de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NH}_4^+$  nos tecidos da raiz.

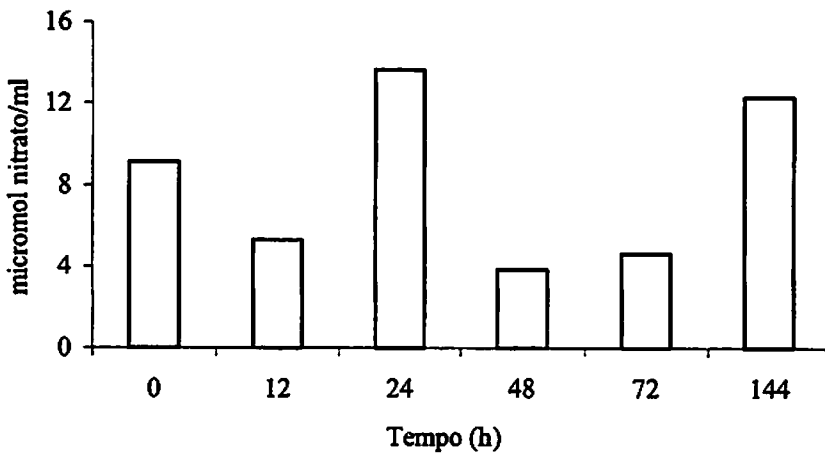


FIGURA 8. Nitrato transportado em seiva de xilema de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva