

NELSON DELÚ FILHO

**EFEITO DO N-NO₃ SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DAS
ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS
JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**

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

Orientador

Prof. Dr. LUIZ EDSON MOTA DE OLIVEIRA

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
1994

NELSON DELÚ FILHO

**EFEITO DO N-NO₃ SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DAS
ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS
JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**

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

Orientador

Prof. Dr. LUIZ EDSON MOTA DE OLIVEIRA



LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
1994

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Delú Filho, Nelson

Efeito do $N-NO_3^-$ sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (Hevea brasiliensis Muell Arg.) / Nelson Delú Filho. Lavras : UFLA, 1994.

87 p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Seringueira - Nitrato - Assimilação. 2. Seringueira - Nitrogênio - Atividade de enzimas. 3. Seringueira - Crescimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.


CDD-633.89528942


NELSON DELÚ FILHO


EFEITO DO $N-NO_3^-$ SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE
ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

Dissertação apresentada à Uni-
versidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de
"Mestre".

Aprovada em 28 de dezembro de 1994


Prof. José Donizeti Alves

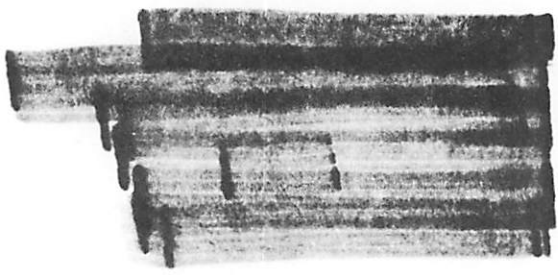

Pesq. Antônio Álvaro C. Purcino


Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira
(Orientador)

1944

THE UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR
BUREAU OF LAND MANAGEMENT
WASHINGTON, D. C.

TO: [Name]
FROM: [Name]
SUBJECT: [Subject]



DATE: [Date]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

FOR THE DIRECTOR, BUREAU OF LAND MANAGEMENT
WASHINGTON, D. C.

À D. Arlette, que Deus me deu a
oportunidade de tê-la por Mãe,
e à minha irmã Cláudia
dedico este trabalho.

À memória de meu pai, que
sempre me acompanhou,
ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida para realização do curso.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) pelo financiamento do projeto.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira pela orientação segura, dedicada atenção e entusiasmo com que se empenha em suas atribuições.

Ao Prof. José Donizetti Alves pelos ensinamentos, sugestões valiosas e amizade conquistada durante o curso.

Ao Pesquisador Antônio Álvaro Corsetti Purcino pelo apoio e sugestões dadas.

Ao Prof. Fabiano Ribeiro do Vale pelas sugestões e ensinamentos.

Ao Pesquisador Frederico O. M. Durães pela revisão e sugestões dadas.

A Marlúcia Rocha Silva e Edna pela valiosa ajuda na realização de parte deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Biologia, em especial aos do curso de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e agradável convívio.

Aos amigos da república Júlio, Israel, Carlos e Clóvis pela amizade, apoio e incentivo.

A Sérgio Araújo Figueiredo, que o tempo encarregou-se de torná-lo verdadeiramente um irmão.

À Claudilene Nunes de Souza pelo apoio, carinho e afeto.

Aos amigos do mestrado Gidelma, Fátima, Ari, Renatão e família, Patrícia, Soninha, Aurora, Claudinéia, Jailson e Ricardo.

Aos casais Douglas e Kátia, Rogério e Socorro, Paulo Cairo e Valéria pela sincera amizade.

Aos meus tios Alfieri e Francisca, aos primos Cida, Bel, Pedrão, Paulão, Élcia, Paola, Marcelo, Paulinho e Mayara pelo incentivo, amizade e demonstração de fraternidade.

Ao Engenheiro Agrônomo Marcos Munhoz Blanco e família, pelo incentivo e doação do material vegetal.

A Sr.^ª Arlete de Carvalho Magalhães e distinta família pelo inegável apoio durante minha permanência em Lavras.

Às amigas Esdras e Giane grandes companheiras.

Aos funcionários Dartagnhan, Odorêncio e Ana Isa pela inegável ajuda durante os trabalhos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Quando você deseja alguma coisa, todo
o universo conspira para que você a consiga".

Paulo Coelho

Não procureis Deus apenas fora de vós,
tornando-o concreto em imagens e expressões da
matéria, mas `sentí-o`, sobretudo em sua forma de
maior poder dentro de vós, na idéia abstrata,
estendendo os braços para o universo do espírito,
que vos aguarda".

A Grande Síntese, Pietro Ubaldi

BIOGRAFIA

NELSON DELÚ FILHO, filho de Nelson Delú e Arlette Itavo Delú, nasceu em São José dos Campos-SP, no dia 19 de outubro de 1966.

Concluiu o curso Técnico em Agropecuária em dezembro de 1984, pela Escola Estadual de Segundo Grau de Monte Aprazível (Agrícola). Ingressou na Escola Superior de Agricultura de Lavras, no curso de Engenharia Agrônômica em agosto de 1986, tendo concluído o mesmo em 1991. Em outubro do mesmo ano iniciou o curso de Mestrado na ESAL, concluindo em dezembro de 1994.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 04 |
| 2.1 | Efeito de diferentes doses de nitrato no meio de cultivo sobre a produção e particionamento de matéria seca em plantas jovens de seringueira..... | 04 |
| 2.2 | Otimização das condições de ensaio <i>in vivo</i> da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira..... | 09 |
| 2.3 | Enzimas de assimilação do amônio..... | 12 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 | Obtenção das plantas e sistema de cultivo..... | 17 |
| 3.2 | Experimento 1: Efeitos de diferentes doses de nitrato no meio de cultivo sobre a produção de matéria seca em plantas jovens de seringueira..... | 19 |
| 3.2.1 | Determinação do pH da areia..... | 19 |
| 3.2.2 | Parâmetros biométricos..... | 20 |
| 3.2.3 | Determinação do N-total..... | 20 |
| 3.2.4 | Determinação da presença de bactérias diazotróficas..... | 20 |
| 3.2.5 | Atividade da redutase do nitrato..... | 21 |
| 3.2.6 | Obtenção da matéria seca..... | 21 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Experimento 2: Otimização das condições de ensaio <i>in vivo</i> | |
| da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira..... | 22 |
| 3.3.1 Identificação do sítio de redução do nitrato..... | 22 |
| 3.3.2 Otimização das condições de ensaio <i>in vivo</i> da redutase do nitrato..... | 23 |
| 3.3.3 Ritmo circadiano da atividade <i>in vivo</i> da RN..... | 24 |
| 3.3.4 Atividade <i>in vitro</i> da RN..... | 24 |
| 3.4 Experimento 3: Enzimas de assimilação do amônio..... | 25 |
| 3.4.1 Obtenção dos extratos enzimáticos..... | 25 |
| 3.4.2 Extração e ensaio da sintetase da glutamina e da desidrogenase do glutamato..... | 26 |
| 3.4.3 Extração e ensaio da sintetase do glutamato dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) e dependente do NADH (NADH-GOGAT)..... | 26 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| 4.1 Experimento 1: Efeito de diferentes doses de nitrato no meio de cultivo sobre a produção, o particionamento de matéria seca e atividade radicular da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira..... | 28 |
| 4.1.1 Produção e particionamento de matéria seca, crescimento em altura e diâmetro..... | 28 |
| 4.1.2 Atividade radicular da redutase do nitrato..... | 39 |
| 4.1.3 Influência dos níveis de $N-NO_3^-$ sobre o pH do meio de cultivo..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.2 Experimento II: Otimização das condições de ensaio <i>in vivo</i> da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira..... | 44 |
| 4.2.1 Identificação do sítio de redução do nitrato em seringueira..... | 44 |
| 4.2.2 Otimização das condições de ensaio <i>in vivo</i> da redutase do nitrato..... | 52 |
| 4.2.3 Ritmo circadiano da redutase do nitrato..... | 52 |
| 4.2.4 Atividade <i>in vitro</i> da redutase do nitrato..... | 54 |
| 4.2.5 Análise comparativa da redutase do nitrato em diversas espécies vegetais..... | 55 |
| 4.3 Experimento 3: Enzimas de assimilação do amônio..... | 58 |
| 4.3.1 Sintetase da glutamina (GS; E.C. 6.3.1.2)..... | 58 |
| 4.3.2 Sintase do glutamato dependente do NADH (NADH-GOGAT; E.C. 1.4.1.14) e dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT; E.C. 1.4.1.7)..... | 61 |
| 4.3.3 Desidrogenase do glutamato (GDH; E.C. 1.4.1.3).... | 63 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 68 |
| 6 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | |
|---|----|
| 01- Produção de matéria seca da parte aérea (P.A.) de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%)..... | 30 |
| 02- Produção de matéria seca do sistema radicular (S.R.) de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%)..... | 31 |
| 03- Relação entre matéria seca da parte e do sistema radicular de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%)..... | 33 |
| 04- Crescimento em altura de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%)..... | 37 |
| 05- Crescimento em diâmetro de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%)..... | 38 |

- 06- Concentração de nitrogênio total em caule, raízes e folhas de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%)..... 40
- 07- Atividade radicular da redutase do nitrato em plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 5%) 42
- 08- pH final do meio de cultivo dos vasos onde foram cultivadas as plantas de seringueira sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 1%)..... 44
- 09- Efeito da concentração de substrato (NO_3^-) sobre a atividade radicular da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 1%)..... 47
- 10- Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade *in vivo* da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 1%)..... 49
- 11- Efeito da temperatura sobre a atividade *in vivo* da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 1%)..... 50

- 12- Efeito do tempo de reação sobre a atividade *in vivo* da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 1%)..... 52
- 13- Ritmo circadiano da atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey a 1%)..... 54
- 14- Atividade da GS em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (letras maiúsculas comparam atividade da enzima entre raiz e folha dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam atividade da enzima entre diferentes concentrações de nitrato para uma mesma parte da planta)..... 61
- 15- Atividade da redutase do nitrato *in vivo* em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo..... 62
- 16- Atividade da GOGAT em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (letras maiúsculas comparam atividade da enzima entre raiz e folha dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam atividade da enzima entre níveis de nitrato para uma mesma parte da planta)..... 63
- 17- Atividade da GDH em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (letras maiúsculas comparam atividade da enzima entre raiz e folha dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam atividade da enzima entre níveis de nitrato para uma mesma parte da planta)..... 66

LISTA DE QUADROS

QUADRO

| | | |
|-----|--|----|
| 01- | Efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio de cultivo sobre a produção de matéria seca da raiz principal e de raízes laterais em plantas jovens de seringueira (média de 5 repetições)..... | 32 |
| 02- | Efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio de cultivo sobre a produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular..... | 34 |
| 03- | Acúmulo de N em plantas jovens de seringueira ao final do período experimental..... | 39 |
| 04- | Resultados ótimos obtidos para o ensaio <i>in vivo</i> da Redutase do Nitrato em diversas espécies vegetais..... | 58 |

RESUMO

DELÚ FILHO, Nelson. Efeito do $N-NO_3^-$ sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Lavras: UFLA, 1994. 87p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).

Dentre os minerais essenciais, o N é aquele que se apresenta em maiores níveis nos vegetais superiores, sendo objeto de grande número de estudos que visam esclarecer sua participação no metabolismo das plantas. Entretanto, para a seringueira, os trabalhos encontrados até o momento referem-se, geralmente, à fertilizações químicas em viveiros ou árvores adultas. Com o objetivo de verificar a rota de assimilação do $N-NO_3^-$, assim como seu efeito sobre a produção e particionamento de matéria seca, em plantas jovens de seringueira, foram conduzidos três experimentos.

No primeiro, estudou-se o efeito do fornecimento de diferentes concentrações de $N-NO_3^-$ (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 mM)

* Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira. Membros da Banca: José Donizeti Alves e Antônio Álvaro Corsetti Purcino.

sobre a produção, o particionamento de matéria seca e atividade radicular da enzima redutase do nitrato (RN) em plantas de seringueira com 7 meses de idade. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 3,0 L, contendo areia lavada como suporte de cultivo, irrigadas com solução nutritiva. Essa mesma metodologia de cultivo foi empregada nos demais experimentos.

Os resultados mostraram uma influência crescente do $N-NO_3^-$ sobre a produção de matéria seca (M.S.) até a concentração de 12 mM. Com relação ao particionamento da M.S., o $N-NO_3^-$ afetou mais significativamente a distribuição dentro do sistema radicular, entre raízes laterais e principal, do que entre a parte aérea e o sistema radicular. Por outro lado, o diâmetro do caule e a altura das plantas não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de $N-NO_3^-$, possivelmente pelo fato das plantas terem sido cultivadas sob baixa intensidade de radiação fotossinteticamente ativa, o que provocou um visível estiolamento das plantas, mascarando o efeito do $N-NO_3^-$ sobre esses parâmetros. A atividade radicular da RN foi afetada positivamente pelas concentrações crescentes de $N-NO_3^-$ até 12 mM, mas na concentração de 16 mM o efeito do nitrato sobre a atividade da enzima foi negativo. (*feed-back*).

No segundo experimento, procedeu-se a otimização das condições de ensaio *in vivo* da RN em plantas de seringueira cultivadas com 8 mM de $N-NO_3^-$. Inicialmente, foi constatado que a redução do nitrato *in vivo* ocorre apenas no sistema radicular de plantas de seringueira. A otimização foi realizada nesse órgão da planta através das variações no tempo de incubação, na concentração de nitrato, no pH e na temperatura do meio de

incubação. As atividades máximas da RN foram conseguidas quando a reação foi paralizada aos 60 minutos, com 100 mM de N-NO_3^- , pH entre 7,0 e 7,5 e 30°C .

No último experimento, plantas de seringueira foram cultivadas a 0, 1 e 12 mM de N-NO_3^- e divididas em lâminas foliares e raízes e nestas partes foram realizados os ensaios para detectar atividade das enzimas GS, GOGAT e GDH. Os resultados indicam grande capacidade das lâminas foliares em assimilar o NH_4^+ via GS/GOGAT e GDH, uma vez que essas enzimas apresentaram níveis de atividade bastante baixos nas raízes.

SUMMARY

$N-NO_3^-$ EFFECTS IN GROWTH AND ACTIVITY OF THE NITROGEN ASSIMILATION ENZYMES IN YOUNG RUBBER TREE (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

Among the essential minerals, N is the one that occurs in the highest levels in higher plants, and is target of a wide number of work which aims to elucidate its participation in the metabolism of plants. However for the rubber tree, the work undertaken up to now refers, in general, to chemical fertilizations in either nurseries or adult trees. In order to verify the assimilation pathway of $N-NO_3^-$, as well and its effects upon both production and partitioning of dry matter, in young rubber tree plants, these experiments were carried out.

In the first one, the effect of different $N-NO_3^-$ concentrations (0, 1, 2, 4, 8, 12 and 16 mM) on the production of dry matter and root activity of the enzyme nitrate reductase (NR) was investigated in young rubber tree plants seven months old. The plants were raised in plastic pots of 3,0 L, containing

river sand as a growing support, watered daily with nutrient solution and kept in growth room. The same methodology of growing was employed in the other experiment. The results showed a growth influence of the concentrations of N-NO_3^- upon the dry matter (DM) production up to the concentration of 12 mM. With regard to the partitioning of the DM, N-NO_3^- effected more significatevely in the distribution inside the root system, than the aerial party. On the other hand, both the stem diameter and plant height did not show any significant differences among the concentrations of N-NO_3^- , possibly due to the strenght of photosynthetically active radiation in the growth, which caused a etiolation of the N-NO_3^- upon these parameters. The root activity oof NR was possitively effected by the increasing rates of N-NO_3^- up to 12 mM, but at the level of 16 mM, the effect of nitrate on the activity of the enzyme was negative.

In the second experiment, the condition of the *in vivo* trial of NR in the rubber tree plants growing in green house and under nutrition solution containing 8 mM N-NO_3^- . Was optimized iniatially, the *in vivo* nitrate reductase was found take place only in the root system of rubber tree plants. For this organ, the activities of NR were reached when the reaction was ceased at 60 minutes, with 100 mM of N-NO_3^- , pH between 7,0 and 7,5 and 30°C in the incubation medium.

In the last experiment, GS, GOGAT and GDH activities were assayed for leaf blades and roots of plant raised under 0, 1 and 12 mM N-NO_3^- concentration. The results indicate high capacity of assimilation of the ammonium in the rubber tree leaves.

1 - INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) é uma espécie natural da Amazônia brasileira e o seu cultivo comercial vem encontrando desde há alguns anos sérios problemas para se expandir naquela região em função de constantes e severos ataques do fungo *Microcyclus ulei*, causador do mal-sulamericano das folhas (Cardoso, 1986; Chee e Holiday, 1986).

No Brasil, as regiões consideradas de escape ao ataque do fungo são aquelas dominadas principalmente por solos sob cerrado, que são altamente intemperizados, refletindo em baixa fertilidade natural (EMBRAPA, 1975).

Dentre os minerais essenciais, o nitrogênio (N) é o que se encontra em maiores níveis nos vegetais, participando da composição química de diversas substâncias fundamentais ao metabolismo da planta, como clorofila, proteínas, fitormônios, poliaminas, etc. As principais formas de N no solo, disponíveis às plantas, são a nítrica e a amoniacal, embora a quantidade de N disponível no solo normalmente é pequena quando comparada com a quantidade total, ou seja, próximo a 5% ou menos. O restante

do N se encontra em combinações orgânicas que não são prontamente aproveitáveis pelos vegetais. A nutrição nitrogenada dos mesmos fica, então, na dependência da transformação do N-orgânico para as formas minerais aproveitáveis, através do processo de mineralização. Nos solos sob cerrado, ou com características químicas semelhantes, a forma mineral predominante de N no solo é a amoniacal, em função da inibição do processo de nitrificação. Porém, em cultivos comerciais, o nível de fertilidade do solo é melhorado através do emprego de calcário e adubações corretivas, que favorecem o desenvolvimento de bactérias nitrificadoras, principal grupo de microrganismos mediadores da nitrificação, ainda que outros organismos heterotróficos, como alguns ascomicetos do gênero Frankia, também possuem essa capacidade (Haynes, 1986). Nessas condições, ocorre uma predominância da forma nítrica no solo em relação à amoniacal, sendo portanto, o nitrato a principal forma de N-mineral adquirido pelas culturas.

Para a grande maioria das espécies cultivadas, sobretudo aquelas de ciclo anual e de clima temperado, o metabolismo de N, desde as formas preferenciais de absorção, até sua assimilação e transporte dentro da planta, tem sido satisfatoriamente estudado, o mesmo não ocorrendo para espécies arbóreas, onde os trabalhos nessa área são raros. O estudo das enzimas responsáveis pela assimilação do N, bem como a caracterização dos sítios de atuação das mesmas, recobre-se de significativa importância no estudo de espécies que são

introduzidas em regiões diferentes daquela de sua origem, como metodologia que possibilite avaliar o desempenho dessas plantas, especialmente quando se deseja avaliar comparativamente em diferentes condições de ambiente. No caso particular da seringueira, até o presente, nenhum trabalho foi encontrado relacionando os efeitos do N sobre a atividade das enzimas responsáveis pela sua assimilação.

Este trabalho teve como objetivos estudar a influência do $N-NO_3^-$ sobre o desenvolvimento de plantas jovens de seringueira, identificar os sítios de redução e assimilação do nitrato, determinar as condições ótimas de ensaio *in vivo* da redutase do nitrato (RN) e compará-las a outros resultados obtidos em estudos semelhantes, além de avaliar as atividades das enzimas sintetase da glutamina (GS), sintase do glutamato dependente do NADH (NADH-GOGAT) e dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) e desidrogenase do glutamato (GDH) em diferentes partes da planta.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio de cultivo sobre a produção e particionamento de matéria seca

O nitrogênio pode ser encontrado no solo na forma orgânica e mineral, com maior predominância para a forma orgânica. Com o processo de mineralização, mediado por microrganismos, formam-se amônio e nitrato, que são formas prontamente disponíveis para as plantas. Em condições de anaerobiose do solo, por exemplo, o nitrito também pode vir a acumular no solo, como produto intermediário do processo de desnitrificação (Fernandes e Rossiello, 1985)

Os vegetais superiores adquirem o N mineral basicamente como nitrato ou amônio, sendo que o primeiro é a principal forma de N mineral nos solos cultivados (Clarke e Barley, 1968), visto que o $N-NH_4^+$ proveniente da decomposição da matéria orgânica ou adicionado ao solo como fertilizante é gradativamente convertido a $N-NO_3^-$ naqueles solos. Todavia, o

processo de nitrificação é muito influenciado por condições ambientais, como aeração e temperatura do solo (Gasser, 1961), inibidores da nitrificação (Silva, Rossiello e Fernandes, 1985) e valores baixos de pH (Mello et al., 1988).

Por ocorrer predominantemente na solução do solo, o nitrato está sujeito à consideráveis perdas por lixiviação em solos que apresentam boa drenagem nas regiões de alta precipitação. Por outro lado, em solos de drenagem deficiente, podem ocorrer perdas pela produção de gases de nitrogênio a partir da desnitrificação. Além disso, o tipo de fertilizante fornecido às plantas influencia nas proporções de nitrato e amônio a que as raízes ficarão expostas. Quando isso ocorre, há uma preocupação constante com o efeito dessas duas formas de N na nutrição e crescimento das plantas. Se cultivadas exclusivamente em N-amoniacal, as plantas apresentam baixas concentrações de Ca, Mg e K e altas concentrações de ânions, especialmente fosfato (Barker e Maynard, 1972; Shelp, 1987), o que normalmente resulta em menor produção de biomassa. Além desses efeitos, o N é o principal fator limitante para a produção de biomassa em ecossistemas naturais, florestas ou cultivos comerciais (Greenwood et al., 1991).

