

ANDREA YU KWAN VILLAR SHAN

**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM
PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA [*Hevea
brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg] E
CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS DURANTE
O ARMAZENAMENTO DE SEMENTES**

**LAVRAS - MG
2012**

ANDREA YU KWAN VILLAR SHAN

**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE
SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.)
Muell. Arg.] E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS DURANTE
O ARMAZENAMENTO DE SEMENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área
de concentração em Fisiologia Vegetal, para a
obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS – M.G.

2007

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

Shan, Andrea Yu Kwan Villar.

Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira
[*Hevea brasiliensis* (willd. Ex. Adr. De juss.) Muell. Arg.] e
caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes /
Andrea Yu Kwan Villar Shan. – Lavras : UFLA, 2012.

115 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. Aminoácidos. 2. Proteína solúvel. 3. Enzimas. 4. Ácidos
graxos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.8952

ANDREA YU KWAN VILLAR SHAN

**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE
SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Ahr. De Juss.) Muell. Arg.]
E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS DURANTE O
ARMAZENAMENTO DE SEMENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 31 de maio de 2007

Dr. Nelson Delú Filho

Faculdade de Fisiologia,

Ciências e Letras de Boa Esperança - FAFIBE

Prof. Dra. Ângela Maria Soares

UFLA

Dr. Alessandro Carlos Mesquita

UFLA

Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome

UFLA

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

UFLA

(Orientador)

LAVRAS – M.G

2007

Ao meu pai, Shan (*in memoriam*),

que sempre sonhou...

aos meus filhos, Lucas, Túlio e Mateus,

minhas motivações principais.

DEDICO

Ao meu marido, Antônio, por estar sempre presente.

A minha mãe, Neide, pelo amor, carinho, apoio e constante torcida.

Aos eternos amigos, pelo companheirismo e força

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, meu principal Apoio, que me oferece, a cada dia, vida, amor, conforto nas horas de refúgio e a possibilidade de ser feliz, até nos piores momentos da vida. Abençoe-me sempre!

Aos meus filhos, Lucas e Túlio, pela alegria e amor infinito, que me fizeram sentir viva nos tantos momentos difíceis vividos.

Ao meu caçula, Mateus, que chegou depois de tudo, mas que preenche todos os dias da minha vida.

Ao meu marido, Antônio Américo, que tentou compreender minhas ausências e sempre esteve ao meu lado.

A minha mãe, Neide Villar Shan, pelo exemplo de bondade, esperança e fé em um futuro sempre melhor.

Aos meus irmãos, Alexandre e Leandro, e minha querida sobrinha Sandy, pela constante torcida.

Aos meus sogros, Antônio Américo Cardoso e Maria Aparecida C.C. Cardoso, especialmente, pela atenção, preocupação e disposição sempre.

Ao meu querido orientador, Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, por acreditar na minha capacidade, incentivando-me sempre, com uma palavra amiga e braços abertos, pronto a ajudar e pela imensa paciência para a finalização deste trabalho.

Ao professor Dr. Nelson Delú-Filho, pela constante presença e direcionamento dentro do grupo Hevea.

Aos professores do Setor de Fisiologia, pela boa convivência nesses tempos difíceis.

A minha grande amiga Ana Carolina que muito me ajudou na realização das análises de CG/EM, muito obrigada.

Aos meus grandes amigos conquistados na batalha, Alessandro Carlos de Mesquita e Lisandro Tomas da Silva Bonome, pelas boas conversas pessoais e profissionais. Especialmente a você, Lisandro, pela atenção e preocupação, dedicando parte do seu tempo à finalização deste trabalho, obrigada, você foi mais que um irmão!

A Teresa (de Sá de cá de lá – rrsr) pela disposição na finalização do trabalho. “Tava perdida sem vc!!”

A minha grande família do laboratório, aqueles que sempre trabalham nos bastidores, alunos de iniciação e estagiários para sempre guardados no meu coração: Ana Carla (minha pupila!), Genáina, Matheus e Anderson, meu muito obrigada, pela ajuda experimental e, principalmente, pela amizade, carinho e boas risadas. Ó, tô esperando vocês em Aracaju!

Àqueles que passaram por ‘nossa casa’ e deixaram saudades...

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação.

RESUMO GERAL

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. **Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg.] e caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes.** LAVRAS: UFLA, 2011. 115p. (Tese - Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

Este trabalho objetivou estudar a assimilação de nitrogênio sob a influência de diferentes fontes de nitrogênio e tempos de exposição, bem como analisar as alterações lipídicas das sementes submetidas ao armazenamento. Para atender ao primeiro objetivo, foi montado um experimento em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, em que plantas de seringueira foram cultivadas na ausência de nitrogênio e na presença de amônio ou nitrato, sendo, posteriormente, avaliadas quanto à concentração de nitrogênio total, aminoácidos, proteínas solúveis, nitrato, amônio e às atividades enzimáticas da RN, GS, NADH-GOGAT, GDH, a 0 e aos 27 dias após a indução dos meios de cultivo, constituindo-se um fatorial 3x2. Os resultados mostraram que as plantas cultivadas na presença de amônio apresentaram maior incorporação de nitrogênio, refletido em maior acúmulo de aminoácidos e proteínas. Onde maior acúmulo de N foi observado nos caules e aminoácidos nas raízes e caules enquanto àquelas cultivadas na presença de nitrato, o maior acúmulo de proteínas solúveis foi visto nas raízes e caules. A forma nitrogenada promove respostas diferenciadas com relação ao comportamento das enzimas do metabolismo do nitrogênio. Assim, a assimilação tanto da forma nítrica quanto amoniacal acontece via GS/GOGAT, no entanto, existe uma forte dependência entre a atividade da GS e o *pool* de nitrato celular, bem como entre a atividade da GDH e o *pool* de amônio celular. Com relação à assimilação do nitrogênio nas diferentes partes do vegetal, concluiu-se que: o nitrogênio nítrico é em parte assimilado nas raízes, preferencialmente via GS/GOGAT, com pequena participação da GDH e a outra parte é translocada para os tecidos meristemáticos dos caules, onde é armazenado e ou assimilado; o nitrogênio amoniacal é assimilado totalmente nas raízes via GS/GOGAT e com significativa participação da GDH; a alta atividade da enzima GS nas folhas demonstra sua participação tanto na assimilação primária como na reassimilação do amônio fotorrespirado, independente da fonte nitrogenada fornecida; a enzima GDH foliar foi detectada, ainda que em papel secundário, independente das fontes ou