com 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ , durante um período de 144 horas (UFLA/MG, 2001).



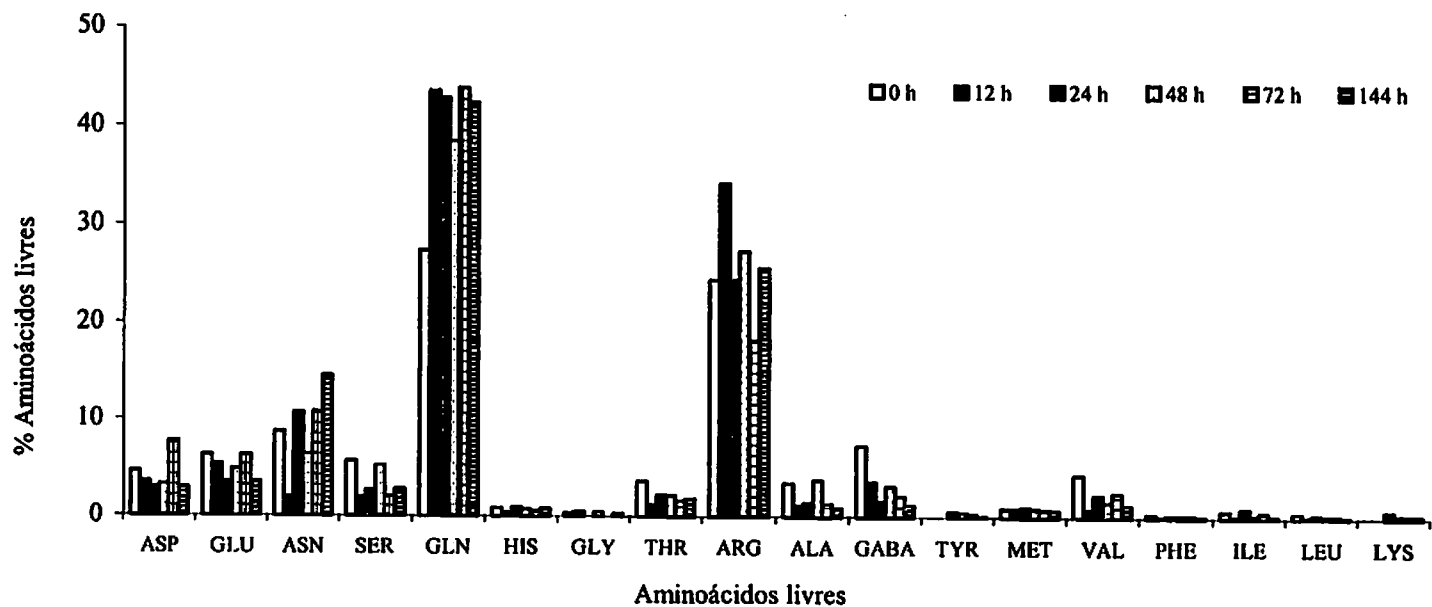
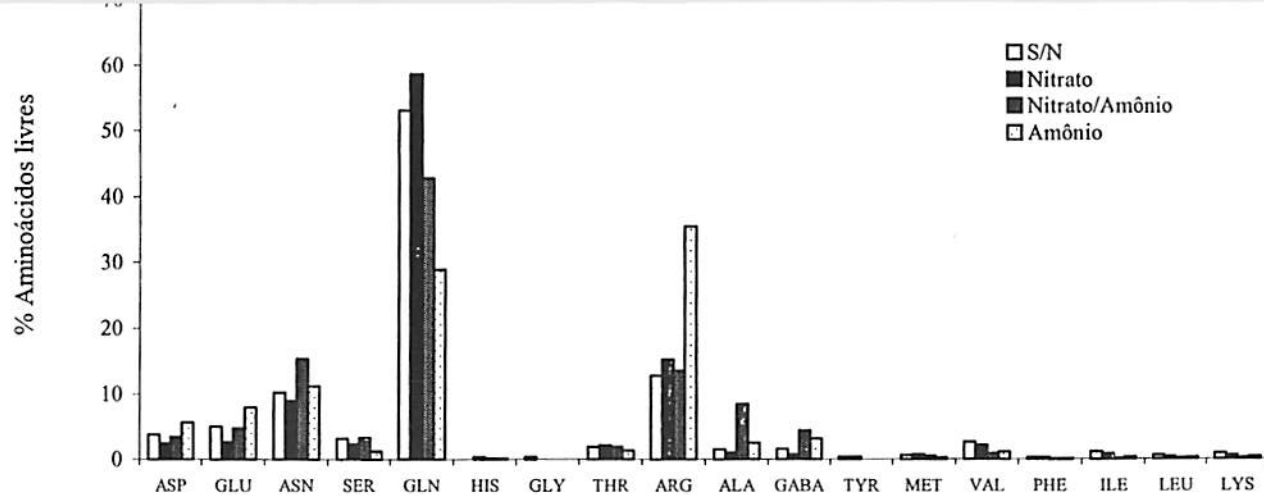