Diversos estudos têm demonstrado que o emprego de N-amoniacal como única forma de N é prejudicial para o crescimento de algumas espécies vegetais (Pill e Lambert, 1977; Goyal, Lorenz e Huffaker, 1982). A adição de nitrato, porém, ameniza os efeitos inibitórios do amônio sobre o crescimento

(Goyal, Lorenz e Huffaker, 1982; Ota e Yamamoto, 1989). Em algumas culturas, a combinação entre nitrato e amônio normalmente resulta em um maior crescimento vegetativo do que quando apenas uma única forma de N é utilizada (Edwards e Horton, 1982; Hartman, Mills e Jones, 1986). Entretanto, algumas espécies do gênero *Vaccinium* apresentam maior desenvolvimento quando o amônio é fornecido em maiores proporções que o nitrato (Peterson, Stang e Dana, 1988; Rosen, Alan e Lubby, 1990).

Além desses efeitos, o N é o principal fator limitante para a produção de biomassa em ecossistemas naturais, florestas ou cultivos comerciais (Greenwood et al., 1991).

Algumas espécies quando cultivadas em solução nutritiva sob condições controladas absorvem o nitrato mais rapidamente que o amônio (Scherer e Mackown, 1987), enquanto outras preferem o amônio (Fried et al., 1965; Edwards e Horton, 1982; Peterson, Stang e Dana, 1988; Serna et al., 1992). As taxas de absorção relativas de nitrato e amônio são influenciadas pela concentração de N, pH e temperatura (Fried et al., 1965; Frota e Tucker, 1972; Warncke e Barber, 1973; Gashaw e Mugwira, 1981; Hartman, Mills e Jones, 1986; Criddle, Ward e Huffaker, 1988). Em algumas espécies, a presença do amônio no meio de cultivo pode inibir a absorção do nitrato (Fried et al., 1965; Breteler e Siegerist, 1984; Serna et al., 1992).

O processo de absorção do nitrato difere dos demais nutrientes pelo fato da absorção nítrica ser induzida pelo

próprio íon (Jackson, Flesher e Hageman, 1973). Embora a absorção de nitrato e amônio seja mediada por transportadores, a absorção nítrica ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, ao passo que a absorção amoniacal é menos dependente de energia (Fernandes e Rossiello, 1985).

A nutrição nitrogenada afeta de maneira diferenciada as espécies vegetais cultivadas. Por exemplo, o fornecimento de N-NO_3^- em diferentes níveis para a alface (Huett e Dettmann, 1991), proporcionou maiores produções de matéria seca total nos níveis intermediários, devido ao aumento de matéria seca da parte aérea, uma vez que o sistema radicular e o caule não responderam ao N-NO_3^- . Por outro lado, o cultivo de trigo em solução nutritiva apresentou maiores produções de matéria seca dos grãos e total quando N-NO_3^- e N-NH_4^+ foram fornecidos conjuntamente (Heberer e Below, 1989).

O crescimento vegetativo é normalmente mais responsivo ao N em relação à produção econômica das culturas, uma vez que nessas a resposta ao N depende ainda do particionamento de matéria seca entre as partes da planta (Huett e Dettmann, 1991). Em trabalhos com tomates, foi verificado que o aumento na produção de frutos estava correlacionada com altas taxas de matéria seca dos frutos em relação à matéria seca total. (Huett, 1986). Para batatas Millard, Robinson e Mackie-Dawson (1989) encontraram altas taxas de incremento na matéria seca do tubérculo para plantas fertilizadas adequadamente.

A distribuição de matéria seca entre parte aérea e sistema radicular também é bastante afetada pelo nível e proporção de $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ a que as plantas estão submetidas. Algumas espécies produzem satisfatoriamente apenas na presença de $N-NO_3^-$ (Goyal, Lorenz e Huffaker, 1982), enquanto outras chegam a atingir produções significativas somente quando o $N-NH_4^+$ é fornecido (Rosen, Allan e Lubby, 1990), embora a maioria das espécies atinja as maiores produções em sistemas que apresentam $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ em níveis e proporções adequadas (Edwards e Horton, 1982).

2.2 Otimização das condições de ensaio *in vivo* da enzima redutase do nitrato

A redutase do nitrato é uma enzima de fundamental importância no metabolismo vegetal, pois media o primeiro passo na conversão do NO_3^- , que é a principal forma de N-inorgânico presente nos solos cultivados, em N-orgânico para ser utilizado posteriormente nos diversos processos metabólicos. O nitrato pode induzir tanto a síntese da proteína RN, assim como a atividade da enzima (Beevers e Hageman, 1969; Oaks et al., 1980; Somers et al., 1983). Além disso, a proteína RN é conhecida por apresentar um rápido "turnover" (Aslan e Oaks, 1976; Beevers e Hageman, 1969). É tida como uma proteína citosólica (Dalling, Tolbert e Hageman, 1972), embora mais tarde, Butz e Jackson

(1977) propuseram que a RN localiza-se na membrana plasmática, atuando como o próprio carreador do NO_3^- para o interior da célula.

Nos trabalhos em que foi adicionado NO_3^- no meio de cultivo, observou-se um aumento na atividade da enzima (Aslan e Oaks, 1976; Beevers e Hageman, 1969) e na quantidade da proteína RN (Somers et al., 1983) em tecidos de raízes e folhas. A rápida perda da atividade da enzima observada após a remoção do NO_3^- , poderia resultar da inativação reversiva da enzima (Yamaya e Ahira, 1978; Ayran, Bat e Wallace, 1983; Somers et al., 1983) ou da degradação irreversível da proteína RN (Wallace, 1973; Yamaya, Solomonson e Oaks, 1980).

Há alguns exemplos na literatura da regulação da atividade ou síntese da RN mediadas pelas diferentes formas de N-orgânico (Guerrero, Vega e Losada, 1980; Srivastava, 1980). Segundo Oaks, Stulen e Boesel (1979), os aminoácidos não têm efeito sobre a redução *in vivo* do nitrato. Porém, Breteler e Arnozis (1985), demonstraram que os aminoácidos exercem efeito indireto sobre a atividade da enzima, possivelmente como resultado da inibição do processo de absorção ou transporte do NO_3^- nas plantas (Heimer e Filmer, 1971; Ruffy et al., 1982). Há evidências de que outros compostos fornecidos pelas raízes, além dos aminoácidos, possam influenciar na absorção do nitrato (Duke e Ham, 1976; Deane-Drummond e Clarckson, 1979; Ruffy et al., 1982).

→ Os estudos relacionados com a assimilação do nitrato até o presente, têm privilegiado os tecidos foliares. Com esses estudos foi possível demonstrar a influência da luz, de forma direta ou não, sobre a redução do nitrato (Srivastava, 1980; Queiroz *et al.*, 1993), bem como a existência de "pools" não metabólicos de nitrato (Ferrari, Yorder e Filner, 1973), a regulação da síntese da proteína RN por "feed-back" (Jackson, Kwik e Volk, 1976), a influência dos défices hídrico (Cairo, 1992) e gasoso (Pelacani, 1993) sobre a atividade da enzima.

Entretanto, em algumas espécies ficou comprovado que as raízes são um importante sítio de redução do NO_3^- (Smirnoff, Todd e Stewart, 1984; Alves, 1985; Queiroz *et al.*, 1993). Sabe-se, porém, que existem diferenças entre o metabolismo das raízes em relação às folhas, principalmente quanto ao custo de obtenção do poder redutor (Oaks e Hirel, 1985).

Diversos fatores do meio de incubação afetam a atividade enzimática, como a concentração endógena do substrato, o pH e a temperatura do meio de incubação, o tempo de reação, entre outros.

Para algumas espécies, como a alfafa (Heuer e Plaut, 1978), cana-de-açúcar (Oliveira e Magalhães, 1989) e café (Meguro e Magalhães, 1982), as condições ótimas para o ensaio *in vivo* já foram determinadas. A atividade da RN *in vivo* sob condições otimizadas é uma excelente característica indicadora do metabolismo geral da planta naquele momento.

2.3 Enzimas de assimilação do amônio

Nos vegetais superiores, a assimilação do nitrogênio é o segundo maior processo metabólico, sendo superado somente pela fixação fotossintética do CO_2 , em virtude daquele nutriente mineral ser encontrado nas plantas em maiores proporções.

Em plantas não noduladas, a aquisição de nitrogênio é decorrente principalmente da absorção do NO_3^- pelas raízes, sobretudo em cultivos comerciais onde as características químicas do solo são melhoradas através da calagem e adubações corretivas. Já na célula vegetal, o NO_3^- é, então, reduzido a nitrito e, em seguida, a amônio pelas enzimas redutase do nitrato (RN) e redutase do nitrito (RNi), respectivamente. A seguir, o amônio pode ser incorporado a aminoácido através da ação conjunta das enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT). A redução e assimilação podem ocorrer nas raízes e/ou nas folhas, sendo que as proporções relativas entre esses dois sítios variam com a espécie (Pate, 1980) e condições ambientais (Costa, 1986). A análise da seiva do xilema pode ser um indicativo sobre o principal sítio de redução ou assimilação do nitrogênio (Pate, 1973). Porém, essa proposição deve ser vista com muito critério, uma vez que o N-orgânico originado do "turnover" de proteínas nas raízes poderá afetar tanto a espécie quanto a concentração do composto nitrogenado translocado na seiva do xilema (Jackson, Kwik e Volk, 1976). Existem algumas espécies vegetais que produzem todo seu N-orgânico nas raízes

(*Lupinus* spp), enquanto outras o fazem na parte aérea (*Xanthium*) e um terceiro grupo que promovem a redução e a assimilação em ambas as partes (Pate, 1980).

Até 1973 era assumido que a principal rota de assimilação do amônio em aminoácido era catalizado pela enzima desidrogenase do glutamato (GDH). Todavia, a descrição das propriedades bioquímicas da GS, particularmente sua alta afinidade pelo amônio (em comparação com a GDH) (O'Neal e Joy, 1974) e a localização de uma substancial proporção dessa enzima nos cloroplastos (Haystead, 1973; O'Neal e Joy, 1973) ou nos plastídeos das raízes (Miflin, 1974), sugerem um grande potencial assimilatório dessa enzima. Isto foi reforçado pela descoberta de Lea e Miflin (1974) de uma rota alternativa na produção de glutamato (GLU), através da detecção da atividade da GOGAT em plantas superiores. Posteriormente, ficou demonstrado claramente que a rota GS/GOGAT era a principal via de assimilação primária do amônio (Miflin e Lea, 1976).

A GS pode representar de 1 a 2% do total de proteínas solúveis em órgãos capazes de assimilar o NH_4^+ e sua atividade aumenta drasticamente durante o desenvolvimento de nódulos em raízes (Hungria, Eagleshan e Hardy, 1992) e em folhas estioladas de arroz expostas à luz (Hirel e Gadal, 1982) e na presença de NO_3^- . Todas essas alterações são atribuídas ao aparecimento diferencial de isoenzimas (Lara et al., 1983; Cullimore e Bennett, 1988).

Nas folhas coexistem duas isoformas de GS, uma citosólica (GS_1) e outra cloroplastídica (GS_2) (McNally e Hirel, 1983), sendo que a GS_1 compreende a maior porção da GS foliar. Recentemente, tem sido demonstrado existirem duas formas de GS também nas raízes, sendo uma plastídica (Vézima, Hope e Joy, 1987).

A GS cataliza a conversão do aminoácido glutamato (GLU) para a amida glutamina (GLN). Esta reação requer, além do GLU e do amônio, ATP e um cátion divalente como cofator. Quando o Mg^{+2} é o cofator, o km para o amônio está entre 10 e 50 μM (Mifflin, Wallsgrove e Lea, 1981).

Após ter sido produzida pela GS, a GLN pode ser utilizada em um grande número de eventos metabólicos, doando seu nitrogênio para a formação de outros compostos nitrogenados, sendo juntamente com a asparagina e ureídeos, os principais compostos translocados nas plantas (Joy, 1988).

A GOGAT cataliza a transferência redutiva do N-amídico da GLN para o 2-oxoglutarato, para formar GLU. Em função do poder redutor utilizado no processo catalítico, podem ocorrer 3 formas distintas de GOGAT. Em folhas, a maior porção da enzima encontra-se localizada nos cloroplastos, sendo a ferredoxina o principal redutor da reação, enquanto que a forma dependente do NADPH, encontra-se em porções reduzidas (Wallsgrove, Lea e Mifflin, 1982). A terceira forma conhecida da enzima está presente nas células das raízes e utiliza o NADH como poder redutor (Oaks e Hirel, 1985).

O papel desempenhado pelo GOGAT é de extrema importância, pois ela promove a ligação entre a assimilação primária do nitrogênio e a síntese de aminoácidos. As duas moléculas de GLU formadas resultam na produção líquida de 1 GLU, já que a outra molécula de GLU poderá retornar como substrato para a GS (Joy, 1988). A ação combinada da GS/GOGAT tem sido denominada de ciclo do glutamato.

A produção líquida de um GLU, entretanto, é idêntica à reação catalizada pela GDH, já que a incorporação de amônio a aminoácido via GDH resulta na produção de uma molécula de GLU, a partir de 2-oxoglutarato, amônio e NADH ou NADPH (extratos purificados de raízes de amendoim podem usar indistintamente os dois redutores, segundo Pahlich e Joy, 1981). A GDH está localizada nas mitocôndrias de folhas e raízes (Emes e Fowler, 1979; Mifflin, 1974; Suzuki, Gadal e Oaks, 1981) e, possivelmente associada à membrana mitocondrial (Yamaya, Oaks e Matsumoto, 1984). Nas folhas, uma forma dependente do NADPH é encontrada nos cloroplastos (Stewart et al., 1980, citados por Oaks e Hirel, 1985). A atividade da GDH é ainda controlada pela presença de Ca^{+2} e NADH (Oaks e Hirel, 1985). Concentrações ideais dessas duas substâncias parece promover um equilíbrio na atividade de aminação da enzima, visto que há evidências de que ela possui atividade oxidativa do GLU (Mifflin e Lea, 1977; Mifflin, Wallsgrave e Lea, 1981). Em um experimento com células de raízes de cenoura, Robinson et al. (1991) usando

espectroscopia ^{15}N -NMR, cromatografia gasosa e espectrometria de massa em preparações *in vivo*, demonstraram que a GDH é ativa na oxidação do GLU mas não na aminação redutiva do 2-oxoglutarato.

Por apresentar um K_m relativamente alto para o amônio, a GDH não poderia competir com a GS pelo cátion disponível (Mifflin e Lea, 1977). Porém, Pahlich e Gerlitz (1980) encontraram um K_m bifásico e dependente da concentração de amônio, o que sugere que o argumento anterior pode não ser válido. Durante o processo fotorrespiratório, no qual duas moléculas de glicina reagem para formar uma molécula de serina, produzindo também CO_2 , amônio e NADH, a matriz mitocondrial torna-se um ambiente com elevadas concentrações de amônio, o que favorece a atividade da GDH (Yamaya, Oaks e Matsumoto, 1984). Além disso, a mitocôndria compartimentaliza a GDH, permitindo, assim, que ela possa competir com sucesso pelo amônio disponível com a GS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar os objetivos propostos foram realizados 3 experimentos. No primeiro, estudou-se a influência de diferentes concentrações de $N-NO_3^-$ no meio de cultivo sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas jovens de seringueira. No segundo experimento, foram avaliados os efeitos de variações no meio de incubação (pH, temperatura e concentração de substrato), além do tempo de reação, sobre a atividade da RN. No último experimento, foi estudado o efeito de três diferentes concentrações de $N-NO_3^-$ sobre a atividade das enzimas GS, GOGAT e GDH em diferentes partes da planta de seringueira.

3.1 Obtenção das plantas e sistema de cultivo

Nos experimentos 1 e 3 as plantas utilizadas foram obtidas a partir de sementes ilegítimas do clone RRIM 600,

coletadas em março de 1993, ao passo que no experimento 2, as sementes do clone RRIM 600 foram coletadas em março de 1992. Nos dois casos, as sementes foram germinadas em canteiros de areia e protegidas contra radiação solar direta por uma palhada de capim mantida a 30 cm de altura da superfície do canteiro, sendo efetuadas três irrigações diárias. Ao atingirem o estágio de "palito", as plântulas foram agrupadas de acordo com a uniformidade das raízes e da parte aérea. Nos experimentos 1 e 3, cada conjunto de 4 plântulas foi transferido para vasos plásticos de 3,0 L, enquanto no experimento 2, o número de plantas em cada vaso foi de 3.

Para o experimento 2, antes do transplântio das plântulas, os vasos plásticos foram cheios com areia seca e nos demais experimentos, optou-se pela utilização da areia úmida, sendo que em todas as situações, a areia havia sido lavada em abundância com água de torneira e depois com água deionizada. A areia utilizada nos experimentos 1 e 3 foi lavada a fim de retirar todo o nitrogênio. As análises para quantificação do N-total na areia foram realizadas pelo método de micro-Kjeldal.

Após o transplântio das mudas ter sido concluído, cada vaso recebeu 1150 mL de solução nutritiva de Bolle-Jones (1957), pH 6,5 e modificada. Sob cada vaso foi colocado um prato para coletar um volume excedente de 400 mL de solução nutritiva previamente determinado em ensaio preliminar. Diariamente, o volume dos pratos era completado com água destilada (experimento 2) ou água deionizada (experimento 1 e 3). Ao final de cada

semana, antes de proceder a troca da solução nutritiva e após a operação anterior ter sido concluída, os vasos eram irrigados com água destilada (experimento 2) ou deionizada (experimentos 1 e 3) em abundância, com o objetivo de evitar uma possível salinização do meio de cultivo. Em todos os experimentos realizados, a única forma de N fornecida às plantas de seringueira foi a nítrica. No experimento 1 foram estudados os níveis 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 mM $N-NO_3^-$, enquanto no segundo experimento as plantas foram cultivadas apenas no nível 8 mM de $N-NO_3^-$ e no último experimento foram estudados os níveis 0, 1 e 12 mM de $N-NO_3^-$.

Os vasos dos experimentos 2 e 3 foram mantidos em casa-de-vegetação durante todo o período experimental; e, aquelas do experimento 1 ficaram nessas condições até o início do período frio (maio de 1993), quando foram transferidos para sala-de-crescimento com $27 \pm 3^\circ C$, 60 a 80% de umidade relativa do ar, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa (R.F.A.) de $300 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, determinada no dossel das plantas.

3.2 AVALIAÇÕES REALIZADAS

3.2.1: Experimento I: Efeitos de diferentes doses de nitrato no meio de cultivo sobre a produção e particionamento de matéria seca em plantas jovens de seringueira.

3.2.1.1 Determinação do pH da areia

A determinação do pH da areia foi realizada segundo metodologia de rotina empregada no Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Após a areia ter sido lavada, tomou-se 5 amostras de 10 g cada e que foram transferidas para beckers de 40 mL contendo 25 mL de uma solução de CaCl_2 0,01 M. Após intensa agitação durante 5 minutos, os beckers foram colocados em repouso para decantação da areia e, em seguida, procedeu-se a leitura do pH no sobrenadante. Procedimento semelhante foi empregado ao final do experimento para obtenção do pH final, porém, nesse caso, foram realizadas medições de pH em amostras de todos os vasos.

3.2.1.2 Parâmetros Biométricos

A cada 7 dias foram avaliados o diâmetro e a altura (medidos em relação à superfície do vaso), o número de fluxos de

crescimento por planta e número de folhas por fluxo de crescimento.

3.2.1.3 Determinação do N-total

Durante o experimento, amostras de água deionizada e das soluções nutritivas dos diferentes tratamentos foram analisadas para quantificação do N-total pelo método de micro-Kjeheldal.

3.2.1.4 Determinação da presença de bactérias diazotróficas

Foi realizado também um ensaio para averiguar se havia presença de bactérias diazotróficas nas raízes de seringueira. Para isso, 1 g de raízes laterais coletadas nos diversos vasos de cada concentração foram macerados em água deionizada com auxílio de um graal. O homogenato foi coletado e após ter sido diluído 1, 10, 100 e 1000 vezes foi aplicado uma alíquota de 1 mL de cada diluição em frascos de vidros contendo meios de cultura apropriados para crescimento de bactérias. Os frascos foram mantidos em estufa a 27°C para crescimento das bactérias.

3.2.1.5 Atividade da redutase do nitrato

Ao final do experimento, foi realizado um ensaio *in vivo* da Redutase do Nitrato (RN; E.C. 1.6.6.1) nas raízes das plantas de seringueira, segundo os procedimentos metodológicos recomendados no ítem 3.2.2 deste trabalho.

3.2.1.6. Obtenção da matéria seca

Após o ensaio da RN ter sido concluído, as plantas de cada vaso foram divididas em caule mais pecíolo, raízes laterais, raiz principal e lâminas foliares e, essas partes, acondicionadas em sacos de papel e levados para estufa com circulação de ar a 70°C, até peso constante.

3.2.2: Experimento 2: Otimização das condições de ensaio *in vivo* da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira

3.2.2.1 Determinação do sítio de redução do nitrato

De acordo com as sugestões de Cairo, Oliveira e Delú Filho (1994), inicialmente as plantas foram separadas em caule,

raízes, lâminas foliares e pecíolos. Após fragmentação desses tecidos tomou-se 500 mg de parte da planta sendo transferidos para beckers de 20 mL contendo 5 mL de um meio formado por tampão fosfato de potássio 0.1 M pH 7.5, 100 mM de KNO_3 e 5% de n-propanol (v/v) e que foram levados, imediatamente, para infiltração à vácuo durante 1 minuto por 2 vezes. Logo após, os beakers foram transferidos para banho-maria a 30°C , com agitação no escuro. Aos 10 e 70 minutos foi retirada uma alíquota de 500 μL , adicionando-a a um meio de reação constituído por 1 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em HCl 1.5 N, 1 mL de N-2-naftil etilenidiamino di-HCl 0.02% (p/v) e 1.5 mL de água destilada. A quantidade de nitrito formada neste e nos demais ensaios foi quantificada colorimetricamente através de leituras espectrofotométricas do meio de reação realizadas a 540 nm e comparadas contra uma curva padrão para nitrito. A atividade da RN foi expressa em $\mu\text{mol de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$.