* Comitê Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira- UFLA (Orientador)

tempo de exposição. A atividade da RN *in vitro* foi maior nas plantas que receberam nitrato, sendo detectada nas raízes e nos caules e não detectada nos tecidos foliares, embora todos os indícios apontem para a sua participação no metabolismo, sugerindo que seja realizado ensaios mais sensíveis para detecção da enzima nesse tecido. As alterações lipídicas das sementes armazenadas a 0, 65 e 105 dias foram observadas por meio da determinação da composição química do óleo por análise de CG/EM, obtido por extração contínua em éter etílico. Os resultados demonstraram que a 0 dia de armazenamento, o óleo tem como constituintes os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, sendo este último mais abundante. Aos 65 dias, observou-se o aparecimento do ácido oleico e, aos 105 dias, o desaparecimento do ácido linolênico, tendo o ácido oleico, nesse período, sido o composto de maior abundância. Assim, conclui-se que o tempo de armazenamento diminuiu o grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo essa redução provocada por peroxidação.

Palavras-chave: Metabolismo de nitrogênio. Enzimas. Lipídeos. Caracterização. Armazenamento.

GENERAL ABSTRACT

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. **Nitrogen assimilation in seedlings of rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. FROM JUSS.) MUELL. ARG.] and lipids characterization of seed storage**. LAVRAS: UFLA, 2011. 115p. (Thesis – Doctorate in Agronomy/ Plant Physiology)*

The aim of this work was studying nitrogen compounds and enzyme assimilation activity pattern distribution under influence of different nitrogen sources as well as to analyze lipids alterations in seeds submitted to storage, from an experiment conducted in greenhouse. Ammonium and nitrate were supplied as nitrogen form in the concentration of 8mM and no nitrogen as a control. Plants were growth in plastic vases contained wash sand and nitrogen solution renewed in the seven days interval. From 0 to 27 days were evaluated total nitrogen concentration, amino acids, soluble protein, nitrate and ammonium from roots, enzyme assimilation activity nitrogen from stem and leaves. The treatments were obtained by the combination among three sources (nitrogen absence, ammonium and nitrate) and two times of exposition (from 0 to 27 days) as factorial 3X2 in randomized design with four repetitions and the average tested by Tukey test to 5%. The results permitted conclude that the plants growth in ammonium presence showed high nitrogen incorporation what meant high amino acids and protein accumulation. The nitrogen forms promoted different answers in relation to enzyme activity pattern from nitrogen metabolism. Therefore, the assimilation both nitrate and ammonium occur by GS/GOGAT; however, there is strong dependence between the GS activity and the cellular nitrate pool as well between GDH activity and the ammonium cellular pool. In relation to nitrogen assimilation at different parts of the plant it could conclude that the nitric nitrogen is in part assimilated by roots preferentially via GS/GOGAT, with little GDH participation and the other part is translocated to meristematic tissue of stem where is storage or assimilated; ammonium nitrogen is assimilated totally at the roots by GS/GOGAT with significant participation of GDH; the high enzyme activity in the leaves demonstrate its participation both primary assimilation as ammonium re-assimilation. GDH leaves was detected, despite in secondary, independent paper of the sources or time of exposition. RN activity *in vitro* was higher in the plants that had received nitrate, being detected in the roots and stems and not detected in leaves, even so all the indications points with respect to its participation in the

* Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Adviser).

metabolism, suggesting that a more sensible assays. The lipid modification in seeds storage from 0, 60 and 105 days to evaluate the chemistry oil composition by GC/MS by continuous extraction with ethyl ether in soxhlet apparatus. It can be observed by results that the rubber tree seeds oil to 0 day of storage has as constituents palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, being the latter more abundant. At 60 days is observed the oleic acid appearance and at 105 days the total disappearance of linolenic acid and oleic acid in this period is the most abundant compound. Thus, it can be conclude that during storage the number of unsaturated fatty acids is a reduced in function of lipid peroxidation.

Key-words: Nitrogen metabolism. Enzymes. Lipids. Characterization. Storage.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Concentração de nitrogênio total em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG46
- FIGURA 2 Concentração de nitrogênio total em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG48
- FIGURA 3 Concentração de aminoácidos livres em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG51
- FIGURA 4 Concentração de aminoácidos livres em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG52

FIGURA 5	Teor de proteínas solúveis totais em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG54
FIGURA 6	Teor de proteínas solúveis totais em em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG55
FIGURA 7	Concentração de nitrato em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG57
FIGURA 8	Concentração de nitrato em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG58
FIGURA 9	Concentração de amônio em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG60

FIGURA 10	Concentração de amônio em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG61
FIGURA 11	Atividade da Redutase do nitrato em raízes (A) e caules (B) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG67
FIGURA 12	Atividade da Glutamina sintetase (GS) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG70
FIGURA 13	Atividade da Glutamato sintase (NADH-GOGAT) em raízes (A) e caules (B) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG73
FIGURA 14	Atividade da Glutamato desidrogenase (GDH) em raízes (A) e caules (B) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH ₄ ⁺) ou nitrato (N-NO ₃ ⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG75

FIGURA 15 Cromatograma do óleo de sementes de seringueira não tratadas à temperatura ambiente ao zero dia de armazenamento. UFLA, Lavras, MG.....	023
FIGURA 16 Cromatograma do óleo de sementes de seringueira não tratadas à temperatura ambiente aos 60 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG.....	104
FIGURA 17 Cromatograma do óleo de sementes de seringueira não tratadas à temperatura ambiente aos 105 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG.....	065