FIGURA 9. Aminoácidos transportados na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira cultivadas em solução nutritiva contendo 8 mM de nitrogênio na forma de nitrato, por um período de 144 horas (UFLA/MG, 2001).



#### Aminoácidos livres

FIGURA 10. Aminoácidos transportados no xilema de plantas jovens de seringueiras cultivadas em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mM  $\text{NO}_3^-$  (nitrato); 4 mM  $\text{NO}_3^-$  + 4mM  $\text{NH}_4^+$  (nitrato/amônio) e 8 mM  $\text{NH}_4^+$  (amônio), aos seis dias após indução dos tratamentos (UFLA/MG, 2001).

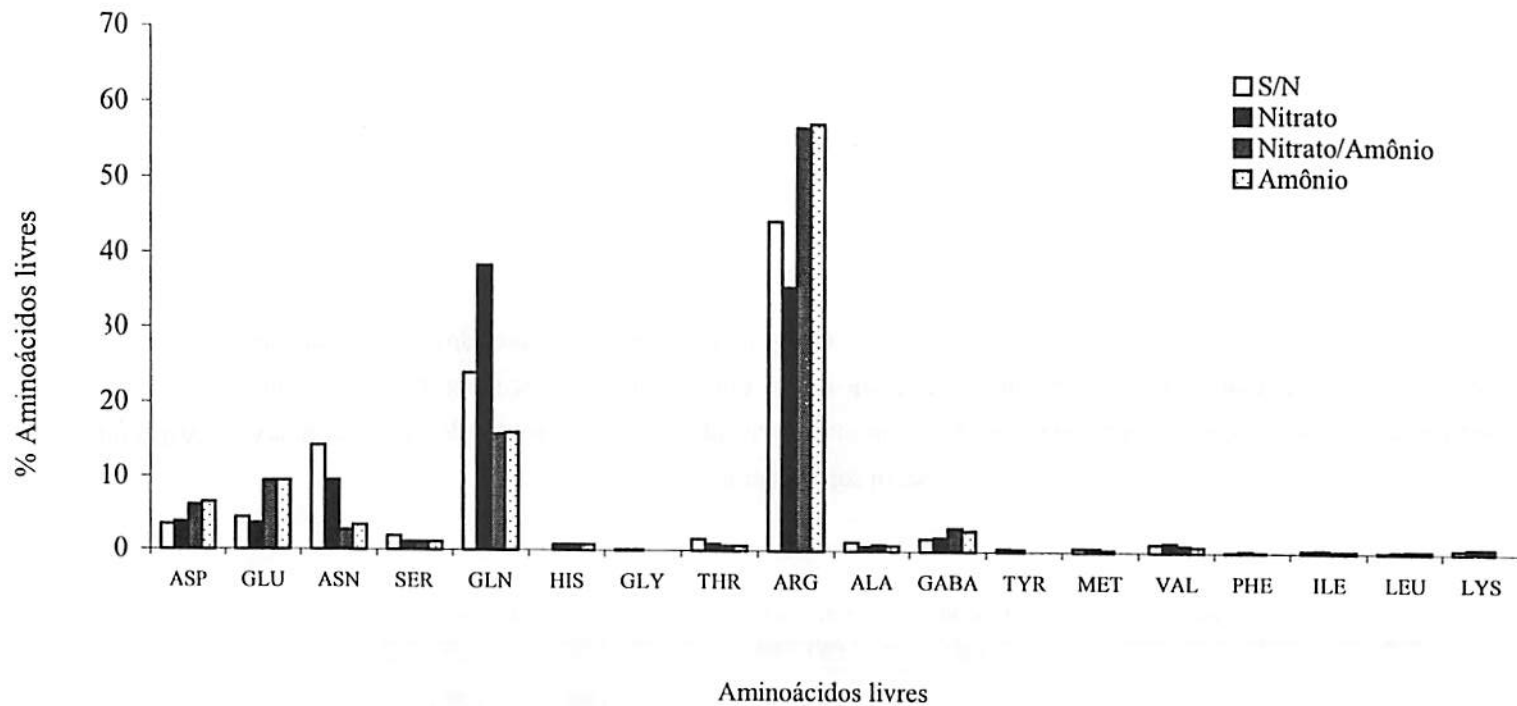


FIGURA 11. Aminoácidos transportados no xilema de plantas jovens de seringueiras cultivadas em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mM  $\text{NO}_3^-$  (nitrato); 4 mM  $\text{NO}_3^- + 4\text{mM NH}_4^+$  (nitrato/amônio) e 8 mM  $\text{NH}_4^+$  (amônio), aos 45 dias após indução dos tratamentos (UFLA/MG, 2001).