3.2.2.2 Otimização das condições de ensaio *in vivo* da RN

Após constatado que a redução *in vivo* do nitrato em plantas jovens de seringueira ocorre apenas no sistema radicular, a otimização das condições de ensaio foi realizada apenas naquela parte da planta, as quais foram otimizadas variando-se a concentração de nitrato no meio de incubação de 0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200 e 400 mM. Após obter a

concentração ideal de substrato, variou-se o pH do meio de 0.5 unidade a partir de 3.5 até 9.0. Posteriormente, a variação no tempo de reação foi estudada com a retirada de alíquotas nos tempos de 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos de permanência de incubação das amostras no banho-maria e, por último, foi determinada a temperatura ideal nos ensaios realizados a partir de 10, 20, 30 e 40°C.

3.2.2.3 Ritmo circadiano da atividade *in vivo* da RN

Finalmente, quando as condições de ensaio já haviam sido otimizadas, foi realizado um acompanhamento do ritmo circadiano da atividade da RN nos seguintes horários solares: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 h. Esse ensaio foi realizado igualmente nas folhas e raízes para se verificar uma possível alteração no sítio de redução do nitrato na planta de seringueira ao longo do dia.

3.2.2.4 Atividade *in vitro* da RN

Foi realizado, também, o ensaio *in vitro* da RN. Pesou-se 1.0 g dos tecidos foliar e radicular, que foram macerados em um graal à temperatura de 4°C, em um volume de 4 mL de meio tamponante, contendo 100 mM de KH_2PO_4 , 2.5 mM de

cisteína e 0,5% de Triton X-100 e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos. Logo após, foram retiradas alíquotas de 200 μ L do extrato crú, que foi adicionado a um meio de incubação contendo tampão Tris HCl pH 7.5 e 100 mM de KNO_3 . Esse conjunto foi pré-incubado a 30°C durante 3 minutos em banho-maria, no escuro e sob agitação e, na sequência, foi adicionado 0,2 mM de NADH e novamente incubado durante 20 minutos, exceto para o branco que era levado para a água fervente. Ao final desse tempo, as amostras também foram transferidas para água fervente. Logo após, as amostras foram resfriadas a 30°C e adicionado a cada uma, inclusive no branco, 0.2 mL de acetato de zinco 0,5 M e 0,2 mL de metassulfato de fenazina (46 mg/L)), de acordo com a recomendação de Scholl, Harper e Hageman (1974), deixando reagir por 20 minutos, ao qual seguiu uma centrifugação a 1.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Então, 1 mL do sobrenadante era coletado e adicionado a 0,5 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em HCl 1,5 N, 0,5 mL de N-2-naftil etilenodiamino di-HCl 0.02% (p/v). Os resultados foram obtidos à semelhança para o ensaio *in vivo* anteriormente descrito.

3.2.3: Experimento 3: Enzimas de assimilação do amônio

A obtenção dos extratos e os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com os procedimentos usados no

Laboratório de Biologia Molecular do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA), em Sete Lagoas, Minas Gerais, como descrito a seguir.

3.2.3.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

O material vegetal utilizado era composto de raízes laterais previamente lavadas em água desmineralizada e lâminas foliares sem a nervura central, coletado às 8:00 h e imediatamente envolvido em uma gase e colocado em N₂ líquido. Os extratos brutos foram obtidos pela maceração de 1.0 g daqueles tecidos, seguida de uma centrifugação refrigerada a 14.000 rpm por 15 minutos. A temperatura de todos os equipamentos e soluções utilizadas durante a realização dos ensaios foi mantida a 4°C.

3.2.3.2 Extração e ensaio da sintetase da glutamina e da desidrogenase do glutamato

O extrato bruto enzimático foi obtido por homogeneização de tecido vegetal em 4 mL de um meio com a seguinte composição: tampão Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, 2 mM de Ditiotretitol (DTT), 1 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e 10% (p/v) de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após

centrifugação, o sobrenadante (EXTRATO 1) foi acondicionado em tubos de ensaio e mantidos em gelo.

Para o ensaio da Sintetase da Glutamina (GS; E.C. 6.3.1.2), a quantidade de 300 μL do EXTRATO 1 foi adicionada a 700 μL de um meio contendo tampão Tris-HCl 100 mM pH 7.5, 10 mM de 2-mercaptoetanol, 40 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de NH_2OHCl , 10 mM de ATP, 50 mM de glutamato, incubando-se a mistura durante 30 minutos a 30°C. A reação foi paralizada pela adição de 1.0 mL de FeCl_3 0.37 M. Após a centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos, o quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) (Ratajczack, Ratajczack e Mazurowa, 1981) produzido, foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{moles GHA} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{min}^{-1}$.

O ensaio da Desidrogenase do Glutmato (GDH; E.C. 1.4.1.3) foi realizado tomando-se um volume de 50 μl do EXTRATO 1 para as amostras, sendo que para as folhas o EXTRATO 1 foi previamente diluído 5 vezes no tampão de extração. Esse volume foi adicionado a um meio contendo tampão Tris-HCl 100 mM pH 7.8, 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM de 2-oxoglutarato, 4 mM de CaCl_2 . Todo esse conjunto foi pré-incubado por 3 minutos a 25°C e, na sequência, foi adicionado 0.1 mM de NADH e procedeu-se o monitoramento da oxidação do poder redutor durante 10 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{moles GLU} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.3.3 Extração e ensaio da sintase do glutamato dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) e dependente do NADH (NADH-GOGAT)

Esta enzima foi extraída pela maceração dos tecidos vegetais em um meio composto de 4 mL de tampão fosfato 0.5 M pH 7.5, 2 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 10% de PVPP (p/v) e 1 mM de ácido eilenodiaminotetraacético (EDTA). Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de ensaio mantidos em gelo (Extrato cru). Para o ensaio da Fd-GOGAT, a quantidade de 300 μ L do extrato cru foi adicionado a 900 μ L de um meio contendo tampão fosfato pH 7.5 0.5 M, 15 mM de glutamina, 15 mM de 2-oxoglutarato, água destilada e metil viologênio (2 mg/mL). A mistura foi incubada por 2 minutos a 30°C e a reação foi iniciada com a adição 300 μ L da seguinte mistura: 16 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ + 16 mg de NaHCO_3 por mL de água destilada. A reação foi paralizada por imersão do tubo em água a 90°C por 2 minutos, seguida de imediata agitação em vortex até o desaparecimento da cor azul e posterior resfriamento em gelo fundente, antes da centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos, retirando-se uma alíquota de 1 mL de cada amostra que foi aplicada em coluna DOWEX 1 x 8X na forma acética. Após lavagem da coluna com 15 mL de água bidestilada, foram utilizados 7 mL de ácido acético 300 mM para eluir o GLU que ficara retido à coluna, sendo este volume coletado em tubos de vidro com tampa rosqueável, do qual foi retirado 1 mL para reação colorimétrica

para determinação do aminoácido pelo método descrito por Yemm e Cocking (1955).

Para o ensaio da NADH-GOGAT, 100 μL do extrato cru obtido de raízes foi adicionado a 800 μL de um meio contendo tampão fosfato pH 7,5 0,5 M, 15 mM de glutamina, 15 mM de 2-oxoglutarato, 10 mM KCl e 20 mM de 2- β -mercaptoetanol. Todo esse conjunto foi pré-incubado por 3 minutos a 25°C e, na sequência, foi adicionado 0,1 mM de NADH, seguido do monitoramento da oxidação do poder redutor durante 10 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{moles GLU.g}^{-1}\text{MF. min}^{-1}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1: Experimento 1: Efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio de cultivo sobre a produção, o particionamento de matéria seca e atividade radicular da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira

4.1.1. Produção e particionamento de matéria seca, crescimento em altura e diâmetro

Analisando a Figura 1, nota-se que houve um estímulo na produção de matéria seca da parte aérea de plantas jovens de seringueira com o aumento da concentração de N-nitrato no meio de cultivo até 8 mM, proporcionando, inclusive, produções significativamente diferentes entre as concentrações de nitrato estudados, exceto entre 8 e 12 mM. Entretanto, quando as plantas foram cultivadas em 16 mM de N-nitrato houve drástica redução na produção de matéria seca, atingindo valores entre os obtidos para os níveis 1 e 2 mM. Esse padrão de comportamento apresentado pela seringueira está de acordo com os de outras

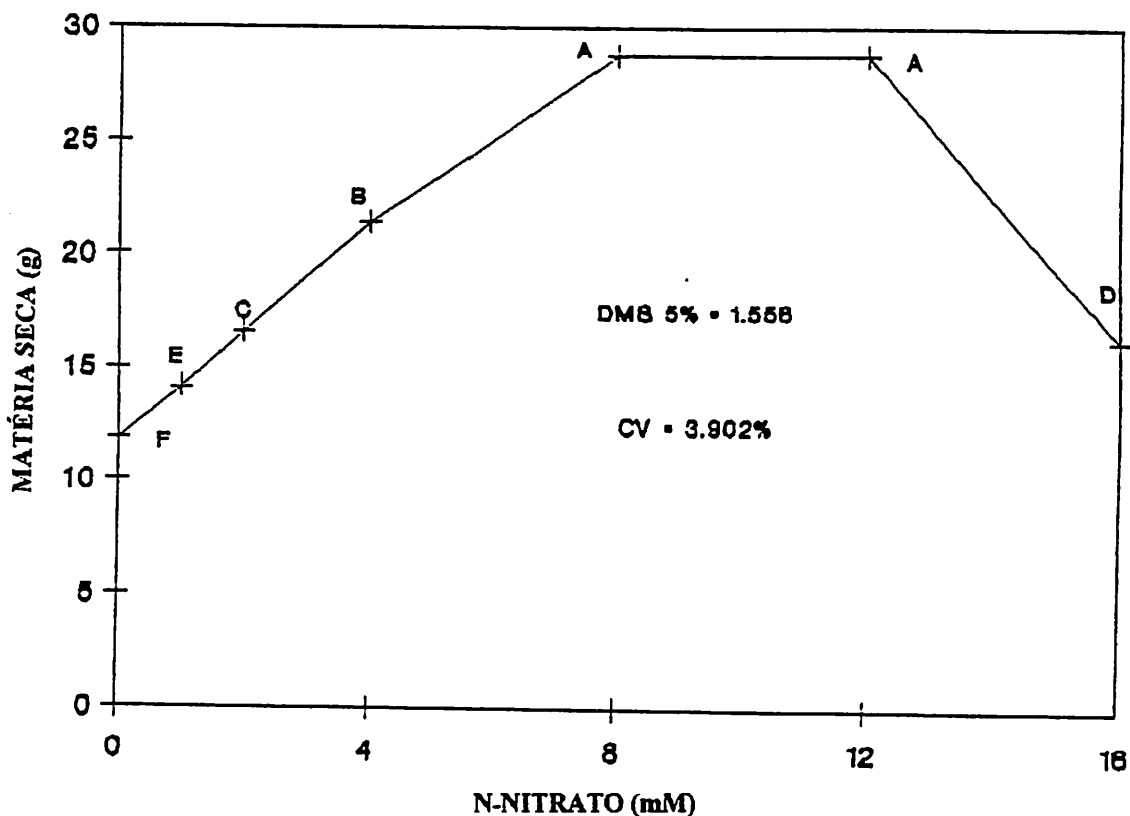


Figura 1: Produção de matéria seca da parte aérea (P.A.) de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey a 5%).

espécies, como feijão (Guazzelli, 1988) e milho (Chan e MacKenzie, 1972).

Em relação ao sistema radicular, verifica-se pela análise da Figura 2, que houve uma tendência de maior produção de matéria seca na concentração de 4 mM de N-nitrato, embora a produção tenha sido estatisticamente igual às concentrações 1 e 2, e nas concentrações superiores e inferiores a essa a influência do ânion foi mais discreta. O efeito prejudicial dos altas concentrações de N-nitrato sobre a produção de matéria seca do sistema radicular foi maior nas raízes laterais do que na raiz principal, como pode ser observado no Quadro 1.

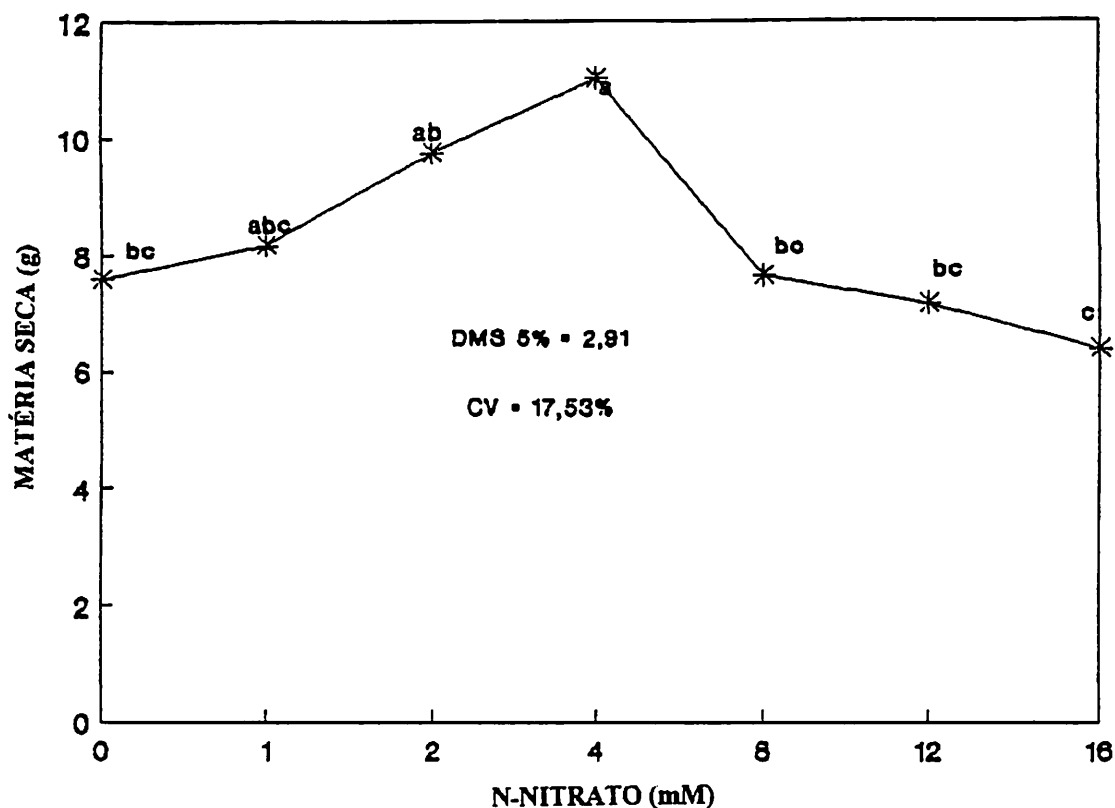


Figura 2: Produção de matéria seca do sistema radicular (S.R.) de plantas de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey a 5%).

A relação entre a matéria seca da parte aérea e a do sistema radicular (PA/SR) também foi afetada significativamente pelas concentrações de N-nitrato (Figura 3). Entretanto, a variação na relação PA/SR foi estatisticamente igual entre as concentrações de 0 a 4, 1, 2, 4 e 16 e entre 8 e 12 mM de $N-NO_3^-$. Analisando o Quadro 2, percebe-se que os efeitos do N-nitrato, estimulando ou inibindo a produção de matéria seca foram mais intensos sobre a parte aérea do que no sistema radicular.

Desde o trabalho pioneiro de Crist e Stout (1929), onde os autores trabalharam com diversas espécies herbáceas, sabe-se que a raiz cresce mais em relação a parte aérea quando

Quadro 1: Efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio de cultivo sobre a produção de matéria seca da raiz principal e de raízes laterais em plantas jovens de seringueira (média de 5 repetições).

| Concentrações de N-NO_3^- mM | MATÉRIA SECA | |
|---|-----------------------|---------------------|
| | RAIZ PRINCIPAL (g) | RAIZ LATERAL (g) |
| 0 | 6,5 (72) | 1,1 (54) |
| 1 | 6,8 (75) | 1,4 (70) |
| 2 | 7,9 (88) | 1,8 (89) |
| 4 | 9,0 (100) | 2,0 (100) |
| 8 | 6,4 (72) | 1,2 (58) |
| 12 | 6,0 (67) | 1,1 (54) |
| 16 | 5,6 (61) | 0,8 (38) |

OBS: Os números entre parênteses indicam a produção de matéria seca, expressa em porcentagem em relação ao máximo.

as plantas são cultivadas sob baixa disponibilidade de nutrientes. Resultados semelhantes foram obtidos por Guazzelli (1988) para três cultivares de feijão e por Oliveira et al. (1989) para rabanete, cultivados em diferentes concentrações de N-NO_3^- . De acordo com Wareing e Patrick (1975), o N e P são os nutrientes que mais afetam a relação PA/SR, havendo, entretanto, respostas diferenciadas entre espécies e, em alguns casos, até mesmo entre cultivares (Kuiper, 1983). Por exemplo, no trabalho desenvolvido por Guazzelli (1988) com três cultivares de feijão

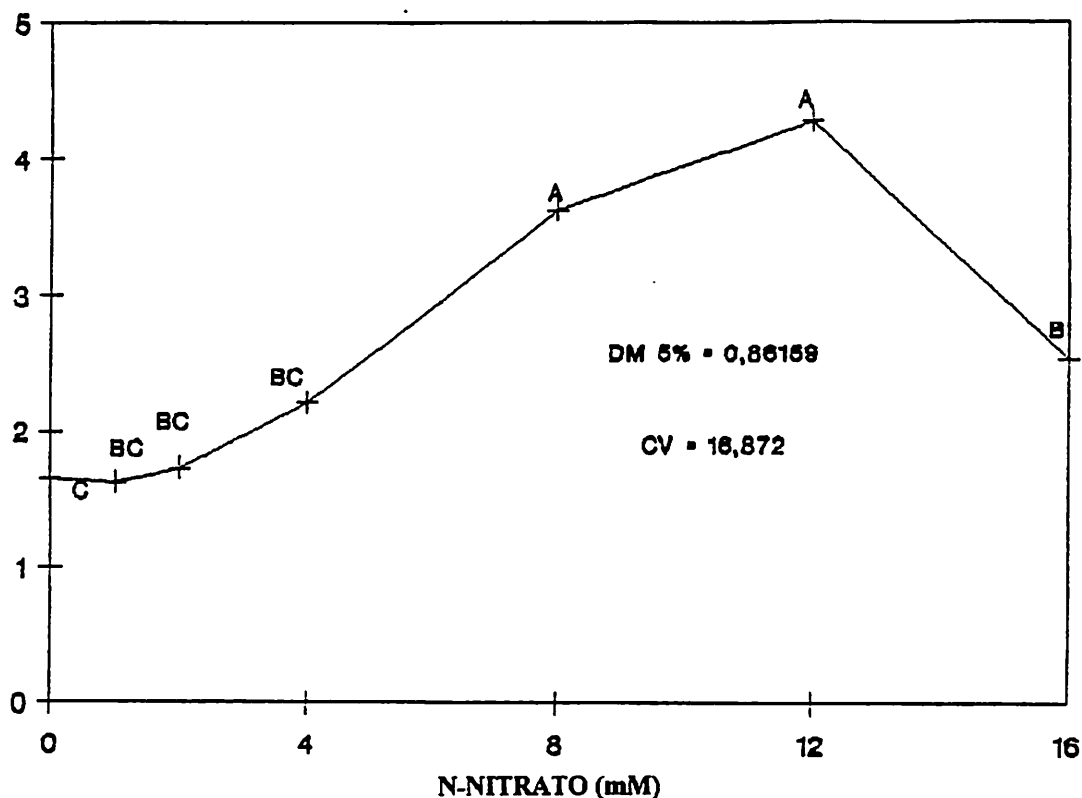


Figura 3: Relação entre a produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey a 5%).

cultivadas em diferentes concentrações de nitrato, observa-se que, de maneira geral, não houve grandes diferenças na variação da relação PA/SR e que as maiores tendências de diferenciação foram observadas apenas na ausência do nitrato externo. Assim, o baixo fornecimento de N, tanto para o feijão como para a seringueira, parece favorecer o particionamento de matéria seca para o sistema radicular. De maneira geral, esse tipo de comportamento pode ser verificado também quando as plantas são cultivadas sob outros estresses, como evidenciam Cascardo (1991) e Cairo (1992) para estresse hídrico e Pelacani (1993) para

Quadro 2: Efeito de diferentes concentrações de nitrato no meio de cultivo sobre a produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular.

| Concentrações de N-NO_3^- mM | MATÉRIA SECA | |
|---|--------------------|--------------------------|
| | PARTE AÉREA (g) | SISTEMA RADICULAR (g) |
| 0 | 11,6 (39) | 7,6 (69) |
| 1 | 13,6 (46) | 8,2 (74) |
| 2 | 17,7 (60) | 9,7 (88) |
| 4 | 21,3 (72) | 11,0 (100) |
| 8 | 27,9 (94) | 7,6 (69) |
| 12 | 29,5 (100) | 7,1 (65) |
| 16 | 16,0 (54) | 6,3 (57) |

OBS: Os números entre parênteses indicam produção de matéria seca, expressa em porcentagem em relação o máximo

estresse gasoso. Por outro lado, a baixa intensidade de R.F.A. parece favorecer a distribuição de matéria seca para a P.A. em detrimento do S.R., como reportou Naves (1993) para três espécies florestais. Entretanto, acredita-se que a diferença na distribuição de matéria seca entre PA/SR nas plantas de seringueira foi amenizada em função da baixa intensidade de R.F.A. na sala-de-crescimento.