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição da solução nutritiva em função dos diferentes tratamentos utilizados no experimento. UFLA, Lavras, MG.	.39
TABELA 2	Compostos nitrogenados presentes em sementes de seringueira armazenadas por um período de três meses. UFLA, Lavras, MG44
TABELA 3	Percentual de redução ou acúmulo de compostos nitrogenados em plantas jovens de seringueira cultivadas na ausência de N (0/0) e na presença de amônio (0/8) ou nitrato (8/0), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). UFLA, Lavras, MG63
TABELA 4	Composição lipídica de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, a zero dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG	103
TABELA 5	Composição lipídica de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, aos 60 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG	105
TABELA 6	Composição lipídica de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, aos 105 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG	107

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira [<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. Ex. Adr. De Juss.) Muell. Arg.]...18
1	INTRODUÇÃO23
2	REFERENCIAL TEÓRICO26
2.1	Nitrogênio26
2.2	Aspectos fisiológicos da absorção e assimilação do nitrato e do amônio...27
2.3	Enzima Redutase do nitrato30
2.4	Enzimas de assimilação do amônio32
3	MATERIAL E MÉTODOS36
3.1	Aquisição das sementes36
3.2	Análises das sementes.....36
3.2.1	Obtenção dos extratos brutos.....37
3.2.2	Determinação de aminoácidos livres37
3.2.3	Determinação do N-nítrico (N-NO ₃ ⁻).....37
3.2.4	Determinação do N-amoniacal (N-NH ₄ ⁺).....37
3.2.5	Determinação do Nitrogênio total (NT).....38
3.3	Cultivo e análises das plantas38
3.3.1	Sistemas de cultivo e condições experimentais38
3.3.2	Análises das plantas40
3.4	Análise dos dados43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....44
4.1	Análises bioquímicas das sementes44
4.2	Análises bioquímicas das plantas.....45
4.2.1	Determinação do N total45
4.2.2	Determinação de aminoácidos50
4.2.3	Determinação de proteínas solúveis totais.....53

4.2.4	Determinação do N-nítrico	56
4.2.5	Determinação do N-amoniaco	59
4.2.6	Considerações	63
4.3	Análises enzimáticas	66
4.3.1	Atividade da Redutase do nitrato (RN).....	66
4.3.2	Atividade da Glutamina Sintetase (GS).....	69
4.3.3	Atividade da Glutamato sintase (NADH-GOGAT).....	72
4.3.4	Atividade da Glutamato Desidrogenase (GDH)	74
5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	CAPÍTULO 2 - Caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes.....	89
1	INTRODUÇÃO	92
2	REFERENCIAL TEÓRICO	94
3	MATERIAL E MÉTODOS	98
3.1	Aquisição das sementes	98
3.2	Preparação do material vegetal	98
3.3	Análise do óleo vegetal.....	99
3.3.1	Obtenção do óleo	99
3.3.2	Determinação da composição química	99
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
	ANEXOS	112

CAPÍTULO 1

ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis* (willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg.]

RESUMO

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg.]. In: **Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg.] e caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes**. LAVRAS: UFLA, 2011. Cap 1, p. 18-88 (Tese – Doutorado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal)*

O objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição dos compostos nitrogenados e o padrão de atividade das enzimas de assimilação sob a influência de diferentes fontes de nitrogênio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante 4 meses, onde a partir do terceiro mês foram fornecidos ao meio de cultivo os seguintes tratamentos: nitrogênio na forma de amônio ou nitrato na concentração de 8 mM e sem nitrogênio, como controle. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos contendo areia lavada e as soluções, renovadas em intervalos de sete dias. A 0 e aos 27 dias, foi avaliada a concentração de nitrogênio total, aminoácidos, proteínas solúveis, nitrato e amônio nas raízes, caules e folhas, bem como as atividades das enzimas de assimilação do nitrogênio. Os tratamentos foram obtidos pela combinação entre três fontes (ausência de nitrogênio, amônio ou nitrato) e dois tempos de exposição (0 e 27 dias), constituindo um fatorial 3x2, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, cujas médias foram testadas segundo Tukey, a 5%. As plantas cultivadas na presença de amônio apresentam maior incorporação de nitrogênio, refletido em maior acúmulo de aminoácidos e proteínas. As formas nitrogenadas promovem respostas diferenciadas com relação ao padrão de atividade enzimática das enzimas do metabolismo do nitrogênio. Assim, a assimilação, tanto da forma nítrica quanto amoniacal, acontece via GS/GOGAT; no entanto, existe forte dependência entre a atividade da GS e o *pool* de nitrato celular, bem como entre a atividade da GDH e o *pool* de amônio celular. Com relação à assimilação do nitrogênio nas diferentes partes do vegetal, a forma nítrica é, em parte, assimilada nas raízes, preferencialmente via GS/GOGAT, com pequena participação da GDH, e a outra parte é translocada para os tecidos meristemáticos dos caules, onde é armazenado e ou assimilado; a forma amoniacal é assimilada totalmente nas raízes via GS/GOGAT e com significativa participação da GDH; a alta atividade da enzima GS nas folhas demonstra sua participação tanto na assimilação primária como na reassimilação

*Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA.

do amônio fotorrespirado, independente da fonte nitrogenada fornecida; a enzima GDH foliar é detectada, ainda que em papel secundário, independente das fontes ou tempo de exposição. A atividade da RN *in vitro* é maior nas plantas que receberam nitrato, sendo detectada nas raízes e caules e não detectada nos tecidos foliares, embora todos os indícios apontem sua participação no metabolismo, sugerindo que seja realizado ensaios mais sensíveis para detecção da enzima nesse tecido.

Palavras-chave: Metabolismo de nitrogênio. Enzimas.