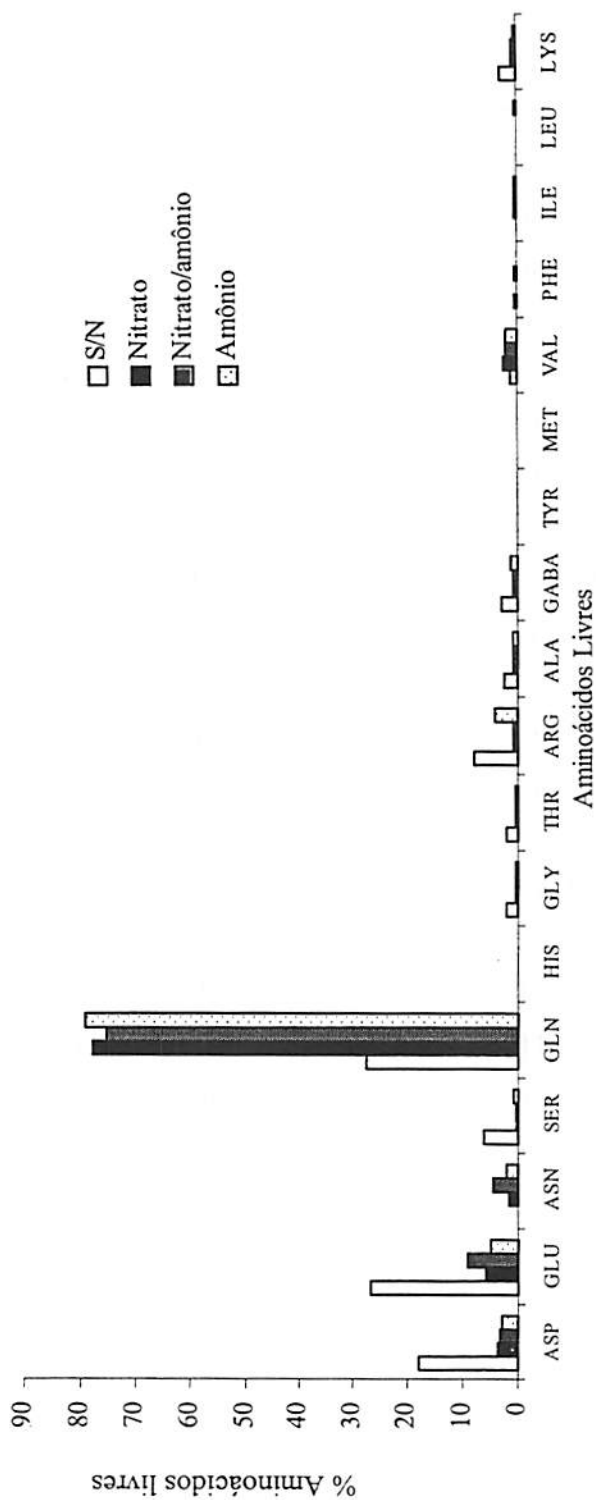


FIGURA 12. Aminoácidos transportados na seiva de xilema de plantas de seringueira com 1 ano de idade, cultivadas durante 7 dias em solução nutritiva na ausência de nitrogênio (S/N), 8mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato); 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + 4mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (nitrato/amônio) e 8 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (amônio) (UFLA/MG, 2001).

Alterações no transporte de aminoácidos são freqüentemente relacionadas na literatura também como consequência de alterações no suprimento de água. Considerando que as plantas utilizadas no presente experimento foram cultivadas com solução nutritiva, não foi possível analisar tais condições. Entretanto, Schmidt e Stewart (1998) identificaram que espécies de florestas tropicais úmidas tendem a transportar maiores quantidades de arginina somente no pico da estação seca ou na senescência de folhas de plantas decíduas. Tal informação deve ser analisada para o caso da seringueira, uma vez que, em condições de campo, a senescência de folhas na estação seca provavelmente estaria promovendo uma alteração no transporte de compostos nitrogenados através do xilema. Do mesmo modo, a fase de crescimento deve também ser considerada, pois foram observadas alterações em função do tempo do tratamento e idade das plantas. Druart et al. (2000) encontraram mudanças significativas na composição de aminoácidos em raízes e parte aérea de plantas de chicória em função do seu desenvolvimento. O conteúdo de glutamina foi maior nos primeiros dias após semeadura até cerca de 56 dias. Após este período, diminuiu.

Os trabalhos realizados até a presente data têm sido com plantas jovens de seringueira, especialmente pelas dificuldades de coleta de exsudatos em plantas lenhosas adultas. Identificar alterações promovidas no transporte de aminoácidos através do xilema em consequência do estágio de vida da planta pode ser uma informação importante quanto ao metabolismo no nitrogênio na espécie e suas consequências na produção.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que houve indução da atividade da enzima RN pelo nitrato, representada por sua máxima atividade já no primeiro intervalo de tempo avaliado.

A presença do nitrogênio, independentemente da forma utilizada promoveu alterações na atividade das enzimas sintetase da glutamina e sintase do glutamato- NADH.