Outro fato que chamou a atenção durante o período experimental foi que as plantas apresentarem crescimento em altura (Figura 4) e diâmetro (Figura 5) bastante semelhantes,

independente da concentração de nitrato a que estavam submetidas. A análise estatística dos dados ao final do experimento, revelou que não houve influência das concentrações de N-nitrato sobre esses parâmetros biométricos. Isto pode ter como uma das prováveis causas o visível estiolamento sofrido pelas plantas de todos os tratamentos quando comparadas com outras plantas de mesma idade e mantidas em casa-de-vegetação, em função da baixa intensidade de R.F.A. a que as plantas estavam expostas ($300 \text{ mmol RFA. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Porém, apenas esse fato não foi considerado suficiente para explicar tal crescimento das plantas, sobretudo nas concentrações 0 e 1 mM de N-NO_3^- . Foi investigado então, a possibilidade de contaminação das soluções nutritivas utilizadas com N, através da análise da água deionizada empregada no preparo das mesmas e também dos sais utilizados. Analisando amostras de água deionizadas retiradas diretamente no deionizador e das soluções nutritivas ficou constatado que a água e os sais não estavam contaminados. Averigou-se se havia a presença de bactérias diazotróficas no sistema radicular das plantas cultivadas. Nesse ensaio, ficou constatado existirem 3 espécies de bactérias diazotróficas (*Azospirillum braziliensis*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*) associadas as raízes de seringueira. Todavia, por problemas metodológicos, não foi possível determinar a real contribuição dessas bactérias para a manutenção do sistema. Analisando o Quadro 3, especificamente na linha referente à concentração zero de N-NO_3^- , verifica-se que houve um acúmulo de N nas plantas de seringueira acima do que seria possível (44,32

mg), caso não houvesse a fixação do N atmosférico, mesmo considerando-se que todo N das sementes tenha sido translocado para a planta. Daí em diante, devido ao fornecimento semanal de nitrato nas demais concentrações, esse raciocínio não pode ser seguido. Por outro lado, mesmo considerando que aqueles microrganismos estavam fixando nitrogênio atmosférico, a quantidade de N fixada era baixa, já que as plantas cultivadas até 4 mM apresentavam claros sinais de deficiência do nutriente (Figura 6). De acordo com Shorrocks (1979), o nível ideal de N nas folhas de seringueira é de 2,9 a 3,5%.

Durante o experimento, através de observações visuais e contagem do número de folhas por fluxo de crescimento foi verificado que o número de folhas no momento de cada fluxo era praticamente o mesmo, independente do tratamento. Entretanto, com o transcorrer da fase de maturação das folhas, as plantas cultivadas nas concentrações inferiores a 8 mM de nitrato descartavam algumas folhas, como resultado de senescência prematura. O número de folhas por fluxo de crescimento, ao final do experimento, variou entre o mínimo de 3 (concentração 0 mM) e o máximo de 16 folhas (concentrações 8 e 12 mM). Apesar da redução no número de folhas por fluxo de crescimento, o nitrato não influenciou o número de fluxos de crescimento por plantas, atingindo na média, 4 fluxos.

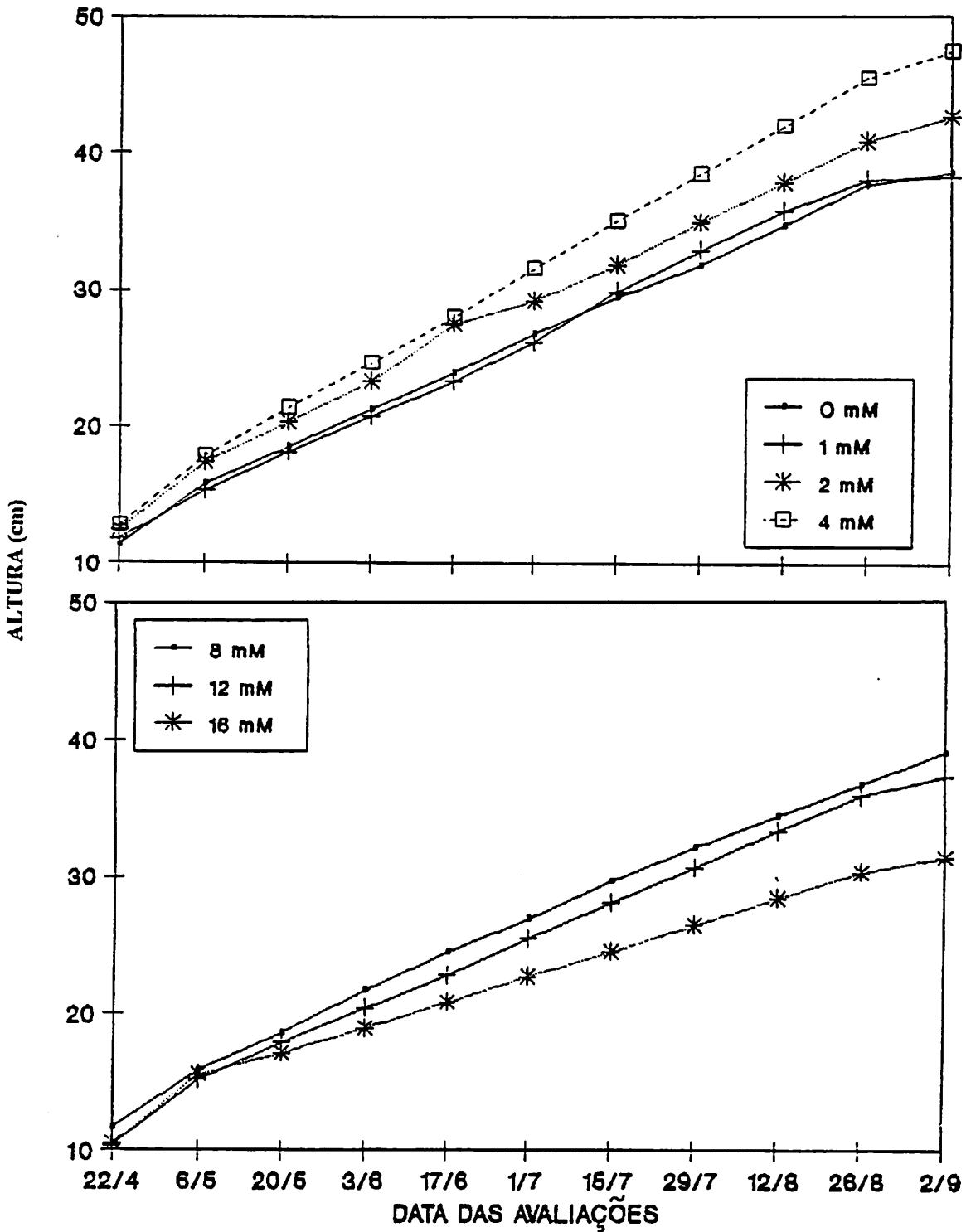


Figura 4: Crescimento em altura de plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato.

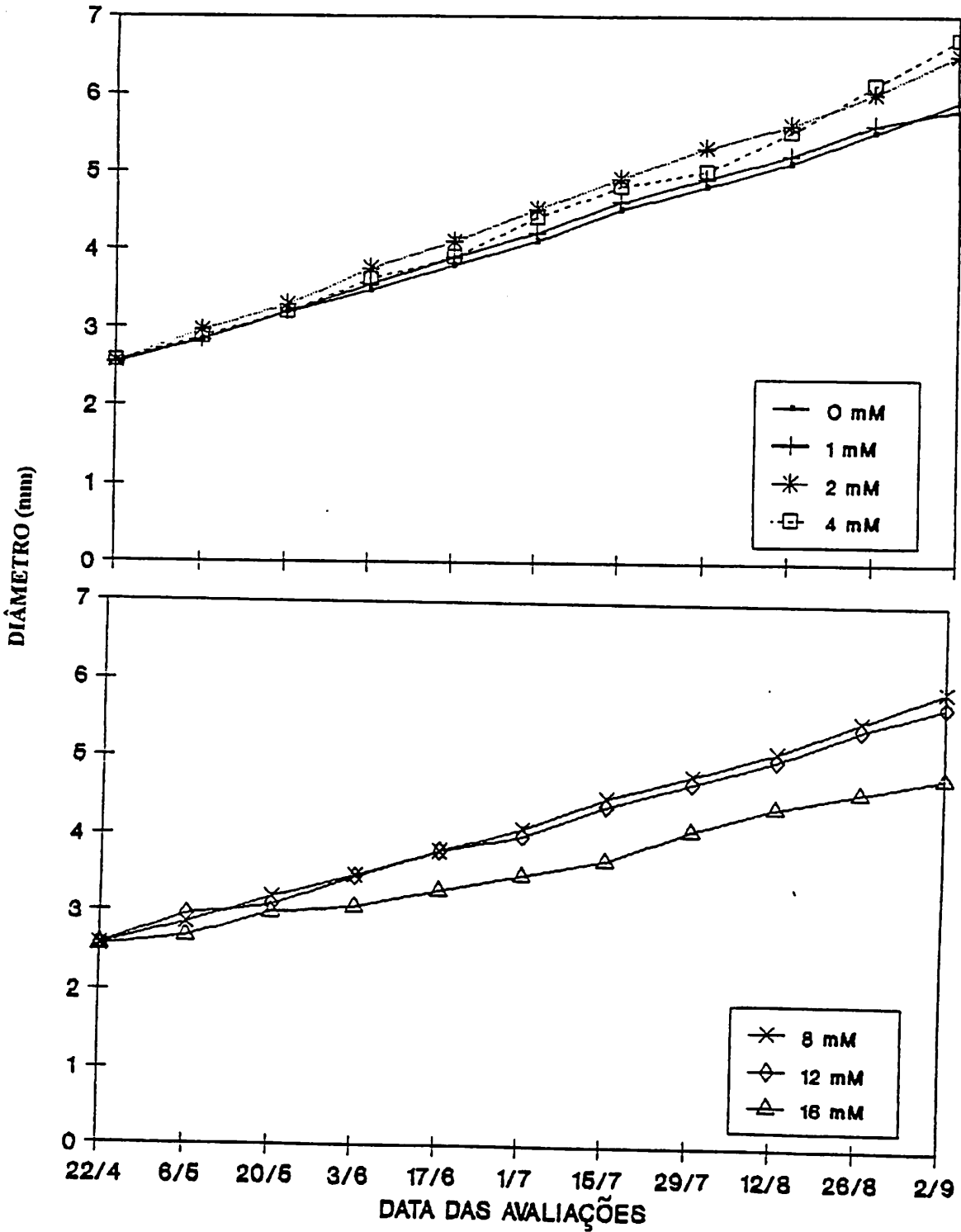


Figura 5: Crescimento em diâmetro de plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de nitrato.

Quadro 3: Acúmulo de N em plantas jovens de seringueira ao final do período experimental

| Concentração de N-NO_3^- | Fontes de nitrogênio (mg) | | | N acumulado nas plantas (mg) |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------|--------|------------------------------------|
| | Sementes | Sol. Nutritiva(*) | Total | |
| 0 | 104,4 | 0 | 104,4 | 148,7 |
| 1 | 104,4 | 354,2 | 458,6 | 183,6 |
| 2 | 104,4 | 708,4 | 812,8 | 260,7 |
| 4 | 104,4 | 1416,8 | 1521,2 | 341,8 |
| 8 | 104,4 | 2833,6 | 2938,0 | 605,0 |
| 12 | 104,4 | 4250,4 | 4354,8 | 695,9 |
| 16 | 104,4 | 5667,2 | 5771,6 | 447,5 |

(*): Quantidade de N-NO_3^- fornecida durante todo o período experimental.

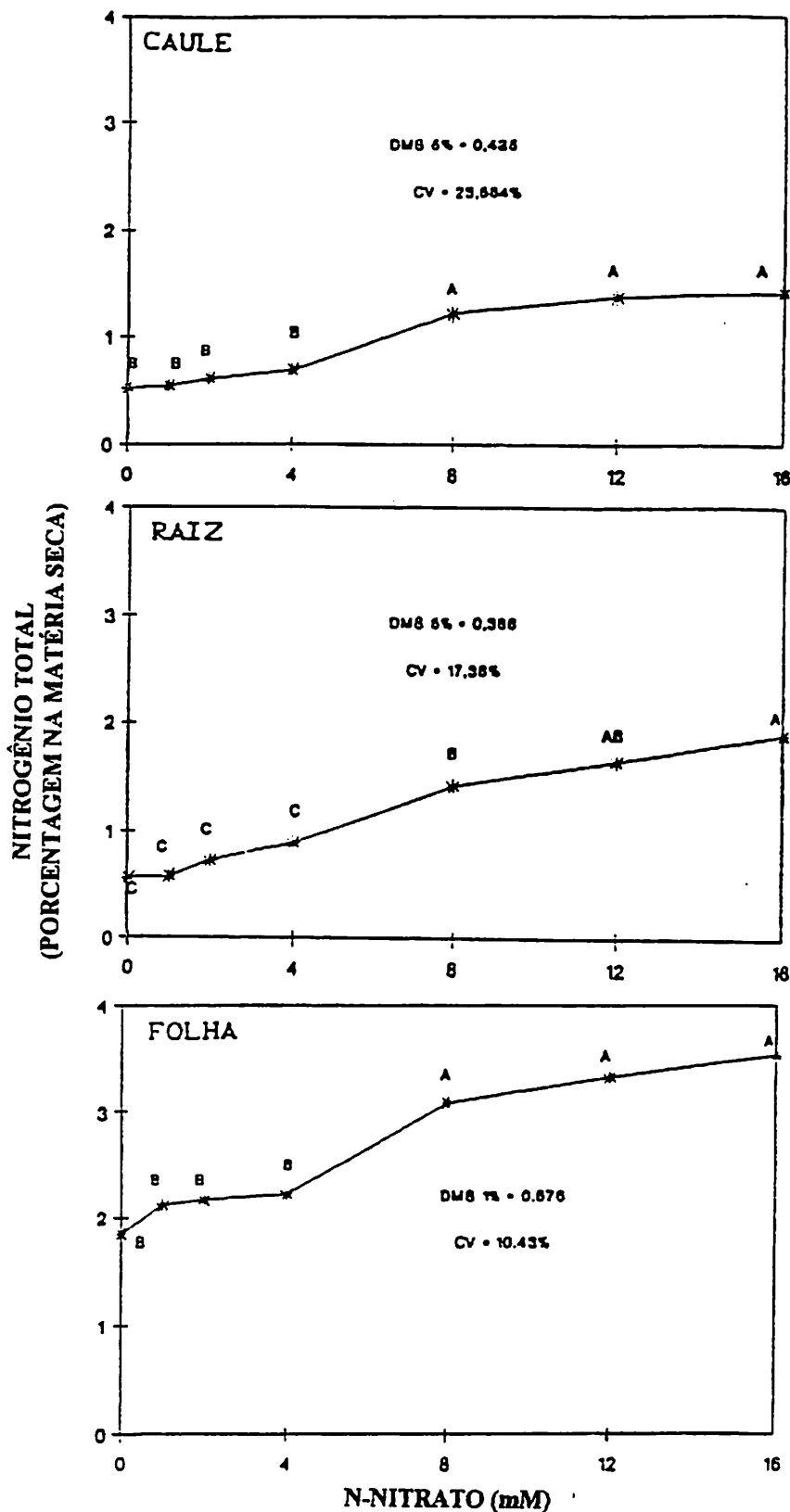


Figura 6: Concentração de nitrogênio total em caule, raízes e folhas de plantas jovens de seringueira em função da concentração de nitrato no meio de cultivo. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey).

4.1.2 Atividade radicular da redutase do nitrato

Observa-se na Figura 7, que a atividade da RN em plantas jovens de seringueira foi estimulada positivamente pelo aumento na concentração de N-nitrato no meio de cultivo até 12 mM, sendo reduzida a seguir na concentração de 16 mM. Essa queda pode ser devido ao acúmulo nas raízes de amônio ou outros compostos nitrogenados resultantes da absorção do nitrato, que podem inibir a síntese e/ou a atividade da RN (Lee e Stewart, 1978), já que o amônio demanda grande disponibilidade de carboidratos para sua assimilação e consequente prevenção contra intoxicação (Givan, 1979). Possivelmente, pelas condições de cultivo das plantas, particularmente com relação à baixa radiação fotossinteticamente ativa a que as plantas estavam submetidas, a produção líquida de compostos de carbono em quantidades suficientes para promover uma assimilação satisfatória do amônio tenha sido prejudicada, provocando acúmulo desse cátion no sistema radicular. Além disso, deve ser considerado também que certos nutrientes minerais podem competir com o nitrato pelos sítios de absorção, como o K^+ , por exemplo. Por outro lado, o efeito positivo do nitrato sobre a atividade da RN é bastante relatado na literatura (Gebauer, Melzer e Rehder, 1984; Lancelaan e Troelstra, 1992). A síntese e atividade da RN são induzidas na presença de nitrato (Beevers e Hageman, 1969; Oaks et al., 1980; Somers et al., 1983). Assim, o aumento na disponibilidade de nitrato para as plantas, num primeiro momento, aumenta a síntese da proteína RN que por sua

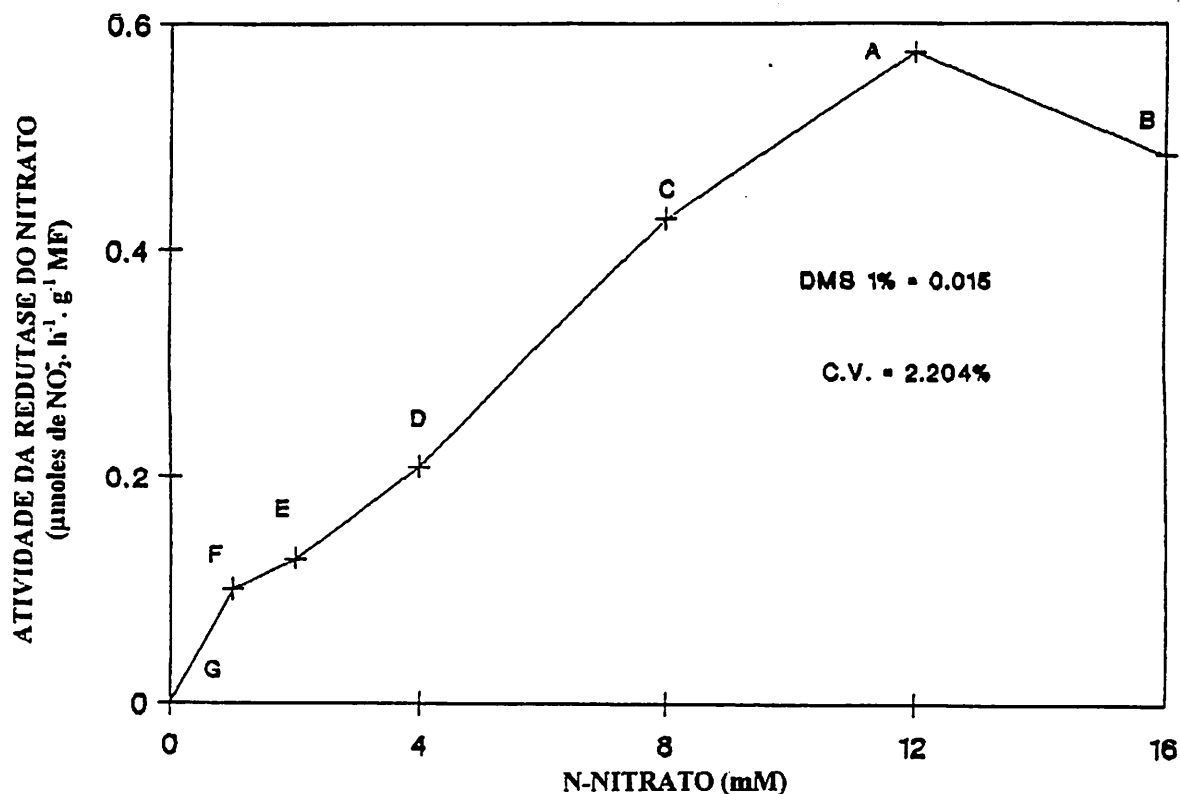


Figura 7: Atividade radicular da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes concentrações de N-nitrato (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey).

vez tem sua atividade estimulada pelo substrato, resultando, ao final do processo de assimilação, alta disponibilidade de aminoácidos para a síntese dessa e de outras proteínas, resultando em maior crescimento das plantas. Isso de fato foi verificado nas plantas de seringueira nas concentrações 8 e 12 mM de N-nitrato (Quadro 2).

4.1.3 Influência das concentrações de N-NO_3^- sobre o pH do meio de cultivo

Analisando a Figura 8, nota-se uma variação no pH final do substrato de cultivo (areia) das plantas nos diferentes níveis de nitrato estudados. Em comparação com o pH inicial do meio de cultivo (6.5) houve uma redução no pH final da areia, independente da concentração de N-nitrato presente no meio de cultivo. Essa queda, porém, foi mais acentuada nos níveis de 0 a 4 mM nitrato. Esses resultados são contrários aos observados normalmente na literatura, que indicam uma elevação do pH quando as plantas são cultivadas na presença de nitrato como fonte exclusiva de N (Elsieve e Ullrich, 1975; Elsieve e Ullrich, 1977). Geralmente, a nutrição amoniacal requer uma extrusão líquida de prótons como forma de regular o pH interno das células (Raven e Smith, 1980). Por outro lado, o nitrato pode ser armazenado mais facilmente no vacúolo, o que implica que nem todo nitrato absorvido tenha necessariamente que ser reduzido a amônio. Este fato pode levar a uma consequente manutenção do pH citoplasmático, uma vez que durante o processo de redução do nitrato a amônio é produzido também um OH^- para cada molécula de nitrato reduzida (Kirkby e Knight, 1977; Raven e Smith, 1976).