ABSTRACT

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. Nitrogen assimilation in seedlings of rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. From Juss.) Muell. Arg.]. In: **Nitrogen assimilation in seedlings of rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. From Juss.) Muell. Arg.] and lipids characterization of seed storage.** LAVRAS: UFLA, 2011. Chapter 1, p.18-88. (Thesis – Doctorate in Agronomy/Plant Physiology)*

The aim of this work was studying nitrogen compounds and enzyme assimilation activity pattern distribution under influence of different nitrogen sources from an experiment conducted in greenhouse. Ammonium and nitrate were supplied as nitrogen form in the concentration of 8mM and no nitrogen as a control. Plants were growth in plastic vases contained wash sand and nitrogen solution renewed in the seven days interval. From 0 to 27 days were evaluated total nitrogen concentration, amino acids, soluble protein, nitrate and ammonium from roots, enzyme assimilation activity nitrogen from stem and leaves. The treatments were obtained by the combination among three sources (nitrogen absence, ammonium and nitrate) and two times of exposition (from 0 to 27 days) as factorial 3X2 in randomized design with four repetitions and the average tested by Tukey test to 5%. The results permitted conclude that the plants growth in ammonium presence showed high nitrogen incorporation what meant high amino acids and protein accumulation. The nitrogen forms promoted different answers in relation to enzyme activity pattern from nitrogen metabolism. Therefore, the assimilation both nitrate and ammonium occur by GS/GOGAT; however, there is strong dependence between the GS activity and the cellular nitrate pool as well between GDH activity and the ammonium cellular pool. In relation to nitrogen assimilation at different parts of the plant it could conclude that the nitric nitrogen is in part assimilated by roots preferentially via GS/GOGAT, with little GDH participation and the other part is translocated to meristematic tissue of stem where is storage or assimilated; ammonium nitrogen is assimilated totally at the roots by GS/GOGAT with significant participation of GDH; the high enzyme activity in the leaves demonstrate its participation both primary assimilation as ammonium re-assimilation. GDH leaves was detected, despite in secondary, independent paper of the sources or time of exposition. RN activity *in vitro* was higher in the plants that had received nitrate, being detected in the roots and stems and not detected

* Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Adviser).

in leaves, even so all the indications points with respect to its participation in the metabolism, suggesting that a more sensible assays.

Key-words: Nitrogen metabolism. Enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da seringueira é bastante explorada mundialmente, por ser a maior fonte natural de borracha. É uma planta pertencente à família Euphorbiaceae e ao gênero *Hevea*, do qual são conhecidas, aproximadamente, 11 espécies, entre as quais destaca-se a *Hevea Brasiliensis* (Willd. ex. Adr. de Juss.) Müell. Arg., por apresentar maior produção de borracha. Originária da região da Amazônia vem se difundindo para as regiões centro-oeste e sudeste do Brasil, devido a dois fatores principais: a grande demanda por borracha natural e a alta incidência de doenças fúngicas.

Associada a isso, a exploração da cultura no Brasil vislumbra grandes benefícios, tanto sócio-econômicos, gerando empregos (cerca de 40 mil empregos diretos e indiretos) e renda, como ambientais, representando uma alternativa à utilização de uma fonte não-renovável, como o petróleo, utilizado na fabricação da borracha sintética. No entanto, a expansão da heveicultura depende do desenvolvimento de tecnologias de cultivo e de exploração apropriadas às condições edafoclimáticas das diferentes regiões, merecendo destaque aquelas acerca dos aspectos fisiológicos relacionados ao processo de assimilação do nitrogênio, por sua essencialidade, como constituinte das mais importantes biomoléculas e por sofrer grandes flutuações na rizosfera ocasionando limitações para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

No solo, o nitrogênio inorgânico disponibilizado para as plantas pode estar na forma de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+), sendo a primeira mais abundante devido ao processo de nitrificação, promovido pelas bactérias do solo, as quais atuam provocando a oxidação do amônio livre. No entanto, dependendo das condições do solo, ácido, por exemplo, a forma amoniacal pode ser mais abundante devido à inibição desses organismos. Na atmosfera, apesar de abundante, somente algumas plantas conseguem obtê-lo por meio da

associação simbiótica com as bactérias fixadoras que desenvolveram mecanismos que permitem reduzir o nitrogênio gasoso (N_2) a amônia e incorporá-lo a esqueletos carbônicos.

O metabolismo do nitrogênio compreende os processos de absorção e assimilação, os quais dependem dos níveis de nitrogênio endógeno e exógeno, da energia disponibilizada, dependendo da forma disponível, bem como da localização e da regulação das enzimas envolvidas, as quais determinam os órgãos ou sítios de assimilação. O nitrato, absorvido pelas raízes, pode ser assimilado nesses órgãos ou nas partes aéreas, ou ainda nas duas, enquanto o amônio, por seus efeitos tóxicos, é geralmente assimilado nas raízes.

A assimilação do nitrato é feita por meio da redução a nitrito pela ação da enzima redutase do nitrato (RN), citossólica. O nitrito produzido é posteriormente reduzido a amônio pela enzima redutase do nitrito (RNi), plastídica. O amônio absorvido ou produzido pela assimilação do nitrato, ou ainda oriundo da fotorrespiração, é incorporado a aminoácidos, glutamina e glutamato, pelas enzimas de assimilação do amônio, glutamina sintetase (GS) e glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), respectivamente. Outra importante enzima é a glutamato desidrogenase (GDH), que participa de uma rota alternativa para assimilação do amônio, realizando a catálise reversível da aminação ou desaminação do glutamato e embora sua principal função seja no sentido da desaminação, a enzima também participa da aminação, ainda que em um papel secundário.

Para a seringueira, trabalhos contínuos vêm sendo realizados na busca pelo conhecimento acerca do metabolismo de nitrogênio. Na germinação, foram avaliadas as alterações ocorridas durante o processo de mobilização de reservas nitrogenadas da semente. Nos estádios iniciais de crescimento, foram avaliadas as alterações na distribuição de fitomassa e na atividade das enzimas de redução e assimilação do nitrogênio diante do fornecimento de apenas uma forma de

nitrogênio ou ambas, em diferentes proporções. Nestes trabalhos levantou-se a questão de que a seringueira respondia ao crescimento diferentemente quanto à forma nitrogenada de absorção e à atividade das enzimas de assimilação. Outros trabalhos buscaram identificar as alterações ocorridas na forma de transporte de nitrogênio e trouxeram a informação de que o nitrato era assimilado nas raízes e transportado via xilema para outros sítios de armazenamento e ou assimilação. No entanto, apesar de realizados estudos cinéticos da atividade da redutase do nitrato (RN) radicular *in vivo*, a enzima ainda não foi detectada nos tecidos foliares, o que não significa sua inexistência, pois o método de ensaio utilizado pode não ter sido eficiente para a detecção da atividade enzimática naquele tecido. Além disso, pela quantidade de nitrato significativa sendo transportado no xilema, considera-se a possibilidade dos tecidos radiculares serem preferenciais, mas não únicos.