As plantas cultivadas na presença de nitrato transportaram esses íons através do xilema. Glutamina e asparagina são os aminoácidos predominantes na seiva do xilema, independentemente da forma de nitrogênio utilizada e podem alternar entre si em função da fonte de nitrogênio fornecido e idade da planta.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.9, p.511-519, 1986.

ASKERLUND, P.; LAURENT, P.; NAKAGAWA, H. et al. NADH-ferricyanide reductase of leaf plasma-membranes partial purification and immunological relation potato-tuber microsomal NADH-ferricyanide reductase and spinach leaf NADH nitrate reductase. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, n.1, p.6-13, Jan. 1991.

ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C. Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. **Plant Physiology**, Rockville, v.75, n.3, p.623-628, July 1984.

ASLAM, M.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. Comparative Kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, n.3, p.1124-1133, July 1992.

ATHWAL, G.S.; LOMBARDO, C.R.; HUBER, J.L. et al. Modulation of 14-3-3 protein interactions with target polypeptides by physical and metabolic effectors. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.41, n.4, p.523-533, Apr. 2000.

ATKINS, C.A.; BEEVERS, L. Synthesis, transport and utilization of translocated solutes of nitrogen. In: ABROL, Y.P. (Ed.). **Nitrogen in Higher Plants**. New York: J.Wiley, 1990. p.223-295.

ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; PEOPLES, M.B. et al. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, n.4, p.841-848, Apr. 1983.

BAPTISTA, J.A.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz Agulha e Bico Ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.7, p.1325-1330. jul. 2000.

BECKER, T.W.; CABOCHE, M. CARRAYOL, E. et al. Nucleotide-sequence of a tobacco cDNA-encoding plastidic glutamine synthetase and light-inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.19, n.3, p.367-379, June 1992.

BENNETT, M.J.; CULLIMORE, J.V. Glutamine-synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L subunit composition in developing root nodules and plumules. **Planta**, Berlin, v.179, n.4, p.433-440, Nov. 1989.

BOLLE-JONES, E.W. Cooper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant an Soil**, Dordrecht, v.10, n.2, p.168-178, 1957.

BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v.72, p.248-254, 1976.

CAIRO, P.A.R.; OLIVEIRA, L.E.M.; DELÚ FILHO, N. Determinação das condições ótimas de ensaio *in vivo* da redutase do nitrato em algumas espécies arbóreas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.18, n.1, p.87-95, jan./abr. 1994.

CASCARDO, J.C.M. **Comportamento biofísico, nutricional e metabólico de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) em função da aplicação de gesso e da disponibilidade de água no solo**. 1991. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and plant analysis**, New York, v.6, n.1, p.71-90, 1975.

CAUSIN, H.F.; BUSTAMANTE, M.M.C. A comparative study of different nitrogen fractions in three woody species of the cerrado. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 3, 1996, Brasília. **Anais...** Brasília: 1996.

COCK, J.M.; BROCK, I.W.; WATSON, A.T. et al. Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *phaseolus vulgaris*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.17, n.4, p.761-771, Oct. 1991.

COSTA NETTO, A. P. **Efeito da presença do nitrogênio exógeno (N-NO<sub>3</sub> e /ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) sobre a atividade das enzimas de assimilação de amônio e remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.)**. Lavras: UFLA, 1997. (Dissertação –Mestrado em Fisiologia Vegetal).

CRAWFORD, N.M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, n.7, p.859-868, July 1995.



CUNHA, T.J.F.; BLANCANEUX, P.; CALDERANO FILHO, B. et al .  
Influência da diferenciação pedológica no desenvolvimento da seringueira no município de Oratórios, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.1, p.145-155, jan. 2000.

DELÚ FILHO, N. **Efeito do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)** . 1994. 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M.; ALVES, J.D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, n.3 p.329-336, jul./set. 1997.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M.; ALVES, J.D. et al. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.10, n.3, p.185-190, dez. 1998.