Em geral, a alcalinização do meio de cultivo está associada com a absorção e redução do nitrato nas plantas (Elsieve e Ullrich, 1977; Thibaud e Grignon, 1981). A aparente estequiometria de 1:1 entre efluxo de OH^- e absorção de nitrato tem sido citado como evidência para a alcalinização do meio de

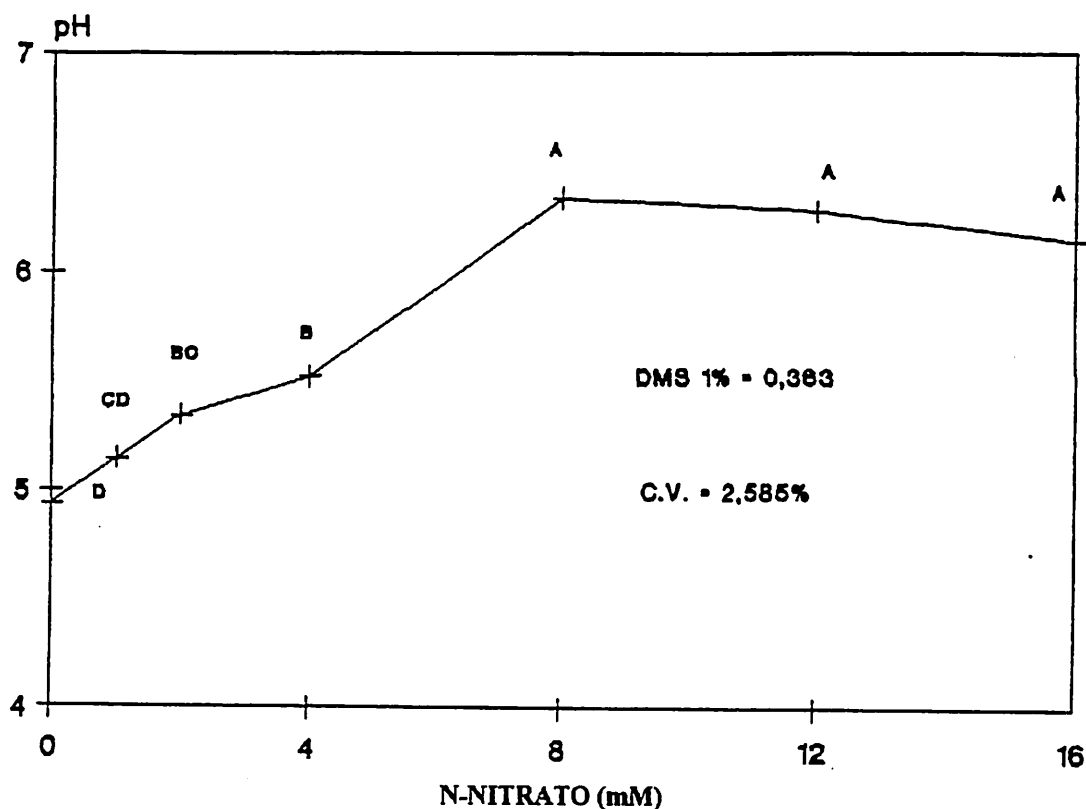


Figura 8: pH final do meio de cultivo dos vasos onde foram cultivadas as plantas de seringueira sob diferentes concentrações de N-nitrato. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey a 1%).

cultivo frente ao fornecimento exclusivo de nitrato. Todavia, em raízes danificadas de cevada (Deane-Drummond, 1982) e em células de *Chara corallina* (Deanne-Drummond, 1984) tem sido verificado a acidificação do meio durante a absorção nítrica. Eddy e Hopkins (1985) evidenciaram que o influxo de nitrato está correlacionado com o efluxo de próton na relação $1\text{NO}_3^-:2\text{H}^+$ e o balanço de cargas é mantido pelo K^+ . Nesse caso, parece haver um mecanismo de transporte simporte dos íons.

4.2: Experimento II: Otimização das condições de ensaio *in vivo* da enzima redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira

4.2.1 Localização do sítio de redução do nitrato em seringueira

Os ensaios enzimáticos *in vivo* realizados nos caules, pecíolos, lâminas foliares e raízes de plantas jovens de seringueira apresentaram ausência de atividade da RN nos compartimentos da parte aérea, sendo que a redução do nitrato foi observada apenas no sistema radicular.

Alguns gêneros da família Ericaceae, como *Vaccinium* e *Rhododendron* reduzem o nitrato quase que totalmente nas raízes (Routley, 1972; Dirr, 1974). Trabalhando com *Pinus nigra*, Martin, Chemardin e Gadai (1981) encontraram resultados semelhantes. Em uma revisão realizada por Pate (1980), o autor verificou que em muitos casos, a presença de N-orgânico na composição da seiva do xilema, levou à crença geral de que as plantas lenhosas reduzem o nitrato nas raízes. Posteriormente, diversos trabalhos evidenciaram a existência de um grande número de espécies lenhosas que reduzem o nitrato na parte aérea. Assim, a maioria das espécies da família Ericaceae, estudadas por Routley (1972), revelaram que as folhas quando colocadas em presença de nitrato apresentavam uma rápida síntese da proteína RN. Resultados semelhantes foram obtidos por Pizelle e Thiery (1974) em plantas de *Alnus glutinosa* e por Stewart e Orebamjo (1978) em *Erythrina senegalensis*. Em um estudo comparativo sobre

a atividade *in vivo* da RN em 500 espécies florestais, Smirnoff, Todd e Stewar (1984) verificaram que 73% dessas espécies apresentavam atividade foliar da RN, evidenciando que a redução do nitrato nas folhas é de ocorrência comum em espécies lenhosas.

Do ponto de vista de adaptação ecológica, a redução do nitrato no sistema radicular pode representar uma vantagem, pois sendo a seringueira uma planta caducifólia, na época de reenfolhamento, o seu sistema de redução do nitrato estaria intacto para exercer tal função, não ficando dependente da retranslocação de N-orgânico de outras partes da planta.

4.2.2 Otimização das condições de ensaio *in vivo* da redutase do nitrato

Analisando a Figura 9, pode se constatar que a atividade da RN aumentou até 100 mM de NO_3^- no meio de incubação. A partir daí, houve certa estabilização da atividade da RN, atingindo o máximo a 400 mM, mas que foi estatisticamente igual a 100 e 200 mM. O aumento na atividade da enzima ou na concentração da proteína RN em função da adição de NO_3^- tem sido relatado por outros autores (Beevers e Hageman, 1969; Aslan e Oaks, 1976; Somers et al., 1983).

Contrariamente ao demonstrado por diversos autores, não foi observado uma queda na atividade da enzima dentro dos limites de concentração de substrato estudados. Para café (Meguro e Magalhães, 1982), cana-de-açúcar (Oliveira e

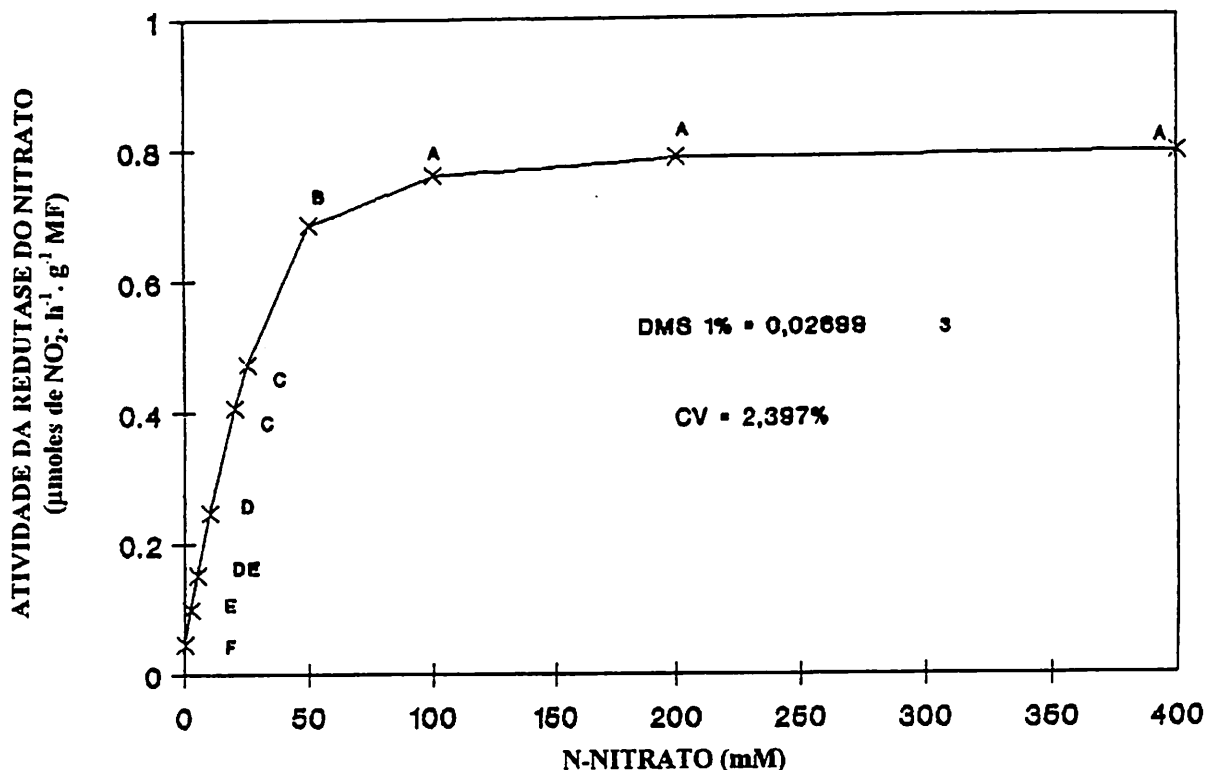


Figura 9: Efeito da concentração de substrato (NO_3^-) sobre a atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey).

Magalhães, 1989), trigo, cevada, milho, *Gomphrena* e *Pisum avenense* (Jones e Sheard, 1976), concentrações de nitrato superiores a 50 mM no meio de incubação induziram uma queda na atividade da enzima, enquanto que em *Curcubita pepo* (Jones e Sheard, 1976) e *D. barbatum* (Pereira Neto, 1992), a atividade da RN foi afetada negativamente por concentrações salinas superiores a 100 mM de NO_3^- . Como essa queda não foi verificada para a seringueira, possivelmente essa espécie deve apresentar algum mecanismo que lhe confira certa tolerância a altas concentrações de N-nitrato, talvez através da

compartimentalização do ânion no vacúolo celular (Merlo et al., 1994) ou saturação dos sítios a nível de membrana plasmática da células das raízes.

A ausência de NO_3^- no meio de incubação está relacionada a níveis de atividades enzimáticas próximas a zero. Considerando que a RN é uma enzima cuja síntese e atividade são induzidas pelo substrato, como sugerem Beevers e Hageman (1969), conclui-se que a concentração de nitrato no "pool" metabólico não foi suficiente para promover a ativação da enzima (Hallmark e Huffaker, 1978). Comportamento semelhante foi observado para outras espécies por Oliveira e Magalhães (1989), Pereira-Neto (1992) e Queiroz et al. (1993).

Os resultados apresentados na Figura 10, mostram que as maiores atividades da RN foram alcançadas na faixa de pH entre 7.0 e 7.5, possibilitando o ensaio da enzima em quaisquer valores intermediários dentro dessa faixa, não havendo diferença significativa na redução do nitrato *in vivo* dentro daqueles limites. Para as análises subseqüentes foi adotado o pH 7.5 ± 0.1 . Assim como para a seringueira, a cana-de-açúcar (Oliveira e Magalhães, 1989), o café (Queiroz et al., 1993; Meguro e Magalhães, 1982) e *Eichhornia crassipes* (Wignarajah, 1990) apresentam padrões de comportamento semelhantes em relação ao pH do meio de incubação. Entretanto, ensaios realizados nas folhas de mandioca (Pereira e Splittstoesser, 1986) e soja (Streeter e Bosler, 1972) apontam para um pH ótimo de 6,5, enquanto que a espécie *Picea abies* (Peuke e Tischner, 1991), o pH ótimo foi de 6,5 para as raízes e 5,5 para as folhas.

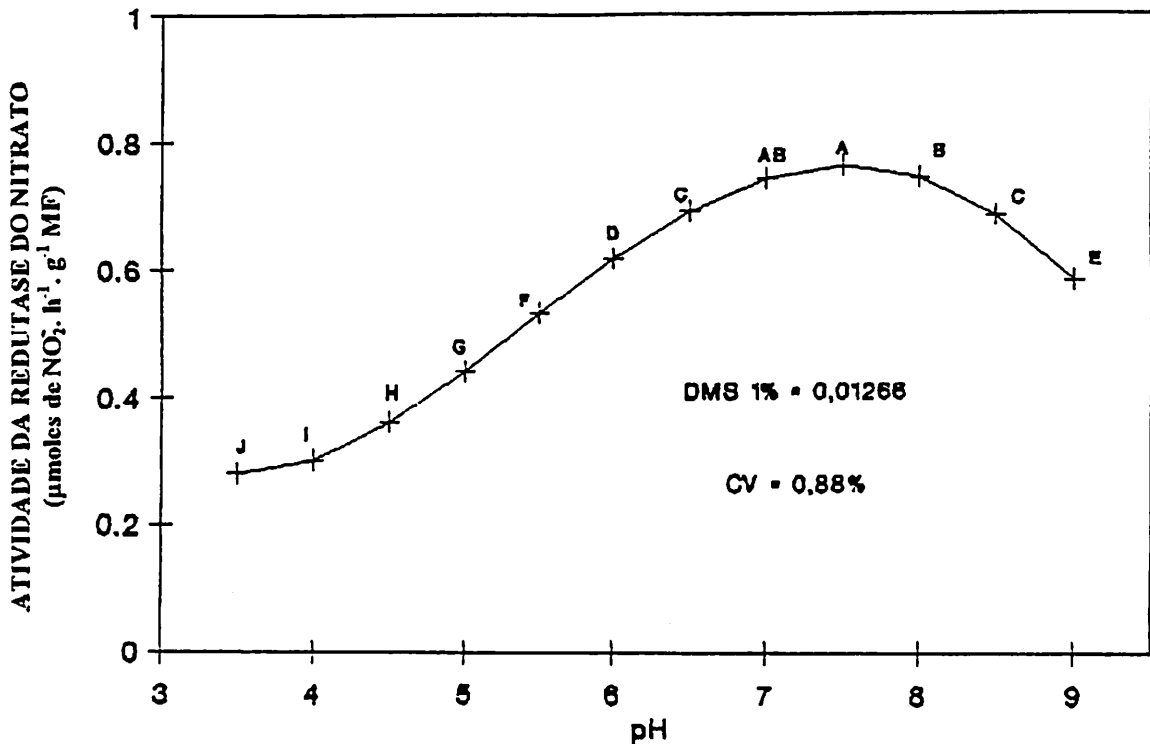


Figura 10: Efeito do pH no meio de incubação sobre a atividade *in vivo* da RN em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey).

Durante os ensaios *in vivo*, tem sido sugerido que o pH externo tem pouco efeito sobre o pH citoplasmático (Raven e Smith, 1980) e que sua maior influência seria sobre a liberação de nitrito pelas células vegetais, não afetando significativamente a atividade da enzima (Prakash e Naik, 1982).

A atividade da RN nas raízes de seringueira aumentou entre 10 e 30°C, caindo a seguir, com a elevação da temperatura do meio de incubação para 40°C (Figura 11). Por ser um processo metabólico dependente de energia, a redução na atividade da enzima em temperaturas inferiores ou superiores a 30°C, pode

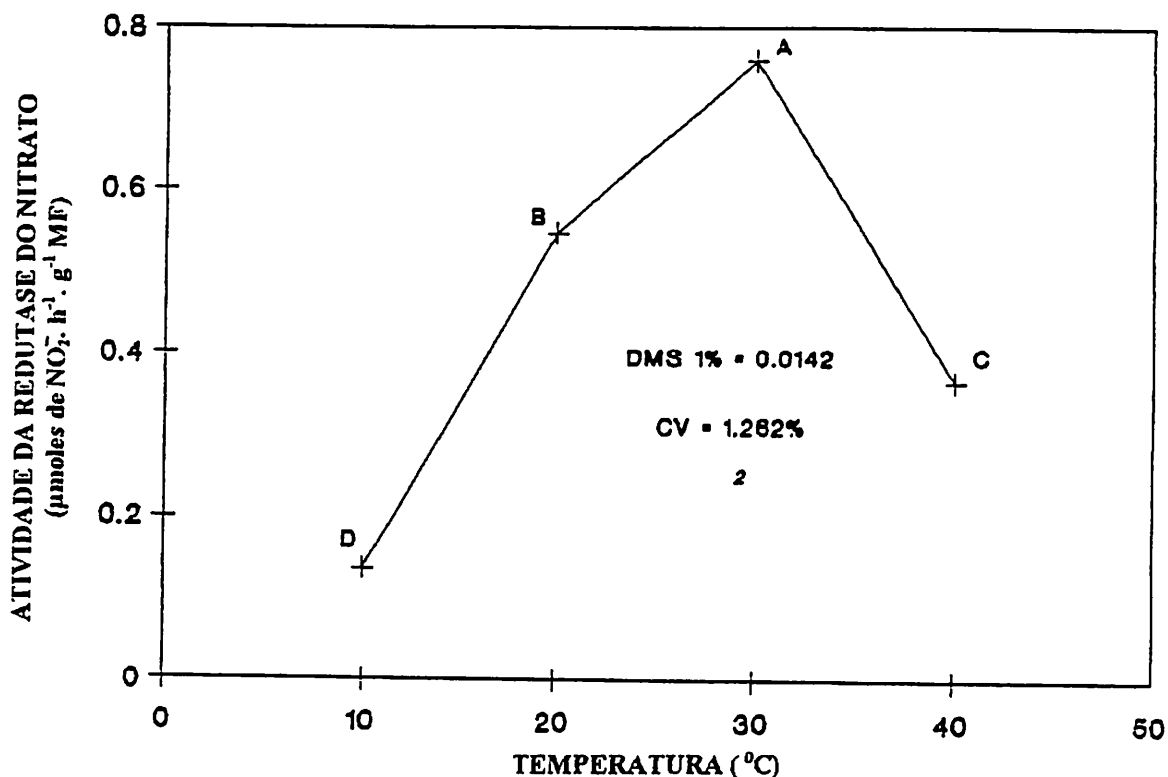


Figura 11: Efeito da temperatura sobre a atividade *in vivo* da RN em raízes de plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey a 1%).

estar relacionada com uma menor absorção de nitrato pela raízes, causada por alterações na permeabilidade da membrana plasmática (Hallmark e Huffaker, 1978).

Adicionalmente, em temperaturas elevadas, a queda na atividade enzimática pode estar relacionada com alterações físico-químicas na estabilidade da molécula, tornando-a inativa (Oaks, Stulen e Boesel, 1979). Para as espécies estudadas por Oliveira e Magalhães (1989), Queiroz et al. (1991), Meguro e Magalhães (1982) e Pereira-Neto (1992) também foram verificados padrões de comportamento semelhantes para a RN em relação a temperatura. A baixa atividade da RN em plantas de seringueira

para os ensaios *in vivo* realizados a 10°C sugere uma certa sensibilidade dessa espécie a condições de temperaturas baixas. Isso, de fato, tem sido observado através da paralização quase total do crescimento das plantas de seringueira que se encontram na área experimental do Departamento de Biologia da UFPA, durante os meses de junho a agosto.

Em função do aumento no tempo de incubação das amostras (Figura 12), nota-se um aumento expressivo e linear na atividade da RN até 60 minutos. A partir dos 60 minutos, os aumentos verificados foram abruptamente reduzidos. Assim, adotou-se o tempo de 60 minutos como ideal para maximizar a produção de nitrito pelas células. Segundo L'Vov e Safaraliev (1988), recomenda-se não estender os ensaios com a RN por mais de uma hora, em virtude de possíveis alterações causadas no citoplasma celular por condições de anaerobiose, embora para a seringueira parece não ser o caso, uma vez que a atividade da RN aumentou até 180 minutos de reação.