Dessa forma, em continuidade aos trabalhos já desenvolvidos com a seringueira, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o metabolismo do nitrogênio, por meio do conhecimento dos efeitos da absorção de nitrato ou amônio, sobre o nível de metabólitos nitrogenados, bem como sobre o comportamento das enzimas das vias metabólicas responsáveis por sua assimilação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nitrogênio

Dentre os processos fisiológicos vegetais mais importantes está o metabolismo do nitrogênio. O nitrogênio (N) é considerado um elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas que, por sua vez, integram complexas vias metabólicas altamente reguladas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, o nitrogênio é o macronutriente mais limitante ao crescimento das plantas já que, além de a sua concentração ser muito baixa no solo, é perdido facilmente por lixiviação e volatilização, dependendo de sua forma mineral e, ainda, pode ser consumido por microrganismos (MIFLIN; HABASH, 2002).

Em ecossistemas naturais, as fontes de nitrogênio são a atmosfera e a matéria orgânica presente no solo. Na atmosfera, embora o nitrogênio molecular (N_2) contribua com 78%, sua abundância não é refletida em disponibilidade para as plantas, devido à sua grande estabilidade química. Entretanto, algumas plantas conseguem estabelecer uma associação simbiótica com bactérias fixadoras de N_2 e essa associação é capaz de fornecer mais de 90% do nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento vegetal (VALARINI; GODOY, 1994).

No solo, o nitrogênio é utilizado pelas plantas principalmente sob as formas nítrica (NO_3^-) ou amoniacal (NH_4^+), sendo a primeira mais abundante, devido à ação de bactérias nitrificantes que promovem a oxidação de amônio livre, num processo chamado nitrificação. Entretanto, condições ácidas do solo, inibem a ação desses microrganismos, mantendo os íons amônio protonados e retidos na carga líquida negativa do solo. Em contrapartida, o nitrato é mais susceptível à lixiviação e, apesar de conhecidas as variáveis que podem conduzir à disponibilidade de uma forma ou outra de nitrogênio, ambas podem ser

absorvidas pelas plantas em taxas e proporções que dependem tanto dos fatores genéticos como ambientais (FERNANDES; ROSSIELLO, 1995).

Diferentes espécies ou, até mesmo, genótipos de uma espécie vegetal podem apresentar preferências por nitrato e ou amônio, dependendo das pressões seletivas e consequentes adaptações fisiológicas oriundas da disponibilidade de nitrogênio e carboidratos, pH, temperatura e intensidade luminosa (FORDE; CLARSON, 1999). Assim, o metabolismo do nitrogênio que compreende os processos de absorção, assimilação e mobilização envolve mecanismos para máxima eficiência de utilização do nitrogênio, em que se inclui um sistema complexo de vias metabólicas reguladas que se alternam em função do armazenamento, da remobilização, da assimilação 'de novo', da reciclagem durante a fotorrespiração e da distribuição entre as vias primárias e secundárias do metabolismo (STITT *et al.*, 2002).

2.2 Aspectos fisiológicos da absorção e assimilação do nitrato e do amônio

A absorção do nitrato ocorre pelo processo ativo secundário, em sistema simporte, contra um potencial eletroquímico, com transporte simultâneo de H^+ e NO_3^- para dentro das células, numa relação de 2:1, sendo o custo energético para esta absorção de 2 moles de ATP para cada mol de NO_3^- absorvido (IMSANDE; TOURAINE, 1994). Quanto à absorção do amônio, ocorre por via de sistema uniporte, por um processo passivo e, ao contrário da absorção do nitrato, o amônio está prontamente disponível para incorporação, sem necessidade de gastos energéticos. No entanto, a taxa de absorção de nitrogênio depende ainda da expressão dos transportadores específicos das formas absorvidas e da disponibilidade de nitrogênio exógeno.

Vidmar *et al.* (2000) demonstraram que ambos, o influxo de nitrato e a abundância de transcritos de transportadores, caíram simultaneamente em raízes tratadas com aminoácidos exógenos e concluíram que, dentre os aminoácidos conhecidos, a glutamina é a principal responsável pela inibição da expressão de transportadores de nitrato. Mais tarde, resultados de outros experimentos, conduzidos por Glass *et al.* (2002) e Thorton (2004), corroboraram os de experimentos anteriores, demonstrando que o nível da glutamina endógena é responsável pela regulação dos transportadores de nitrato e amônio, sendo os primeiros mais influenciados em nível de expressão.

Além disso, em trabalhos de Rufty *et al.* (1989) foi demonstrado que a capacidade de absorver nitrogênio também variou em função da maior disponibilidade de carboidratos. Mais tarde, Huppe e Turpin (1994) mostraram que os carboidratos provenientes da parte aérea são essenciais para disponibilizar energia para o processo de absorção do nitrogênio. Em adição, estudos de Lejay *et al.* (2003), por meio de diluição isotópica de ^{15}N , indicaram um contínuo aumento do influxo de amônio a partir do final do período de luz, justificando esse fato à produção de fotoassimilados necessários para a posterior assimilação.

Após a absorção pela planta, o nitrogênio inorgânico é incorporado à forma orgânica pelos processos assimilatórios. Os processos de absorção e assimilação são altamente sincronizados, embora, sob concentrações elevadas, a absorção do amônio e do nitrato possa exceder a capacidade da planta em assimilar esses íons (FORDE; CLARKSON, 1999). Contudo, com relação ao nitrato, o equilíbrio entre esses processos pode ser mais bem estabelecido, pois altos níveis absorvidos podem ser acumulados no vacúolo ou translocados através dos tecidos, sem efeitos prejudiciais. Tratando-se do amônio, altos níveis nos tecidos podem gerar toxidez (BRITO; KRONZUCKER, 2001).