DRUART, N.; GOUPIL, P.; DEWAELE, E. et al. Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) which acquire radial growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, n.344, p.539-546, Mar. 2000.

EDWARDS, J.W.; WALKER, E.L.; CORUZZI, G.M. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. **Proceedings of the National Academy Science USA**, Washington, v.87, n.9, p.3459-3463, May 1990.

ERSKINE, P.D.; STEWARD, G.R.; SCHMIDT, S. et al. Water availability- a physiological constraint on nitrate utilization in plants of Australian semi-arid mulga woodlands. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.19, n.9, p.1149-1159, Dec. 1996

FLAIG, H.; MORH, H. Assimilation of nitrate and ammonium by scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedling under conditions of high nitrogen supply. **Plant Physiology**, Rockville, v.84, n.10, p.568-576, Oct. 1992.

GALANGAU, F.; DANIEL-VEDELE, F.T. et al. Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tabaco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, n.2, p.383-388, Oct. 1988.

HAGEMAN, R.H.; FLESHER, D. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. **Plant Physiology**, Rockville, v.35, n.5, p.700-708, Sept. 1960.

HANISCH TEN CATE, C.H.; BRETELER, H. Role of Sugars in Nitrate Utilization by Roots of Dwarf Bean. **Plant Physiology**, Rockville, v.52, p. 129-135, 1981

HARRIS, N.; FOSTER, J.M.; KUMAR, A. et al. Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L.cv. Désirée): sequence analysis, genomic organization and expression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, n.347, p.1017-1026, June 2000.

HUBER, J.L.; HUBER, S.C.; CAMPBELL, W.H. et al. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 296, p.58-65, 1992.

KAISER, W.M.; BRENDLE, E. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase-activity by photosynthesis 1. Modulation *in vivo* by CO<sub>2</sub> availability. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.2, p.363-367, June 1991.

KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Post-translational of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, n.3, p.817-821, Nov. 1994.

KAISER, W.M.; WEINER, H.; HUBER, S.C. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.105, p.385-390, 1999.

KANDBINDER, A.; WEINER, H.; KAISER, W.M. Nitrate reductase from leaves of Mamona (*Mamona communis* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) have different regulatory properties. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, n.347, p.1099-1105, June 2000.

KEYS, A.J.; BIRD, I.F.; CORNELIUS, M.J. et al. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature*, London, v.275, n.5682, p.741-743, Oct. 1978.

KING, B.J.; SIDDIQI, M.Y.; RUTH, T.J. et al. Feedback- regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiology*, Rockville, v.102, n.4, p.1279-1286, Aug. 1993.

KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. *Physiology of Woody Plants – Nitrogen Metabolism*. 2.ed. San Diego: Academic, 1996. p.189-209.

LEA, P.J. Primary Nitrogen Metabolism In: HARBONE, M. *Plant biochemistry*. New York: Academic, 1997. p.273-313

LEA, P.J.; FOWDEN, L.; MIFLIN, B.J. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus species* . *Phytochemistry*, Oxford, v.17, n.2, p.217-222, 1978.

LEMOS, G.B. de. **Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio**. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LEMOS, G.B.; DELU FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M. et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Viçosa, v.11, n.2, p.113-118, ago. 1999.

MACK, G.; TISCHNER, R. Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Planta*, Berlin, v.181, n.1, p.10-17, Jan. 1990.

MAZZAFERA, P.; GONÇALVES, K.V. Nitrogen compounds in the xylem sap of coffee. *Phytochemistry*, Oxford, v.50, n.2, p.383-386, Jan. 1999.

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

McNALLY, S.; HIREL, B. Glutamine synthetase isoforms in higer plants. *Physiologie Vegetale*, Paris, v.21, p.761-774, 1983.

MEAD, D.J.; PRESTON, C.M. Distribution and retranslocation of  $^{15}\text{N}$  in lodgepole pine over eight growing seasons. **Tree Physiology**, Victoria, Canadá, v.14, p.389-402, 1994.

MELZER, J.M.; KLEINHOF, A. WARNER, R.L. Nitrate reductase regulation- effects of nitrate and light on nitrate reductase messenger- RNA accumulation. **Molecular General Genetics**, New York, v.217, n.2/3, p.341-346, June 1989.