4.2.3 Ritmo Circadiano da Atividade da Redutase do Nitrato

Plantas jovens de seringueira apresentaram acentuado aumento na atividade da RN no sistema radicular nas primeiras horas do período luminoso (Figura 13), acompanhada de uma certa estabilidade na atividade enzimática, seguida de significativa queda durante o período da tarde. No intervalo entre 15:00 e 0:00 h foram observados os menores níveis de produção de nitrito *in vivo* pelas plantas. A partir daí, há um aumento nas taxas de

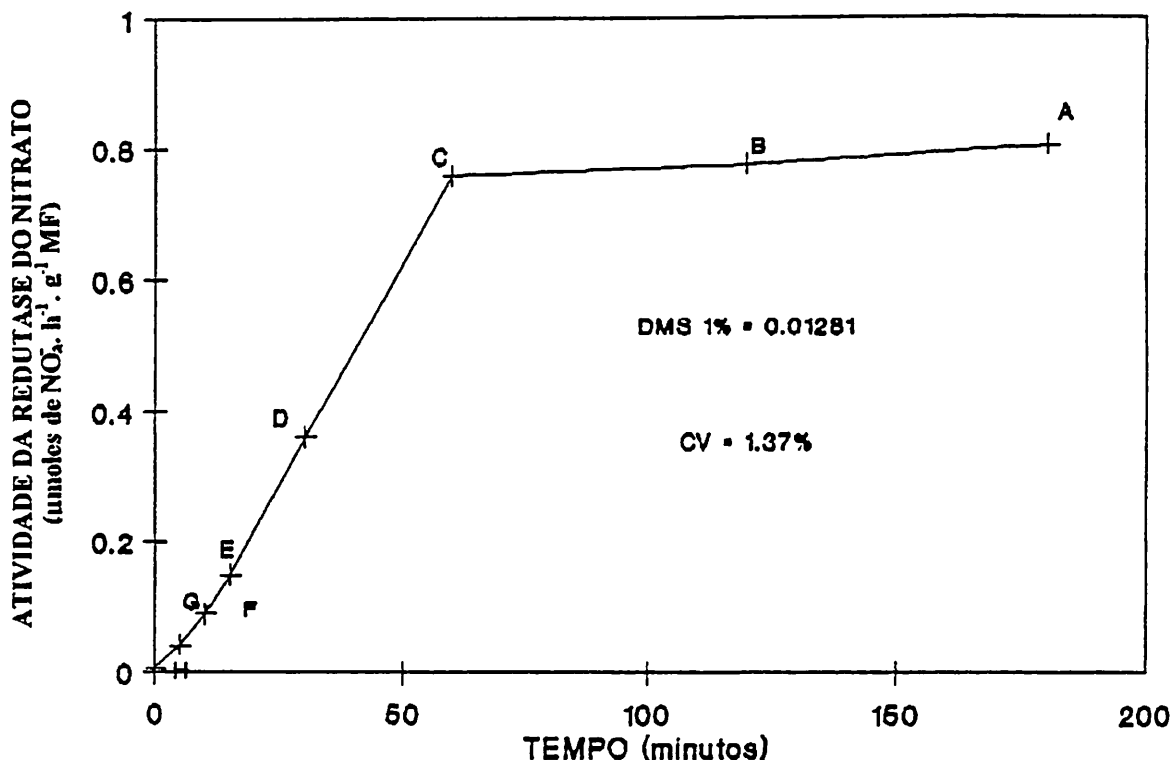


Figura 12: Efeito do tempo de reação sobre a atividade *in vivo* da RN em raízes de plantas jovens de seringueira. (Letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tuckey).

redução do nitrato, que se mantém até o início do período luminoso.

O padrão de atividade é semelhante aos ensaios realizados em café por Alves, Cordeiro e Rena (1985) e Cordeiro et al., 1984.

O baixo nível de atividade da RN verificado a partir das 15:00 hs pode ter sido consequência da retroinibição da enzima causada pelo acúmulo de amônio nas raízes, consequente da redução na translocação daquele cátion para a parte aérea provocada pela diminuição do fluxo transpiratório, decorrente do fechamento estomático apresentado por plantas jovens de

seringueira, como evidencia Cascardo (1991). Por outro lado, não se pode desconsiderar que a absorção de nitrato durante as primeiras horas do dia provoca uma redução na concentração daquele ânion presente na região da rizosfera, resultando em menores taxas de influxo do nitrato para a célula. Sendo a RN uma enzima induzida pela presença do substrato (Hageman e Hucklesby, 1971), a redução na absorção do nitrato provoca uma queda na atividade da enzima. Entretanto, os baixos níveis de atividade observados durante a noite parecem estar relacionados a uma drástica redução na absorção do nitrato durante esse período, chegando a níveis incapazes de promover uma ativação da enzima (Carelli e Fahl, 1991) ou que a redução do nitrato é limitada pela escassez de poder redutor, uma vez que a luz não parece ser um requerimento absoluto para que tal fato ocorra (Aslam, Huffaker e Rains, 1979; Aslam e Huffaker, 1982; Claussen, 1986). Por outro lado, a manutenção da atividade da RN, ainda que em baixos níveis, evidencia a existência de um "pool" não metabólico de nitrato, que seria liberado em circunstâncias nas quais os níveis daquele substrato seriam reduzidos no citoplasma da célula (Ferrari, Yoder e Filner 1973).

4.2.4 Atividade *in vitro* da redutase do nitrato

Nos ensaios enzimáticos realizados *in vitro* nas folhas e raízes de plantas jovens de seringueira, não se conseguiu atividade da enzima. Possivelmente por problemas relacionados com a estabilidade da enzima, uma vez que o meio de

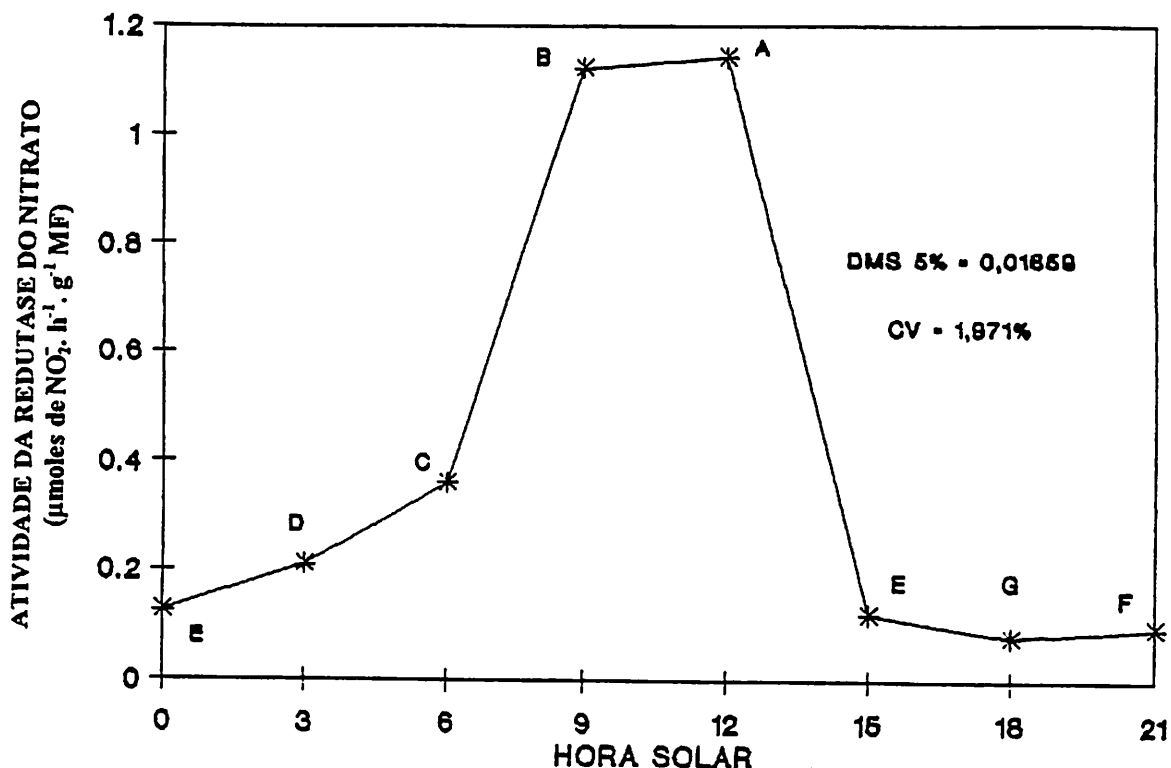


Figura 13: Ritmo circadiano da atividade da RN em plantas jovens de seringueira. (As letras comparam médias de 5 repetições pelo teste de Tukey).

reação apresentou a mesma intensidade de coloração, característica de atividade da RN, apenas para as amostras das raízes, resultante da produção de NO₂⁻ endógeno pela RN *in vivo*. Além disso, o ensaio *in vivo* realizado juntamente e nas mesmas amostras de material vegetal que o ensaio *in vitro* apresentou atividade da RN de 0,575 μmol de NO₂⁻ · h⁻¹ · g⁻¹ M.F nas raízes. Por outro lado, utilizou-se a mesma metodologia do ensaio *in vitro* em folhas de milho e crotalária, que apresentaram atividade da RN. Esses fatos reforçam a hipótese de perda da capacidade catalítica da RN, talvez durante o processo de extração. Sugere-se que novos estudos sejam realizados, principalmente

através de variações do meio extrator, a fim de elucidar o problema ora encontrado.

4.2.5 Análise comparativa da otimização das condições de ensaio da RN em diversas espécies vegetais

O objetivo deste item é realizar uma revisão bibliográfica comparativa sobre os principais fatores que afetam a atividade da RN em várias espécies vegetais.

Ressalta-se que os dados apresentados no Quadro 3 referem-se aos valores ótimos encontrados para os fatores estudados. Nos locais onde não foram plotados nenhum resultado é porque aquele fator não foi objetivo da otimização por parte do(s) autore(s).

Inicialmente, analisando a coluna referente a temperatura do meio de incubação, nota-se que 58.8% dos trabalhos apresentam temperaturas ótimas entre 30 e 35°C. Nesses trabalhos, temperaturas superiores a essa faixa provocaram queda na atividade enzimática. Outro fato interessante é que, a maioria das espécies que se enquadram nessa faixa são plantas que apresentam rota C_3 de fixação primária do carbono atmosférico, com exceção apenas da cultivar NA5635 de cana-de-açúcar (Oliveira e Magalhães, 1989). Os ensaios cujas espécies apresentaram temperaturas ótimas próximas ou superiores a 40°C são geralmente plantas C_4 . Observa-se, também, que a espécie *Cajanus cajan* apresenta valores contrastantes para a temperatura do meio de incubação em dois trabalhos realizados

distintamente (Chopra, 1983; Pereira-Neto, 1992).

A otimização da concentração do tampão utilizado no meio de incubação foi objeto de estudo de apenas 3 trabalhos. Os valores obtidos para mandioca, cevada e soja não permitem que se façam quaisquer inferências, pois trata-se de espécies com características bastante diferentes e os valores foram bastante diferenciados.

O pH do meio de incubação foi objeto de estudo de grande parte dos trabalhos. A grande maioria das espécies apresentam valores ótimos de pH na faixa entre 7.0 e 8.0. Entretanto, ensaios realizados nas folhas de mandioca (Pereira e Splittstoesser, 1986) e soja (Streeter e Bosler, 1972) apontam para pH ótimo de 6.5, enquanto que a espécie *Picea abies* (Peuke e Tischener, 1991), o pH ótimo foi de 6.5 para as raízes e 5.5 para as folhas. Apesar do pH citoplasmático estar próximo de 7.0-7.5, Raven e Smith (1980) sugeriram que ele é pouco influenciado pelo pH externo.

Para a concentração de substrato, praticamente 100% das espécies apresentam uma concentração ótima de nitrato no meio de incubação na faixa de 50-100 mM. Para esse fator, apenas a espécie *Cajanus cajan* apresentou como concentração ótima de nitrato 30 mM, ficando abaixo da faixa encontrada para o restante das espécies.

Do total de trabalhos pesquisados, seis apresentaram estudos sobre a otimização do tempo de reação. Desses, três indicam como tempo ideal 60 minutos de reação, enquanto os demais variam entre 150 e 180 minutos.

distintamente (Chopra, 1983; Pereira-Neto, 1992).

A otimização da concentração do tampão utilizado no meio de incubação foi objeto de estudo de apenas 3 trabalhos. Os valores obtidos para mandioca, cevada e soja não permitem que se façam quaisquer inferências, pois trata-se de espécies com características bastante diferentes e os valores foram bastante diferenciados.

O pH do meio de incubação foi objeto de estudo de grande parte dos trabalhos. A grande maioria das espécies apresentam valores ótimos de pH na faixa entre 7.0 e 8.0. Entretanto, ensaios realizados nas folhas de mandioca (Pereira e Splittstoesser, 1986) e soja (Streeter e Bosler, 1972) apontam para pH ótimo de 6.5, enquanto que a espécie *Picea abies* (Peuke e Tischener, 1991), o pH ótimo foi de 6.5 para as raízes e 5.5 para as folhas. Apesar do pH citoplasmático estar próximo de 7.0-7.5, Raven e Smith (1980) sugeriram que ele é pouco influenciado pelo pH externo.

Para a concentração de substrato, praticamente 100% das espécies apresentam uma concentração ótima de nitrato no meio de incubação na faixa de 50-100 mM. Para esse fator, apenas a espécie *Cajanus cajan* apresentou como concentração ótima de nitrato 30 mM, ficando abaixo da faixa encontrada para o restante das espécies.

Do total de trabalhos pesquisados, seis apresentaram estudos sobre a otimização do tempo de reação. Desses, três indicam como tempo ideal 60 minutos de reação, enquanto os demais variam entre 150 e 180 minutos.

Em relação ao tipo e concentração de álcool empregado, quatro trabalhos utilizaram o n-propanol a 1% e um trabalho utilizou isopropanol 5%. Possivelmente diferenças na atividade biológica do tipo de álcool não sejam significativas, sendo mais importante nesse caso a concentração na qual ele é empregado.

Pelo exposto anteriormente, sugere-se que para novos ensaios em espécies cuja assimilação primária do nitrato ainda não tenha sido investigada, um meio de incubação constituído por 50 a 100 mM de KNO_3 , KH_2PO_4 100 mM, pH 7.5, tempo de reação de 60 minutos e temperatura de 30°C para espécies C_3 e 40° para espécies C_4 .

QUADRO 4: Resultados ótimos obtidos para o ensaio *in vivo* da Redutase do Nitrato em diversas espécies vegetais.

| ESPÉCIE | TEMPERATURA (°C) | pH | TEMPO DE REAÇÃO (minutos) | KNO ₃ (mM) | ÁLCOOL (%) | PARTE DA PLANTA | TAMPÃO (M) | AUTOR(ES) |
|---|---|------------|---------------------------|-----------------------------------|--|--|------------|--------------------------------|
| V. radiata C. cajan V. senensis H. annus S. indica S. vulgare Z. mays P. typhoides | 30 40 40 40 40 35-40 45 50 | | | | | FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA | | CHOPRA, 1983 |
| M. esculenta | | 6,5 | 60 | 100 | | FOLHA | 0.1 | PEREIRA e SPLITTSTOESSER, 1986 |
| G. max | | 7,5 | | 50 | 1 | FOLHA | | NICHOLAS et al., 1976 |
| Z. mays P. avenense T. aestivum H. vulgare C. pepo G. globosa | | | | 50 50 50 50 100 50 | 0.1 0.5 1.0 1.0 1.0 0.5 | FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA FOLHA | | JONES e SHEARD, 1977 |
| G. max | | 6.2 | | 90 | | FOLHA RAIZ | 0.5 | STREETER e BOSLER, 1972 |
| C. cajan D. barbatum | 32 32 | 8.0 7.5 | 180 | 200 100 | | FOLHA FOLHA | | PEREIRA-NETO, 1992 |
| C. arabica | 35 | 7.5 | 60 | | 2.0 | FOLHA RAIZ | | QUEIROZ et al., 1991 |

QUADRO 4: Continuação

| ESPECIE | TEMPERATURA (°C) | PH | TEMPO DE REAÇÃO (minutos) | KNO ₃ (mM) | ÁLCOOL (%) | PARTE DA PLANTA | TAMPÃO (M) | AUTOR(ES) |
|-----------------|------------------|------------|---------------------------|-----------------------|------------|-----------------|------------|----------------------------------|
| P. abies | | 6.5 7.5 | | | | RAIZ FOLHA | | PEUSKE e TISCHENER, 1991 |
| H. vulgare | 45 | | | | | FOLHA | | BENZIONI e HEIMER, 1977 |
| H. vulgare | | 8.0 | | 100 | | RAIZ | 0.3 | DEANE-DRUMMOND e CLARCKSON, 1979 |
| H. vulgare | 10 | | | | | RAIZ | | DEANE-DRUMMOND et al., 1980 |
| Citrus | | 7.2 | | | | | | BAR-AKIVA e SAGIV, 1967 |
| M. sativa | | | | 350 | | FOLHA | | HEUER e PLAUT, 1978 |
| P. phaseoloides | 32-37 | 6.5 | 60 | 25 | | FOLHA | | PEREIRA-NETO et al., 1989 |
| H. dulcis | 30 | 7.5 | 60 | 25 | | FOLHA | | CAIRO et al., 1994 |
| H. courbaril | 30 | 7.5 | 60 | 100 | | FOLHA | | |
| T. serratifolia | 30 | 7.5 | 60 | 100 | | FOLHA | | |

4.3: Experimento III: Enzimas de assimilação do amônio

4.3.1 Sintetase da glutamina (GS; E.C.6.3.1.2)

Analisando a Figura 14, nota-se que a atividade da GS em plantas jovens de seringueira ocorre predominantemente nas lâminas foliares, uma vez que a atividade enzimática nas raízes atingiu níveis próximos a zero. Observa-se, ainda, que o nitrato exerce um efeito positivo sobre a atividade da enzima. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos em ervilha por Vézima e Langlois (1989). Hoesle *et al.* (1992) verificaram que a indução na atividade da GS em *P. vulgaris*, *P. sativum* e *G. max* ocorre indistintamente quando nitrato ou amônio foram fornecidos às plantas. Purcino *et al.* (1992), trabalhando com sete cultivares de milho, encontraram efeito positivo do NO_3^- sobre a concentração de GS_1 e GS_2 . Por outro lado, Schimdt e Mohr (1989), o efeito da luz, operando via fitocromo, parece ser o principal fator de regulação no processo de síntese da GS, enquanto que o efeito estimulatório do NO_3^- é muito pequeno (Schimdt e Mohr, 1989; Seith *et al.*, 1994).

As menores atividades da GS observadas nas folhas nas concentrações 0 e 1 mM de N-NO_3^- podem ser resultantes do fornecimento de pequenas concentrações de NH_4^+ para a enzima, como consequência da baixa atividade da RN no sistema radicular nessas concentrações (Figura 15).

Por outro lado, Rhodes, Sims e Stewart (1978) sugerem que a baixa atividade da GS nessas condições pode ser resultante

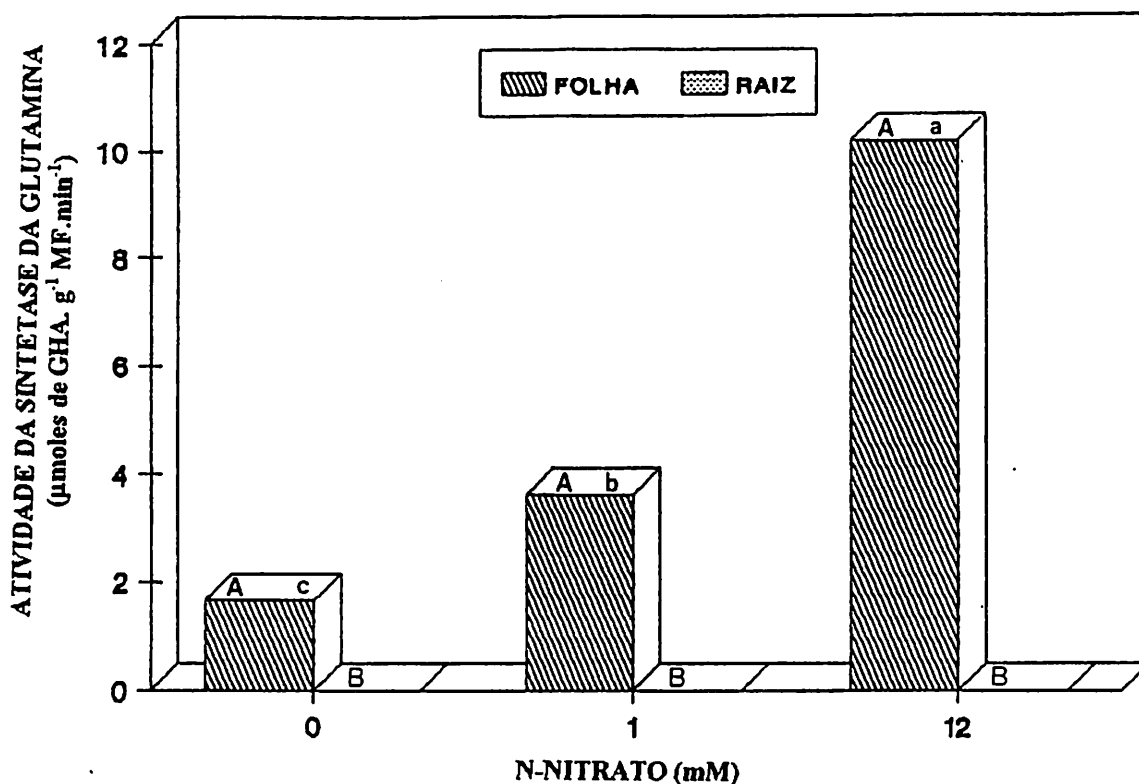


Figura 14: Atividade da GS em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (letras maiúsculas comparam atividade da enzima entre raiz e folha dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam atividade da enzima entre diferentes concentrações de nitrato para uma mesma parte da planta).

de um 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 conservação do ATP, mantendo o C disponível para outras rotas metabólicas, como para o processo de absorção e redução de NO_3^- , pois segundo Chaillou et al. (1986), o fornecimento exclusivo daquele ânion para a planta estimula a glicólise, havendo portanto, aumento na demanda de C metabolicamente disponível. Outros estudos parecem reforçar o conceito do processo regulatório da GS. Em

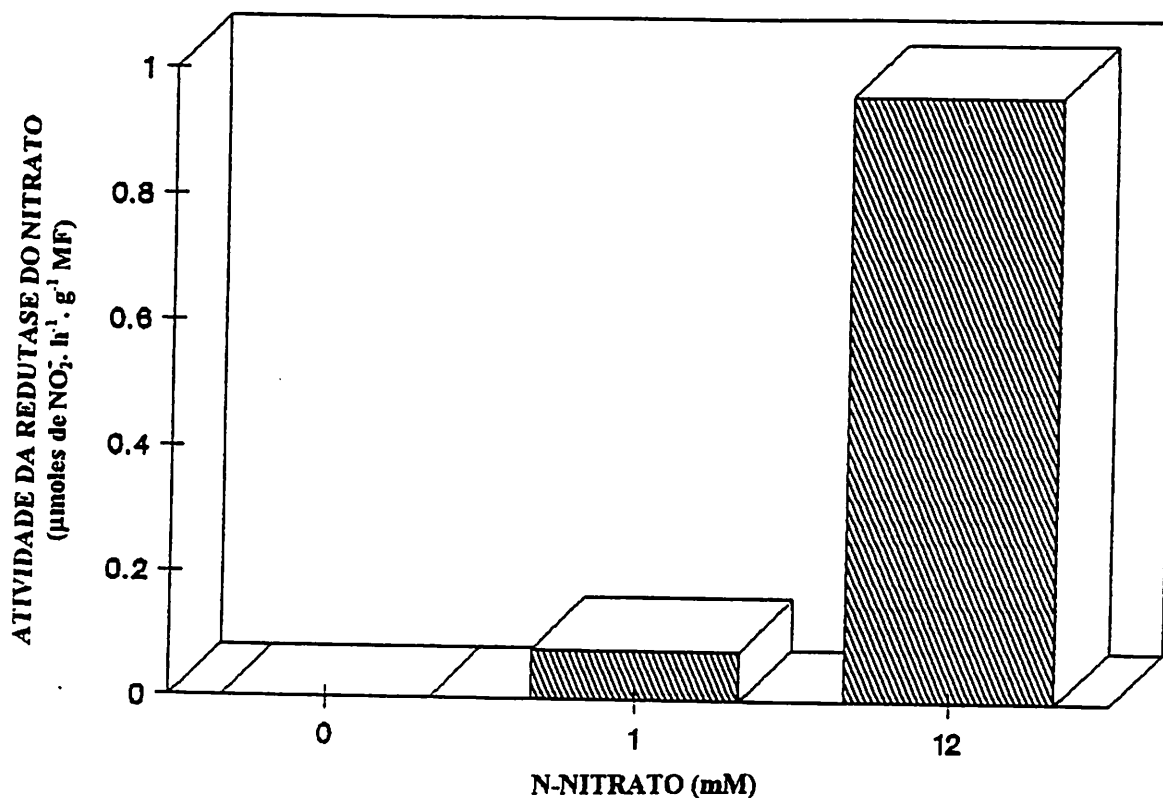


Figura 15: Atividade da RN *in vivo* em função da concentração de NO₃⁻ no meio de cultivo.

cotilédones de *Lupinus*, Ratajczak, Ratajczak e Mazurowa (1981), observaram que a atividade da GS foi inibida na presença de baixas concentrações de NH₄⁺. Porém, quando foi fornecido sacarose no meio, houve um aumento expressivo na atividade da enzima.