No entanto, a taxa de assimilação depende, sobretudo, da energia necessária para os processos de assimilação e da expressão das enzimas envolvidas no processo. Solomonson e Barber (1990) relataram que mais de 25% da energia proveniente da fotossíntese era direcionada para a assimilação do nitrato. Bloom, Sukrapanna e Warner (1992) estimaram que 23% de toda energia produzida na raiz era destinada ao metabolismo do nitrato, enquanto para o amônio, apenas 14%. Em contrapartida, o baixo custo energético para a assimilação do amônio não é vantajoso quando um excesso de amônio é absorvido, pois os processos de detoxificação também despendem energia (RAAB; TERRY, 1995).

Com relação às enzimas de assimilação, quando a forma é o nitrato, este é reduzido primeiramente pela ação da enzima Redutase do Nitrato (RN) localizada no citosol das células e, posteriormente, o nitrito produzido é reduzido a amônio pela enzima Redutase do Nitrito (RNi), localizada nos plastídeos. O amônio, produto final da redução do nitrato, é então incorporado em aminoácidos pela ação das enzimas de assimilação do amônio, Glutamina Sintetase (GS) e Glutamato Sintase (GOGAT) (MIFLIN; LEA, 1976) e ou Glutamato Desidrogenase (GDH) (LEA; MIFLIN, 1974).

Os sítios de assimilação do nitrogênio variam de acordo com a concentração e a forma de nitrogênio disponível e, sobretudo, com a localização das enzimas do metabolismo. De forma geral, em concentrações baixas de nitrato e ou amônio, a redução ocorre preferencialmente nas raízes, conduzindo à dependência da importação de fotoassimilados produzidos nas folhas, para gerar energia e fornecer esqueletos de carbono para o processo de incorporação do nitrogênio (OAKS, 1994). Ao contrário, em altas concentrações de nitrato, o armazenamento e o transporte para as partes aéreas são preferenciais, em virtude da maior disponibilidade de poder redutor, energia e de fotoassimilados (SECHLEY; YAMAYA; OAKS, 1992).

O mesmo comportamento não pode ser descrito quando a forma nitrogenada é o amônio, já que, devido à sua natureza tóxica, é prontamente assimilado nas raízes, embora Finnemann e Schjoerring (1999) tenham demonstrado a presença de altas concentrações de amônio na seiva do xilema de *Brassica napus*, sugerindo que o amônio estaria sendo translocado para outros sítios de assimilação.

Enfim, sabe-se que a maioria das espécies herbáceas de ciclo curto possui sítio de assimilação foliar e, tratando-se de espécies perenes, uma classificação feita por Andrews (1986) separou-as em: aquelas que assimilam preferencialmente nas folhas – perenes de clima tropical – e nas raízes – perenes de clima temperado. A seringueira é uma planta perene, semidecídua, heliófita, de clima temperado (LORENZI, 2000).

2.3 Enzima Redutase do Nitrato

A enzima Redutase do Nitrato (RN) é a principal porta de entrada de nitrogênio nítrico no metabolismo vegetal (MIFLIN; LEA, 1976). São conhecidas três isoformas da RN: duas constitutivas (uma dependente de NAD(P)H-RN e outra dependente de NADH-RN, ambas com pH ótimo em 6.5; E.C. 6.1.1.2) (ORIHUEL-IRANZO; CAMPBELL, 1980) e uma induzida (dependente de NADH-RN com pH ótimo em 7.5; E.C. 6.1.1.1) (SOLOMONSON; BARBER, 1990). A enzima induzida é a isoforma que melhor responde ao fluxo de nitrato celular enquanto as isoformas constitutivas estariam envolvidas com as alterações celulares dos níveis de óxido nítrico e dióxido de nitrogênio (DEAN; HARPER, 1988).

A atividade da enzima é modulada pelo mecanismo de fosforilação/desfosforilação de um resíduo de serina e pela consecutiva ligação/quebra da enzima fosforilada à proteína 14-3-3, tendo como cofatores cátions divalentes como o magnésio e o cálcio (WEINER; KAISER, 2001).

A regulação da RN acontece tanto a nível transcricional como pós-traducional, sendo esta última mais significativa. Alguns estudos demonstraram que a regulação transcricional é mediada por nitrato, luz, fito-hormônios e fotoassimilados enquanto a regulação pós-traducional por fosforilação/desfosforilação, luz, disponibilidade de oxigênio e gás carbônico (KAISER; HUBER; 1994, LEA *et al.*, 2006). Da mesma forma, o acúmulo de produtos *downstream*, tais como glutamina, glutamato e asparagina, exercem, em condições normais, um *feedback* negativo sobre a expressão da RN (STITT *et al.*, 2002). Fan *et al.* (2006) sugeriram que nesse tipo de regulação há uma mudança dos níveis de transcritos de transportadores de nitrato além da modificação pós-traducional da RN, mas a regulação ainda é discutida.

Em seringueira, Delú-Filho *et al.* (1998) observaram que a atividade da RN radicular *in vivo* foi influenciada positivamente até a concentração de 12 mM de nitrato. Similarmente, Lemos *et al.* (1999), utilizando diferentes fontes de nitrogênio combinadas ou não, verificaram que a atividade da RN aumentou no tratamento em que foi utilizado somente o nitrato enquanto com o acréscimo de amônio ao meio, diminuiu. Alves (2001), trabalhando com plantas jovens de seringueira, demonstrou existir atividade da RN radicular no tempo zero em relação à aplicação dos tratamentos, sugerindo que a enzima é pré-existente nas raízes em consequência da mobilização de nitrato armazenado nas sementes. No mesmo trabalho, constatou-se a presença de nitrato na seiva do xilema, sugerindo que o transporte desse íon foi um mecanismo de controle para evitar o acúmulo de nitrito e amônio nos tecidos da raiz. No entanto, a atividade foliar não foi detectada pelo método *in vivo* utilizado.

2.4 Enzimas de assimilação do amônio

Em tecidos vegetais, o amônio assimilado pode vir da redução do nitrato e do suplemento de amônio exógeno (assimilação primária) ou da fotorrespiração e do catabolismo de aminoácidos e outros compostos nitrogenados (assimilação secundária) bem como da fixação simbiótica (HIREL; LEA, 2001). Sabe-se que as enzimas glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT; EC 1.4.1.14), que formam o ciclo GS/GOGAT, e a enzima glutamato desidrogenase (GDH; EC 1.4.1.2), estão envolvidas nesses processos, sob forma de várias isoenzimas localizadas em distintos compartimentos celulares, tecidos e órgãos (MIFLIN; LEA, 1976).