MIAO, G.H.; HIREL, B.; MARSOLIER, M.C. et al. Ammonia regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. **Plant Cell**, Rockville, v.3, n.1, p.11-22, Jan. 1991.

MILBURN, J.A.; RANASINGHE, M.S. A comparison of methods for studying pressure and solute potentials in xylem and also in phloem laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.294, p.135-143. Jan. 1996.

OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p. 739-750, 1994.

PATE, J.S.; ATKINS, C.A.; WHITE, S.T. et al. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v.65, n5, p.961-965, May 1980.

PRIMA-DUTRA, D.; BOTTON, B. Organic and Inorganic Compounds of Xylem Exudates from Five Woody Plants at the Stage of Bud Breaking. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v.153, p. 670-676, 1998.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of Soybean. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v.37, n.10, p.767-773, Oct. 1999.

PUJADE-RENAUD, V.; CLEMENT, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, n.1, p.127-132, May 1994.

PURCINO, A.A.C. Enzimas de assimilação do amônio em milho. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Relatório técnico**. Brasília, 1992. p.1040-1045.

QUEIROZ, C.G.S.; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T. et al. Ritmo diurno na atividade da redutase de nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.7, p.787-795, jul. 1993.

RAAB, T.K.; TERRY, N. Carbon, nitrogen, and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source,  $\text{NO}_3^-$  - versus  $\text{NH}_4^+$ . **Plant Physiology**, Rockville, v.107, n2, p.575-584, Feb. 1995

RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n.1, p.277-280, Jan. 1981.

RENNENBERG, H.; CHNEIDER, S.; WEBER, P. Analysis of Uptake and Allocation of Nitrogen and Sulfur Compounds by Trees in the Field. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v.47, n.303, p.1491-1498, Oct. 1996.

ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G. et al. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, n.2, p.509-516, Feb. 1991.

SCHMIDT, S.; STEWART, G.R. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Austrália. **Tree Physiology**, Victoria, v.18, n.6, p. 403-410, June 1998.

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, T.; BRADSTREET, E.D. Sap pressure in vascular plants. **Science**, London, v.148, n.3668, p.339-345, Apr. 1965.

SEITH, B.; SETZER, B.; FLAIG, H. et al. Appearance of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase in different organs of the scots pine (*Pinus Sylvestris*) seedling as affected by light, nitrate and ammonium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.3, p 419-426, July 1994.

SELLSTEDT, A.; ATKINS, C.A. Composition of amino compounds transported in xylem of *Casuarina* sp. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.245, p.1493-1497, Apr. 1991.

SHELP, B.J. Composition of phloem exudates and xylem sap from broccoli (*Brassica Oleracea* var itálica) supplied with  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.38, n.185, p.1619-1636, Oct. 1987.

STEWART, G.R.; PATE, J.S.; UNKOVICH, M. Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone mediterranean-type vegetation. **Plant Cell and Environment**, Kyoto, v.16, n.5, p.351-363, Feb. 1993.

STOERMER, H.; SEITH, B.; HANEMANN, V. et al. Nitrogen distribution in young Norway spruce (*Picea abies*) trees as affected by pedospheric nitrogen supply. **Physiol. Plantarum**, Copemhagen, v.101, n.4, p.764-769, Dec. 1997.

VÉZINA, L.P; HOPE, H.J.; JOY, K.W. Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum* L. cv Little marvel) and alfafa (*Medicago media* Pers. Cv Saranac). **Plant Physiology**, Rockville, v.83, n.1, p.58-62, Jan. 1987.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant Journal**, Oxford, v.3, n.2, p.315-324, Feb. 1993.

VITORIA, A.P.; SODEK,L. Xylem Sap Nitrogen Compounds of Some *Crotalaria* Species. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.3, p.733-737, jul./set.1999

WINK, M. Special Nitrogen Metabolism. In: HARBONE, M. **Plant biochemistry**. New York: Academic, 1997. p.439-480