4.3.2 Sintase do glutamato dependente do NADH (NADH-GOGAT; E.C. 1.4.1.14) e dependente da Ferredoxina (Fd-GOGAT; E.C. 1.4.1.7)

Os resultados apresentados na Figura 16, evidenciam que a atividade da Fd-GOGAT, presente nas lâminas foliares, foi

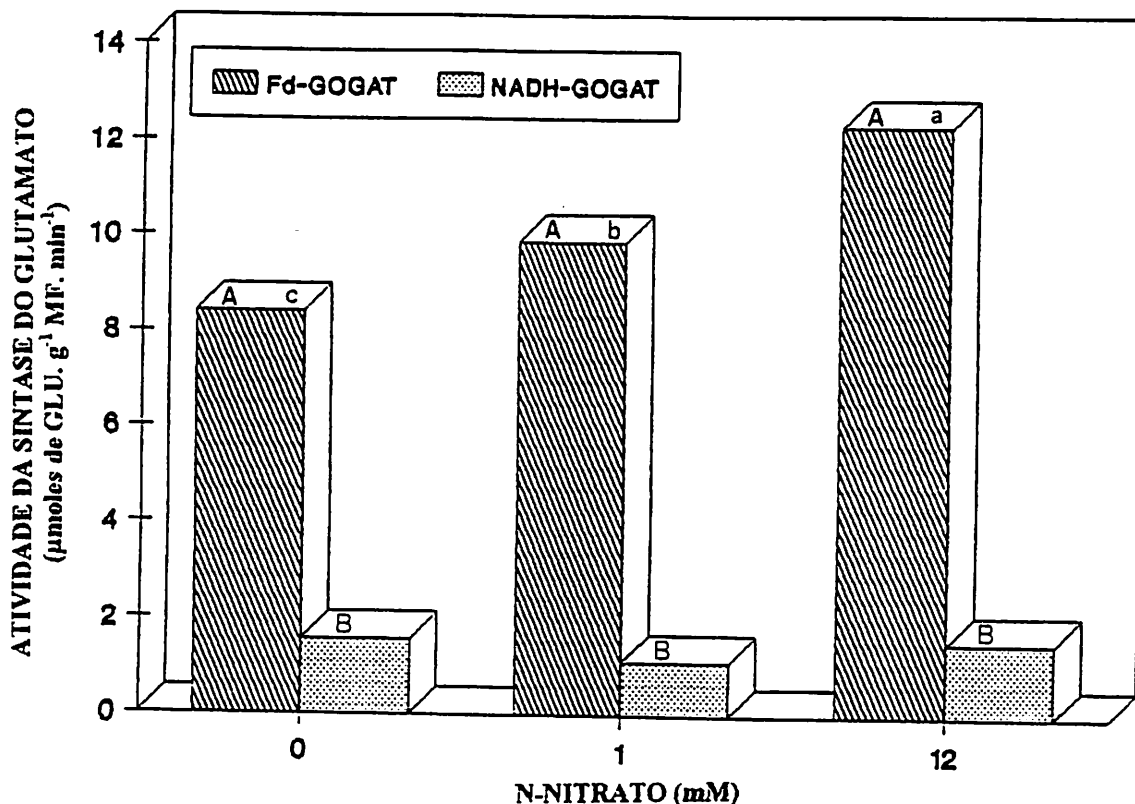


Figura 16: Atividade da GOGAT em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (letras maiúsculas comparam atividade da enzima entre raiz e folha dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam atividade da enzima entre níveis de nitrato para uma mesma parte da planta).

significativamente maior que a atividade da NADH-GOGAT, presente nas raízes. Esses resultados, associados a atividade da GS detectada apenas nas lâminas foliares (item 4.3.1), indicam que em plantas jovens de seringueira, a assimilação do NH_4^+ via GS/GOGAT ocorre quase que integralmente na parte aérea.

Verifica-se ainda, que a presença do NO_3^- no meio de cultivo exerceu efeito positivo sobre a atividade da Fd-GOGAT, não apresentando, todavia, efeito algum sobre a atividade da NADH-GOGAT. Os resultados encontrados na literatura relacionados

com o efeito do NO_3^- sobre a atividade da GOGAT são contraditórios. Trabalhando com plântulas de mostarda, Hecht et al. (1988) verificaram que o NO_3^- exerce influência positiva sobre a síntese *de novo* e a ativação da NADH-GOGAT, não apresentando qualquer efeito sobre a Fd-GOGAT. Já em nódulos de alfafa, Groat e Vance (1981) notaram que o fornecimento exclusivo de NO_3^- para plantas noduladas inibia a atividade da NADH-GOGAT. Segundo Rhodes, Sims e Stewart (1976), o fornecimento de nitrato inibe a atividade da Fd-GOGAT em plantas de *Lemna minor*, ao passo que em plantas de cevada, aquele ânion não apresenta nenhum efeito sobre a atividade da Fd-GOGAT (Lewis, James e Hewitt, 1982).

O fornecimento de NO_3^- ou NH_4^+ aumentou consideravelmente a atividade da NADH-GOGAT em milho (Singh e Srivastava, 1986), sendo que o incremento foi mais pronunciado quando se utilizou o nitrato. Esses autores constataram, ainda, que a presença de amônio em concentrações iguais ou inferiores a 5 mM contribuíram para o aumento na atividade da enzima. Porém, concentrações superiores a essa promoviam uma queda na atividade enzimática. Finalmente, concluíram que o NO_3^- aumenta a atividade da enzima pela indução da sua síntese *de novo* e pela proteção contra a degradação ou inativação da molécula pela modulação físico-química.

A atividade da Fd-GOGAT no nível 0 de N-NO_3^- no meio de cultivo pode ser considerada expressiva quando comparada com a atividade da mesma enzima em outras espécies. Isso pode ser explicado pelo fato da Fd-GOGAT ser uma enzima ativa no processo

de reassimilação do amônio produzido durante a fotorrespiração (Ogren, 1984) ou daquele derivado da degradação de compostos nitrogenados (*turnover*) presente nas células (Platt e Anthon, 1981).

4.3.3 Desidrogenase do Glutamato (GDH; E.C. 1.4.1.3)

A análise da Figura 17 mostra que a atividade da GDH foi significativamente maior nas folhas do que nas raízes de plantas jovens de seringueira, à semelhança do que ocorre com a GS e Fd-GOGAT. Nota-se, ainda, que o NO_3^- exerceu um efeito positivo sobre a atividade da enzima na parte aérea, não tendo, porém, provocado qualquer estímulo na atividade da enzima nos ensaios realizados nos tecidos radiculares.

A exemplo da GOGAT, a resposta da GDH em função da aplicação de nitrogênio (NO_3^- ou NH_4^+) parece não seguir um padrão. Em plantas noduladas de alfafa, Groat e Vance (1981) encontraram um efeito negativo do fornecimento do NO_3^- sobre a atividade da GDH nos ensaios realizados em extratos de raízes e nódulos. Por outro lado, em plantas de trigo, Peeters e Van Laere (1992), verificaram que a GDH foi induzida após incubação com NH_4^+ . Esse fato levou os autores a sugerirem que a GDH pode estar envolvida na assimilação primária do amônio, evitando com isso o seu acúmulo nas folhas (Cammaerts e Jacobs, 1985; Srivastava e Singh, 1987; Schele, Thöringer e Tintemann, 1994).

Tem sido sugerido ainda, que a GDH possa atuar na oxidação do glutamato (Mifflin e Lea, 1977; Robinson et al.,

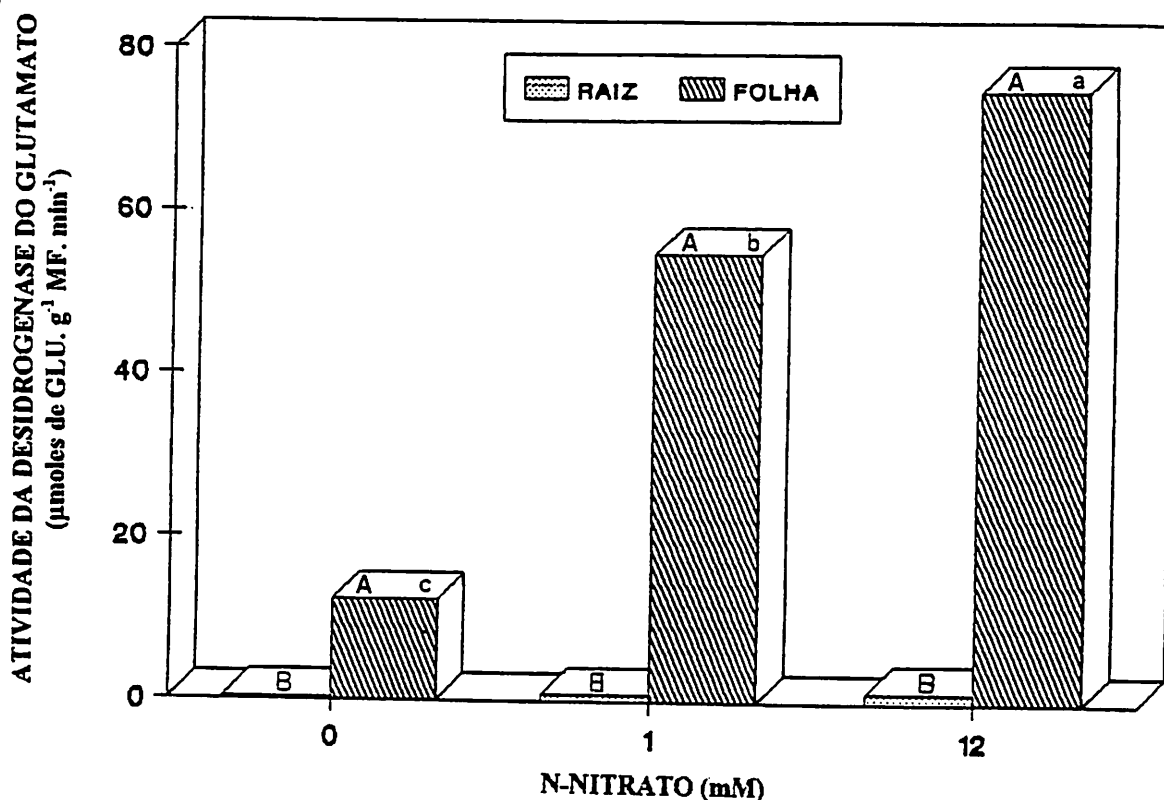


Figura 17: Atividade da GDH em função da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (letras maiúsculas comparam atividade da enzima entre raiz e folha dentro de cada concentração e letras minúsculas comparam atividade da enzima entre diferentes concentrações de nitrato para uma mesma parte da planta).

1991). Porém, investigações mais criteriosas utilizando elemento marcado (N^{15}) têm demonstrado que a GDH pode atuar tanto na assimilação do amônio, produzido ou não pela fotorrespiração, quanto na oxidação do glutamato em condições de estresse lumínico (Lauriere e Daussant, 1983) ou durante o processo de senescência foliar (Cammaerts e Jacobs, 1985).

O fato de plantas jovens de seringueira apresentarem grande capacidade de assimilação do amônio nas folhas pode representar uma vantagem, pois o amônio produzido durante o

processo fotorespiratório tem a possibilidade de ser reassimilado, reduzindo as perdas por volatilização para o meio (Farquhar et al., 1980), uma vez que isso não ocorre quando as enzimas responsáveis pela assimilação do amônio estão presentes apenas no sistema radicular.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que, em plantas jovens de seringueira, diferentes concentrações de nitrato levaram a uma maior produção de matéria seca (M.S.) da parte aérea (P.A.) nas concentrações 8 e 12 mM de nitrato e do sistema radicular (S.R.) nas concentrações 1, 2 e 4 mM, ao passo que a relação entre o peso M.S. da P.A. e do S.R. atingiu os maiores valores entre as concentrações 8 e 12 mM. O nitrato provocou maior variação na produção de M.S. da P.A. quando comparadas com a produção de matéria seca do S.R., e a produção de M.S. das raízes laterais foi mais afetada pelas concentrações de nitrato que a M.S. da raiz principal. Entretanto, diferentes concentrações de nitrato não promoveram diferenças significativas no crescimento do caule em diâmetro e altura nas plantas cultivadas. A atividade da RN foi afetada positivamente pela presença do nitrato até a concentração de 12 mM. Em plantas jovens de seringueira essa enzima é ativa apenas no sistema radicular e atingiu maiores valores quando os ensaios foram realizados com 100 mM de nitrato, 30°C, pH 7,0 a 7,5 durante 60 minutos, apresentando ritmo circadiano característico. A seringueira é uma espécie que apresenta grande capacidade de assimilação do amônio via GS/GOGAT e GDH apenas nas lâminas foliares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J.D.; CORDEIRO, A.T.; RENA, A.B. Relações entre fotossíntese, resistência difusiva e variação circadiana da redutase do nitrato em *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRA, 12, Caxambú. 1985 Anais... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1985, P.142-145
- ASLAN, M.; HUFFAKER, R.C. *In vivo* nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings in light and darkness. *Plant Physiology*, Washington, v.70, n.6, p.1009-1013, 1982
- ASLAN, M.; HUFFAKER, R.C.; RAINS, D.W.; RAO, K.P. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact seedlings. *Plant Physiology*, Washington, v.53, n.6, p.1205-1209, 1979
- ASLAN, M.; OAKS, A. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. *Plant Physiology*, Washington, v.57, n.4, p.572-576, 1976
- AYRAN, A.P.; BATT, R.G.; WALLACE, W. Reversible inactivation of nitrate reductase by NADH and the occurrence of partially inactive enzyme in wheat leave. *Plant Physiology*, Washington, v.71, n.3, p.582-587, 1983
- BARKER, A.V.; MAYNARD, D.N. Cation and nitrate accumulation in pea and cucumber as influenced by nitrogen nutrition. *Journal American Society Horticultural Science*, v.97, p.27-30, 1972
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.20, p.495-522, 1969

- BENZIONI, A.; HEIMER, Y.M. Temperature effect on nitrate reductase activity in vivo. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.9, p.225-231, 1977
- BOLLE-JONES, E.W. Cooper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). *Plant and Soil*, Netherlands, v.10, n.2, p.168-178, 1957
- BRETELER, H.; ARNOZIS, P.A. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Phytochemistry*, Elmsford, v.24, n.4, p.653-657, 1985
- BRETELER, H.; SIEGERIST, M. Effect of ammonium or nitrate utilization by roots of dwarf bean. *Plant Physiology*, Washington, v.75, n.4, p.1009-1012, 1984
- BUTZ, R.G.; JACKSON, W.A. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry*, Elmsford, v.16, n.3, p.409-417, 1977
- CAIRO, P.A.R. Aspectos biofísicos e metabólicos de plantas jovens de espécies florestais associados á disponibilidade de água no solo. Lavras: ESAL, 1992. 124p. (Tese de Mestrado)
- 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, 1994
- CAMMAERTS, D.; JACOBS, M.A. A study of the role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, New York, v.163, n.4, p.517-526, 1985
- CARDOSO, R.M.G. Doenças da seringueira no Estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO SOBRE CULTURA DA SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., Piracicaba, 1986. *Anais...* Campinas: Fundação Cargil, 1986. p. 165-70

- CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Distribuição da assimilação de nitrato e da matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. *Bragantia*, Campinas, v.50, v.1, p.29-37, 1991
- 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. Lavras: ESAL, 1991. 135p. (Tese de Mestrado)
- CHAILLOU, S.; MOROT-GAUDRY, J.F.; SALSAC, L.; JOLIVET, E. Compared effects of NO_3^- and NH_4^+ on growth and metabolism of french bean. *Physiologie Végétale*, Paris, vv.24, p.679-687, 1986
- CHAN, W.; MACKENZIE, A.F. Effects of shading and nitrogen on growth of corn (*Zea mays* L.) under field conditions. *Plant and Soil*, The Hague, v.36, p.59-70, 1972
- CHEE, K.H.; HOLIDAY, P. South american leaf blight of *Hevea* rubber. *Malaysian rubber research and development board*, S. 1, Monograph, n. 13, 50 p, Oct. 1986
- CHOPRA, R.K. Effects of temperature on the *in vivo* assay of nitrate reductase in some C_3 and C_4 species. *Annals of Botany*, New York, v.51, n.5, p.617-620, 1983
- CLARKE, A.L.; BARLEY, K.P. The uptake of nitrogen salts in relation to solute diffusion. *Australian Journal of Soil Research*, Victoria, v.6, p.75-79, 1968
- CLAUSSEN, W. Influence of load and environmental factors on nitrate activity on concentration of nitrate and carbohydrates in leaves of eggplant (*Solanum melongena*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.67, n.1, p.73-80, 1986

- CORDEIRO, A.T.; RENA, A.B.; MENDES, L.F.; ALVES, J.D.; PEREIRA, A.A.. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens e adultas de *Coffea arabica* L.; à luz e na obscuridade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRA, 11, Curitiba. Anais... Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1984, P.77-79
- COSTA, E.M. Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a nutrição nitrogenada em *Eucalyptus grandis* Hill (Maiden). Viçosa: UFV, 1986, 50p.
- CRIDDLE, R.S.; WARD, M.R.; HUFFAKER, R.C. Nitrogen uptake by wheat seedlings, interactive effects of four nitrogen sources: NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ and urea. *Plant Physiology*, Washington, v.86, n.1, p.166-175, 1988
- CRIST, J.W.; STOUT, G.J. Relation between top and root size in herbaceous plants. *Plant Physiology*, Washington, v.4, n.1, p.63-85, 1929
- CULLIMORE, J.V.; BENNETT, M.J. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. *Journal of Plant Physiology*, Washington, v.132, p.387-393, 1988
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E.; HAGEMAN, R.H. Intracellular location of nitrate reductase. II. Wheat roots. *Biochemical Biophysical Acta*, New York, v.283, p.513-519, 1972
- DEANE-DRUMMOND, C.E. Mechanism for nitrate uptake into barley (*Hordeum vulgare* cv. Fergus) seedlings grown at controlled nitrate concentration in the nutrient medium. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.24, p.79-89, 1982
- DEANE-DRUMMOND, C.E. Mechanism of nitrate uptake into *Chara corallina* cells: lack of evidence for obligatory coupling to proton pump and a new $\text{OH}^-/\text{NO}_3^-$ exchange model. *Plant Cell Environment*, Tokyo, v.32, n.3, p.670-678, 1984.