A GS catalisa a primeira reação da assimilação do amônio, sintetizando glutamina a partir de glutamato e amônio, com gasto energético de um ATP. Atualmente, são conhecidas duas isoenzimas de GS: a citossólica (GS1) e a plastídica (GS2), que desempenham funções diferentes em detrimento de sua localização e estágio de desenvolvimento vegetal (MacNALLY *et al.*, 1983).

A isoenzima GS2 é predominantemente encontrada em tecidos foliares, especificamente nos cloroplastídeos das células do mesófilo, enquanto a isoenzima GS1 é predominantemente encontrada em tecidos aclorofilados, como de sementes, raízes, flores e nódulos (EDWARDS; WALKER; CORUZZI, 1990). A predominância da isoenzima GS2 em tecidos foliares é um forte indicativo de que a assimilação de amônio é dependente de sua ação e seu baixo valor de Km a coloca como responsável pela reassimilação de amônio fotorrespirado (WOO; OSMOND, 1982).

Adicionalmente, Miflin e Habash (2002) afirmaram que, para a manutenção do balanço de carbono e nitrogênio, a GS também pode ser localizada em tecidos e órgãos envolvidos com a geração e transporte de N reduzido.

Entretanto, a proporção das isoenzimas depende do estado fisiológico da planta. Em alguns trabalhos, a função da GS1 estaria envolvida com a remobilização de compostos nitrogenados quando há certa limitação de compostos de carbono, como, por exemplo, em processo de senescência. Vincent *et al.* (1997), trabalhando com linhagem transgênica de *Lotus corniculatus* L. em que superexpressaram o gene de GS1 de soja, demonstraram que a presença da enzima provocou o aparecimento de sintomas precoces de senescência devido à aceleração no processo de remobilização. Mais tarde, Limami *et al.* (2002), trabalhando com sementes de milho, também atribuíram à GS1 a função de remobilização, contudo, durante a germinação de sementes. Já em tecidos de raiz a GS1 é atribuída à função de sintetizar glutamina para o transporte à longa distância (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2006).

A GOGAT é a enzima responsável pela catálise da segunda reação do ciclo GS/GOGAT no qual há a transferência de um grupamento amídico da glutamina para o 2-oxoglurato numa reação de oxirredução. Atualmente, são conhecidas duas isoenzimas que diferem quanto à especificidade pelo poder redutor: uma dependente do NADH (NADH-GOGAT) e outra, de ferredoxina (Fd-GOGAT) e, por consequência, são encontradas em plastídeos de sementes e raízes, e cloroplastídeos dos tecidos foliares, respectivamente (HAYAKAWA *et al.*, 1999).

Suzuki e Rothstein (1997) isolaram um gene que codifica Fd-GOGAT em *Arabidopsis* e demonstraram que sua expressão corresponde a 96% da atividade total da enzima em folhas. Quanto a NADH-GOGAT, Temple, Vance e Gantt (1998), estudando o comportamento das enzimas durante a fixação simbiótica, demonstraram que ela é a principal enzima na assimilação de amônio em nódulos de leguminosas.

A GDH é uma enzima que catalisa reversivelmente a síntese de glutamato a partir de amônio e 2-oxoglutarato. Duas isoenzimas já foram encontradas e diferem quanto à especificidade pelo poder redutor: uma dependente do NADH [NAD(H)-GDH], localizada nas mitocôndrias (YAMAYA; OAKS, 1987) e outra, de NADP(H) [NADP(H)-GDH], localizada nos plastídeos (AUBERT *et al.*, 2001).

A reversibilidade da reação catalisada pela GDH é foco de discussão de vários trabalhos, colocando-a como participativa tanto do anabolismo quanto do catabolismo de aminoácidos, gerando muitas controvérsias em torno da função e da contribuição quantitativa da enzima no metabolismo de nitrogênio (MASCLAUX-DAUBRESSE *et al.*, 2006). Segundo Lancien, Gadal e Hodges (2000), a determinação da direção da reação depende da fonte de nitrogênio e carbono. Normalmente, amônio, glutamina e sacarose favorecem a reação biossintética, e nitrato, glutamato ou qualquer limitação de carbono favorecem o catabolismo para produção de 2-oxoglutarato.

As pesquisas atuais têm sido conduzidas no sentido de elucidar a contribuição quantitativa de cada enzima de assimilação do amônio durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas em diferentes condições ambientais. Mas, a existência de múltiplas isoenzimas, distribuídas em diferentes compartimentos celulares e órgãos, tem gerado resultados divergentes, dificultando a compreensão dos processos assimilatórios. Em adição, sob condições fisiológicas particulares, vias metabólicas alternativas podem ser acionadas e operar conjuntamente ou não, para atender à demanda fisiológica do vegetal (HARRISON *et al.*, 2001).

Em seringueira, Delú-Filho (1994), ao estudar o comportamento das enzimas de assimilação do amônio em plantas jovens de seringueira cultivadas sob diferentes níveis de nitrato, demonstrou serem as folhas os principais sítios de incorporação do amônio; primeiro por não detectar a atividade da GS

radicular e segundo pela atividade significativamente maior das enzimas naquele tecido. Lemos (1996), conduzindo trabalhos similares, porém, utilizando plantas mais jovens e submetidas a diferentes relações de nitrato e amônio, demonstrou serem as raízes o sítio de assimilação primária do amônio, por detectar a participação da GS nas raízes. No entanto, sua atividade não correspondeu à atividade da NADH-GOGAT sendo esta última significativamente superior, sugerindo a importação de glutamina da parte aérea para atender à demanda da enzima como também a participação da enzima GDH no processo anabólico, embora não tenha sido avaliada em seus experimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas (LNMP) e na área experimental do Departamento de Biologia/ setor Fisiologia Vegetal, ambos situados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

Para atender aos propósitos desse estudo, a metodologia constitui-se de duas partes: uma referente às análises bioquímicas em sementes e outra, às análises bioquímicas e enzimáticas em plantas cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio.