- DEANE-DRUMMOND, C.E.; CLARKSON, D.T. Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed *in vivo* in barley (*Hordeum vulgare* cv. Midas). *Plant Physiology*, Washington, v.64, n.3, p. 660-662, 1979
- DIRR, M.A. Nitrogen form and growth and nitrate reductase activity of the Cranberry. *HortScience*, Alexandria, v.9, n.4, p.347-348, 1974
- DUKE, S.H.; HAM, G.E. The effect of nitrogen additions on N_2 -fixation and on glutamate synthase activities in nodules and roots of soybeans inoculated with various strains of *Rhizobium japonicum*. *Plant Cell Physiology*, Tokyo, v.17, n.3, p.1037-1044, 1976
- EDDY, A.A.; HOPKINS, P.G. The putative eletrogenic nitrate-proton symport of the yeast *Candida utilis*. Comparison with the systems absorbing glucose or lactate. *Biochemistry Journal*, Londdon, v.231, p.291-297, 1985
- EDWARDS, J.H.; HARTMAN, B.D. Interaction of seedlings to $NO_3^-:NH_4^+$ ratios in nutrient solutions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, v.107, n.1, p.142-147, 1982
- ELSIEVE, R.; ULLRICH, W.R. Stoichiometry between photosynthetic nitrate reduction and alkalinization by *Ankiostrodesmus braunii*. *Planta*, New York, v.122, n.1, p.117-124, 1975
- ELSIEVE, R.; ULLRICH, W.R. Effect of glucose and CO_2 on nitrate uptake and coupled OH^- -influx in *Ankiostrodesmus braunii*. *Plant Physiology*, Washington, v.59, n.1, p.18-21, 1977
- EMBRAPA: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA: Fisiologia e programa do centro de pesquisa (Grupo de Implantação do CPAC). *Cerrado*, Brasília, v.7, p.22-26, 1975

- EMES, M.J.; FOWLER, M.W. The intracelular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedlings pea roots. *Planta*, New York, v.194, v.1, p.249-253, 1979
- FARQUHAR, G.D.; FIRTH, P.M.; WEELAAR, R.; WEIR, B. On the gaseou exchange of ammonia between leaves and the environment: determination on the ammonia compenatinn point. *Plant Physiology*, Washington, v.66, n.4, p.710-714, 1980
- FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Aspectos do metabolismo eutilização do nitrogênio em gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE CALAGEM E ADUBAÇÃO DE PASTAGENS, 1, Nova Odessa, 1985. *Anais...* Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1985. p.92-123
- FERRARI, T.E.; YODER, O.C.; FILNER, P. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. *Plant Physiology*, Washington, v.51, n.3, p.423-431, 1973
- FRIED, M., ZSOLDOS, F.; VOSE, P.B.; SHAKOTIN, I.L. Characterizing the NO_3^- and NH_4^+ uptake of rice roots by use ^{15}N labelled NH_4NO_3 . *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.18, n.2, p.313-320, 1965.
- FROTA, J.N.; TUCKER, D.C.; Temperature influence on ammonium and nitrate absorpction by lettuce. *Soil Science Society American Proceedings*, New York, v.36, n.1, p.97-100, 1972
- GASHAW, L.; MUGWIRA, L.M. Ammonium-N and nitrate-N effects on the growth and mineral compositions of triticales, wheat, and rye. *Agronomy Journal*, Madison, v.73, n.1, p.47-51, 1981
- GASSER, J.K.R. Transformations, leaching and uptake of fertilizer nitrogen applied in autumn and spring to winter on a heavy soil. *Journal of the Science Food Agriculture*, England, v.12, p.30-37, 1961

- GEBAUER, G.; MELZER, A.; REHDER, H. Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. I. Differences in organs and diurnal changes. *Oecologia*, New York, v.63, p.136-142, 1984
- GIVAN, C.V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry*, Elmsford, v.18, n.1, p.375-382, 1979
- GOYAL, S.S.; LORENZ, O.A.; HUFFAKER, R.C. Inhibitory effects of ammoniacal nitrogen on growth of radish plants. I. Characterization of toxic effects of NH_4^+ on growth and its alleviation by NO_3^- . *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, v.107, n.1, p.125-129, 1982
- GREENWOOD, D.J.; GASTAL, F.; LEMAIRE, G.; DRAYCOTT, A.; MILLARD, P.; NEETESON, J.J. Growth rate and % N of field grown crops: theory and experiments. *Annals of Botany*, New York, v.67, n.2, p.181-190, 1991.
- GROAT, R.G.; VANCE, C.P. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, Washington, v.67, n.6, p.1198-1203, 1981
- GUAZZELLI, E.M.F.M. Efeito de nitrato e amônio no crescimento, assimilação e eficiência de utilização do nitrogênio por cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na fase inicial de crescimento. Lavras: ESAL, 1988. 112p. (Tese de Mestrado)
- GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.32, p.169-204, 1980
- HAGEMAN, R.H.; HUCKLESBY, D.P. Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymology*, New York, v.23, p.491-503, 1971
- HALLMARK, W.B.; HUFFAKER, R.L. The influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in Sudangrass. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.44, n.1, p.147-152, 1978

- HARTMAN, P.L.; MILLS, H.A.; JONES, J.B. Jr. The influence of nitrate:ammonium ratios on growth, fruit development, and element concentration in "Floradel" tomato plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, v.111, n.10, p.487-490, 1986
- HAYSTEAD, A. Glutamine synthetase in the chloroplast of *Vicia faba*. *Planta*, New York, v.111, n.1, p.271-274, 1973
- HEBERER, J.A.; BELOW, F.E. Mixed nitrogen nutrition and productivity of wheat grown in hydroponics. *Annals of Botany*, Ottawa, v.63, n.6, p.643-649, 1989
- HECHT, U.; OELMÜLLER, S.; SCHIMIDT, S.; MOHR, H. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta*, New York, v.175, n.1, p.130-138, 1988
- HEIMER, Y.M.; FILMER, P. Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochemistry Biophysical Acta*, New York, v. 230, n.1, p.362-372, 1971
- HEUER, B.; PLAUT, Z. Reassessment of the *in vivo* assay for nitrate reductase in leaves. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.43, n.1, p.306-312, 1978
- HIREL, B.; GADAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiology*, Washington, v.66, n.4, p.619-623, 1982
- HOEZLE, I.; FINER, J.J.; McMULLEN, M.D.; STREETER, J.G. Induction of glutamine synthetase activity in nonnodulated roots of *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. *Plant Physiology*, Washington, v.100, n.1, p.525-528, 1992
- HUETT, D.O. Response to nitrogen and potassium of tomatoes grown in sand culture. *Australian Journal Experimental Agriculture*, Sydney, v.26, p.133-138, 1986

- HUETT, D.O. DETTMANN, E.B. Effect of nitrogen on growth, fruit quality and nutrient uptake of tomatoes grown in sand culture. *Australian Journal Experimental Agriculture*, Sydney, v.28, p.391-399, 1988
- HUNGRIA, M.; EAGLESHAM, A.R.J.; HARDY, R.W.F. Physiological comparisons of root and stem nodules of *Aeschynomene scabra* and *Sesbania rostrata*. *Plant and Soil*, Netherlands, v.139, n.1, p.7-13, 1992
- JACKSON, W.A.; KWIK, K.D.; VOLK, R.J. Nitrate uptake during recovery from nitrogen deficiency. *Plant Physiology*, Washington, v.36, n.1, p.174-181, 1976
- JACKSON, W.A. FLESHER, C.; HAGEMAN, R.H. Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings: some characteristics of apparent induction. *Plant Physiology*, Washington, v.5, n.1, p.120-127, 1973
- JONES, R.W.; SHEARD, R.W. Conditions affecting in vivo nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.55, n.3, p.896-901, 1976
- JOY, K.W. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.66, p.2103-2109, 1988
- KIRKBY, E.A.; KNIGHT, A.H. Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid metabolism, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiology*, Washington, v.60, n.2, p.349-355, 1977
- KUIPER, D. Genetic differentiation in *Plantago major*: growth and respiration and their role in phenotypic adaptation. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.57, n.5, p.22-30, 1983
- LARA, M.; CULLIMORE, J.V.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J.; JOHNSTON, A.W.B.; LAMB, J.W. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, New York, v. 157, n.1, p.254-258, 1983

- LANGELAAN, J.G.; TROELSTRA, S.R. Growth, chemical composition, and nitrate reductase activity of *Rumex* species in relation to form and level of N supply. *Plant and Soil*, The Hague, v.145, n.1, p.215-229, 1992
- LAURIÈRE, C.; DAUSSANT, J. Identification of the ammonium-dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.58, n.1, p.89-92, 1983
- LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, London, v.251, n.2, p.614-620, 1974
- LEE, J.A.; STWART, G.R. Ecological aspects of nitrogen assimilation. *Advances of Botany Research*, v.6, p.2-43, 1978
- LEWIS, O.A.M.; JAMES, D.M.; HEWITT, E.J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. *Annals of Botany*, New York, v.49, n.1, p.39-49, 1982
- L'VOV, N.P.; SAFARALIEV, P.M. Methods of determining nitrate reductase activity in plants. *Soviet Plant Physiology*, Moscou, v.35, p.154-157, 1988
- MARTIN, F.; CHEMARDIN, GADAL, P. Nitrate assimilation and nitrogen circulation in Australian pine. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.53, n.1, p.105-110, 1981
- McNALLY, S.; HIREL, B. Glutamine synthetase isoforms in higher plants. *Physiologie Vegetale*, Paris, v.21, p.761-774, 1983
- MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C.N. Atividade da redutase do nitrato em cultivares de café. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.17, n.2, p.1725-1731, 1982

- MELLO, F.A.F.; SOBRINHO, M.O.C.B.; AROLLA, S.; SILVEIRA, R.I.; COBRA NETO, A.; KIEHL, J.C. FERTILIDADE DO SOLO, 3.ed. Piracicaba:Editora Nobel, 1988. 560p.
- MERLO, L.; FERRETTI, M.; PASSERA, C.; GHISI, R. Effect of decreased irradiance on N and C metabolism in leaves and roots of maize. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.91, n. ; p.72-80, 1994
- MIFLIN, B.J. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. *Plant Physiology*, Washington, v.54, n.2 , p.550-555, 1974
- MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.28, p.299-329, 1977
- MIFLIN, B.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, Elmsford, v.15, n.3, p.873-885, 1976
- MIFLIN, B.J. ; WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. Glutamine metabolism in higher plants. *Current Topics Cellular Regulation*, v.20, n.1, p.1-43, 1981
- MILLARD, P.; ROBINSON, D.; MACKIE-DAWSON, L.A. Nitrogen partitioning within the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant in relation to nitrogen supply. *Annals of Botany*, Oxford, v.63, n.1, p.289-296, 1989
- NAVES, V. Influência de diferentes níveis de luminosidade sobre a produção e o particionamento de matéria seca em três espécies florestais. Lavras: ESAL, 90p. 1993 (Tese de Mestrado)
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.).I. Effects of light and temperature. *Plant Physiology*, Washington, v.58, n.3, p.731-735, 1976

- OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.36, p.345-365, 1985
- OAKS, A.; STULEN, I.; BOESEL, I.L. Influence of amino acids and ammonium of nitrate reduction in corn seedlings. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.57, n.6, p.1824-1829, 1979
- OAKS, A.; STULEN, I.; JONES, K.; WINSPEAR, M.J.; MISRA, S.; BOESEL, I.L. Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. *Planta*, New York, v.148, n.2, p.477-484, 1980
- OLIVEIRA, L.E.M.; MAGALHÃES, A.C.N. Atividade da redutase do nitrato *in vivo* em folhas de cana-de-açúcar em função das variações nas condições de ensaio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.4, p.437-443, abr. 1989
- OLIVEIRA, L.E.M.; GOMIDE, M.B. Efeito do nitrogênio no particionamento de matéria seca em plantas de rabanete (*Raphanus sativus* L.). In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2, Piracicaba, 1989. *Anais...* Piracicaba; 1989. p.263.
- O'NEAL, D.; JOY, K.W. Glutamine synthetase of pea leaves. *Plant Physiology*, Washington, v.54, n.3, p.773-779, 1974
- O'NEAL, D.; JOY, K.W. Localisation of glutamine synthetase in chloroplasts. *Nature*, London, v.246, p.61-62, 1973
- OTA, K.; YAMAMOTO, Y. Promotion at assimilation of ammonium ions by simultaneous application of nitrate and ammonium ion in radish plants. *Plant Cell Physiology*, Tokyo, v.77, n.2, p.560-566, 1989
- PAHLICH, E.; GERLITZ, C. Deviations from Michaelis-Menten behaviour of plant glutamate dehydrogenase with ammonium as a variable substrate. *Phytochemistry*, Elmsford, v.19, n.1, p.11-13, 1980

- PAHLICH, E.; JOY, K.W. Glutamate dehydrogenase from pea roots: Purification and properties of the enzyme. *Canadian Journal Biochemistry*, Ottawa, v.49, n.1, p.127-138, 1981
- PATE, T.S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review Plant Physiology*, v.31, p.313-340, 1980
- PATE, T.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biology and Biochememistry*, v.5, n.1, p.109-119, 1973
- PELACANI, C.R. Estratégias de sobrevivência de espécies herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à condições de inundação do sistema radicular. Lavras: ESAL, 1993. 110p. (Tese de Mestrado)
- PEETERS, K.M.U.; VAN LAERE,, A.J. Ammonium and amino acid metabolism in the excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.84, n.1, p.243-249, 1992
- PEREIRA, J.F.; SPLITTSTOESSER, W.E. Nitrate reduction by cassava leaf. Short communication. *Plant Cell Physiology*, Tokyo, v.27, n. 5, p.925-927, 1986
- PEREIRA-NETO, A.B. de. Atividade da redutase do nitrato em *Cajanus cajan* e *Desmodium barbatum*. Padronização das condições de ensaio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.27, n.7, p.1011-1015, jul. 1992
- PEREIRA-NETO, A.B. de.; MAGALHÃES, A.C.N.; PINTO, H.S. Atividade da redutase do nitrato em kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*): padronização das condições de ensaio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.1, n.1, p.133-137, 1989
- PETERSON, L.A.; STANG, E.J.; DANA, M.N. Blueberry response of NH_4^+ -N and NO_3^- -N. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, v.113, n.1, p.9-12, 1988

- PEUKE, A.D.; TISCHENER, R. Nitrate uptake and reduction of aseptically cultivated spruce seedlings *Picea abies* (L.) Karst. *Journal of Experimental Botany*, London, v.42, n.239, p.723-728, June 1991
- PILL, W.G.; LAMBERT, V.N. Effect of NH_4^+ and NO_3^- nutrition with and without pH adjustment on tomato growth, ion composition, and water relations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount, v.102, n.1, 78-81, 1977
- PIZELLE, G. e THIERY, G. Réduction des nitrates par les feuilles, les racines et les nodules d'Aune glutineux (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences de Paris*, Paris, v.279, n.18, p.1535-1537, 1974
- PLATT, S.G.; ANTHON, G.E. Ammonium accumulation and inhibition of photosynthesis in methionine sulfoximine treated spinach. *Plant Physiology*, Washington, v.67, n.3, p.509-513, 1981
- PRAKASH, S.S.; NAIK, M.S. Reevaluation of *in vivo* assay of nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Science Letters*, Limerick, v.25, n.1, p.9-14, 1982
- 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. de; ALVES, J.D.; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T. Efeito do cloranfenicol, propanol, pH e temperatura sobre a atividade *in vivo* da redutase do nitrato em cafeeiros jovens. *Revista Brasileira de Botânica*, Campinas, v.14, n.1, p.73-77, 1991
- QUEIROZ, C.G. de; RENA, A.B.; CORDEIRO, A.T.; ALVES, J.D. Ritmo diurno na atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.7, p.787-795, jul. 1993

- QUEIROZ, C.G. de; RENA, A..B.; CORDEIRO, A.T.; ALVES, J.D. Ritmo diurno na atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de *Coffea arabica* L. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.28, n.7, p.787-795, jul. 1993.
- RAVEN, J.A.; SMITH, F.A. Intracellular pH regulation in the giant-celled marine alga *Chaetomorpha darwinii*. Journal of Experimental Botany, London, v.31, p.1357-1369, 1980
- RAVEN, J.A.; Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. New Phytologist, Cambridge, v.76, n.2, p.415-431, 1976
- 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 embrionic axes. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.51, n.1, p.277-280, 1981
- RHODES, D.; SIMS, A.P.; STEWART, G.R. Glutamine synthetase and the control of nitrogen assimilation in *Lemna minor* L. In: HEWITT, E.J.; cutting, cv (eds). Nitrogen assimilation of plants proceedings long ashton research station symposium. New York, Academic Press, 1976, p.501-520
- ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G.; PHILLIPS, R.; RATCLIFFE, R. G.; STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiology, Washington, v.95, n.2, p.509-516, 1991
- ROSEN, C.J.; ALLAN, D.L. e LUBBY, J.J. Nitrogen form and solution pH influence growrt and nutrition of two *Vaccinium* clones. Journal of the American Society for Horticultural Science, Mount, v.115, n.1, p.83-89, 1990
- ROUTLEY, D.G. Nitrate reductase in leaves of Ericaceae. HortScience, Alexandria, v.7, n.1, p.85-87, 1972

- RUFY, T.W.; VOLK, R.J.; McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W.; RARPER, C.D. Jr. Relative content of NO_3^- and reduced N in xylem exudate as an indication of root reduction of concurrently absorbed $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiology*, Washington, v.69, n.1, p.166-170, 1982
- SCHERER, H.W.; MacKOWN, .T. Dry matter accumulation, uptake, and chemical composition of tobacco grown with different N sources at two levels of K. *Journal Plant Nutrition*, New York, v.10, n.1, p.10-14, 1987
- SCHLEE, M.D.; THÖRINGER,, C.; TINTEMANN, H. Purification and properties of glutamate dehydrogenase in Scots pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.92, n.2, p.467-472, 1994
- SCHMIDT, S.; MOHR, H. Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinapsis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. *Planta*, New York, n.177, n.2, p.526-534, 1989
- SCHOOLL, R.L.; HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Improvements of the nitrite color development in assays of nitrate reductase by phenazine methosulfate and zinc acetate. *Plant Physiology*, Washington, v.53, n.3, p.825-828, 1974
- SEITH, B.; SETZER, B.; FLAIG, H.; MOHR, H. 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.2, p.419-426, 1994
- SERNA, M.D.; BORRAS, R.; LEGAZ, F.; PRIMO-MILLO, E. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. *Plant and Soil*, Netherlands, v.147, n.1, p.13-23, 1992

- SHORROCKS, V.M. Mineral nutrition, growth and nutrient cycle of *Hevea brasiliensis*. I. Growth and nutrient content.. journal of the Rubber Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, v.19, n.1, p.1-8, 1965
- SHELP, B.J. Plant characteristics and nutrient composition and mobility of Broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) supplied with NH_4^+ , NO_3^- or NH_4NO_3 . Journal of Experimental Botany, Oxford, v.38, n.195, p.1603-1608, 1987
- SILVA, F.L.I.M.; ROSSIELLO, R.O.P. e FERNANDES, M.S. Efeitos da nutrição amoniacal com e sem "N-serve" sobre o crescimento radicular do milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 20, Belém, 1985. Resumos... Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1985. p.104
- SINGH, R.P.; SRIVASTAVA, H.S. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.66, n.3, p.413-416, 1986
- SMIRNOFF, N.; TODD, P.; STEWART, G.R. The occurrence of nitrate reduction in the leaves of woody plants. Annals of Botany, v.54, n.3, p.363-374, 1984
- SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L.; OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. Plant Physiology, Washington, v.72, n.4, p.949-952, 1983
- SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. Review. Phytochemistry, Elmsford, v.19, n.3, p.725-733, 1980
- SRIVASTAVA, H.S.; SINGH, R.P. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. Phytochemistry, Elmsford, v.26, n.2, p.597-610, 1987

- STEWART, G.R.; OREBAMJO, T.O. Some unusual characteristics of nitrate reduction in *Erythrina senegalensis*. *New Phytologist*, Cambridge, v.83, n.1, p.311-319, 1979
- STREETER, J.G.; BOSLER, M.E. Comparison *in vitro* and *in vivo* assay for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiology*, Washington, v.49, n.3, p.448-450, 1972
- SUZUKI, A.; GADAL, P.; OAKS, A. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta*, New York, v.151, n.2, p.457-461, 1981
- THIBAUD, J.B.; GRIGNON, C. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. *Plant Science Letters*, Limerick, v.22, n.1, p.279-289, 1981
- VEZIMA, L.P.; HOPE, H.P.; JOY, K.W. Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* Pers.). *Plant Physiology*, Washington, v.83, n.1, p.58-62, 1987
- VEZIMA, L.P.; LANGLOIS, J.R. Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Physiology*, Washington, v.90, n.6, p.1129-1133, 1989
- WALLACE, W. A nitrate reductase inactivating enzyme from maize roots. *Plant Physiology*, Washington, v.52, n.3, p.197-201, 1973
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta*, New York, v.154, n.2, p.473-476, 1982
- WAREING, P.F.; PATRICK, J. Source-sink relations and the partition of assimilates in the plant. In: Cooper, J.P. (ed) *Photosynthesis and productivity in different environments*. London: Cambridge Press, 1975. p.481-499

- WARNCKE, D.D.; BARBER, S.A. Ammonium and nitrate uptake by corn, (*Zea mays* L.) as influenced by nitrogen concentration and $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratios. *Plant Physiology*, Washington, v.45, n.2, p.486-493, 1973
- WIGNARAJAH, K. Characterization of the *in vivo* nitrate reductase activity in the roots and leaves of *Eichhornia crassipes*. *Annals of Botany*, Ottawa, v.65, n.5, p.525-528, 1990
- YAMAYA, T.; AHIRA, K. Reversible inactivation of nitrate reductase by inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant Cell Physiology*, Tokyo, v.19, n.4, p.1085-1089, 1978
- YAMAYA, T.; OAKS, A.; MATSUMOTO, H. Characteristics of glutamate dehydrogenase in maize shoots. *Plant Physiology*, Washington, v.76, n.4, p.1009-1013, 1984
- YAMAYA, T.; SOLOMONSON, L.P.; OAKS, A. Action of corn and rice inactivating proteins on a purified nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, Washington, v.65, n.1, p.145-160, 1980
- YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, London, v.80, p.209-213, 1955
- YU, J.; WOO, K.C. Glutamine transport and the role of the glutamine translocator in chloroplasts. *Plant Physiology*, Washington, v.88, n.4, p.1048-1054, 1988

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is mirrored and difficult to decipher.

RELIQUA CENTRO-ITALIA