3.1 Aquisição das sementes

As sementes de seringueira utilizadas neste experimento foram obtidas de um plantio policlonal, com idade aproximada de 50 anos, localizado na fazenda Água Milagrosa, no município de Tabapuã, São Paulo.

As sementes foram colhidas na primeira quinzena de março de 2006 e transportadas até o LNMP, onde foram armazenadas segundo metodologia descrita por Pereira (1980) e modificada por Bonome (2006).

3.2 Análises das sementes

As sementes, após três meses de armazenamento, foram retiradas de suas embalagens, destegumentadas e, com o auxílio de um bisturi, submetidas à separação do embrião, cotilédone e endosperma e à posterior secagem em estufa de circulação de ar a 100°C até peso constante. Em seguida, o material seco foi moído e armazenado em frascos de vidro até o momento das análises bioquímicas.

3.2.1 Obtenção dos extratos brutos

A obtenção dos extratos foi feita conforme metodologia descrita por Cometti *et al.* (2005) com pequenas modificações. Amostras dos tecidos foram homogeneizadas em etanol 80%, numa proporção de 1:10 (p/v) e submetidas a três extrações sucessivas, em banho termostaticado a 60°C por 30 minutos. Após cada extração, foram centrifugadas, a 10000 xg, por 10 minutos e os extratos etanólicos reunidos e submetidos à secagem a vácuo, a 45°C. Os resíduos obtidos foram ressuspensos em 3 mL de água destilada constituindo-se, portanto, o extrato bruto utilizado para a determinação de aminoácidos livres, N-nítrico e N-amoniaco.

3.2.2 Determinação de aminoácidos livres

A concentração de aminoácidos livres foi determinada conforme método de Yemm e Cocking (1955). O padrão utilizado foi glicina e a expressão da concentração foi em mmol AA.g⁻¹ MS.

3.2.3 Determinação do N-nítrico (N-NO₃⁻)

A concentração de N-nítrico foi obtida conforme método de Cataldo *et al.* (1975), sendo expressa em μmol NO₃⁻.g⁻¹ MS.

3.2.4 Determinação do N-amoniaco (N-NH₄⁺)

A concentração de N-amoniaco foi obtida conforme método de Cataldo, Schrader e Youngs (1974), sendo expressa em μmol NH₄⁺.g⁻¹ MS.

3.2.5 Determinação do nitrogênio total (NT)

A concentração de N-total foi obtida a partir do material vegetal seco e moído, conforme método de Kjeldahl (AOAC, 1998), sendo expressa em mmol N. g⁻¹ MS.

3.3 Cultivo e análises das plantas

3.3.1 Sistemas de cultivo e condições experimentais

As sementes, após seis meses de armazenamento, foram colocadas para germinar em casa de vegetação, utilizando bandejas plásticas contendo areia lavada com água destilada e previamente analisada quanto à inexistência de nitrogênio, pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1998). O pH da areia também foi determinado segundo a metodologia descrita por Delu-Filho (1994), com valores próximos aos obtidos pelo referido autor (pH 5,0).

Aos 20 dias após a germinação, ao atingirem o estágio "palito", as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade da parte aérea e radicular, transplantadas para vasos plásticos de três litros, contendo areia lavada sob as mesmas condições descritas anteriormente e irrigadas com água destilada por um período de sessenta dias, a partir do qual se iniciaram os tratamentos.

Os tratamentos foram induzidos por um período de 27 dias e consistiram da aplicação da solução nutritiva de Bolle-Jones (1957), adaptada por Delu-Filho (1994) e modificada por Lemos (1996), com nitrogênio na concentração de 8 mM, na forma de nitrato ou amônio (Tabela 1). Para as plantas consideradas controle, a solução nutritiva era isenta de qualquer forma de nitrogênio.

Tabela 1 Composição da solução nutritiva em função dos diferentes tratamentos utilizados no experimento. UFLA, Lavras, MG

Sal	Solução estoque (SE)	Proporção de nitrato e amônio (mM)		
		0/0	8/0	0/8
		Volume da SE		
Macronutrientes	mol.L ⁻¹	mL.L ⁻¹		
Ca(NO ₃) ₂	0,5	-	6,0	-
KNO ₃	0,5	-	2,0	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	-	-	6,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	-	-	2,0
CaSO ₄	0,01	150	-	150
KCl	0,5	2,0	-	4,0
MgSO ₄	0,5	2,5	5,0	2,0
NaH ₂ PO ₄	0,5	2,0	2,0	-
K ₂ SO ₄	0,5	2,0	1,0	1,0
CaCl ₂	0,5	-	-	-
Na ₂ SO ₄	0,5	-	-	1,0
Micronutrientes	mmol.L ⁻¹			
H ₃ BO ₃	25	1,0	1,0	1,0
CuSO ₄	0,5	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA	20	1,0	1,0	1,0
H ₂ MoO ₄	0,5	1,0	1,0	1,0
MnSO ₄	2	1,0	1,0	1,0
ZnSO ₄	2	1,0	1,0	1,0
Elemento	Concentração total (mg.L ⁻¹)			
N	112	112	112	
P	31	31	31	
K	117	117	117	
Ca	60	120	60	
Mg	30	60	24	
S	120	96	198	

Foram utilizadas três plantas por vaso, com quatro repetições. Em cada vaso foram adicionados 1.350 mL da solução nutritiva de forma que houvesse um excesso de 150 mL, o qual era coletado em pratos plásticos colocados sob os vasos. Diariamente, a solução contida nos pratos era completada com água destilada, ajustada em pH 6,5, quando necessário e retornada para o vaso. Em intervalos de sete dias as soluções eram renovadas.

Para renovar as soluções, os vasos eram lavados quatro vezes com água destilada e o volume da solução era colocado proporcionalmente à concentração requerida para os tratamentos, considerando a capacidade de retenção de água da areia dos vasos.

Foram realizadas também aplicações do fungicida Kumulus df (BASF) (enxofre 80% e ingredientes inertes 20%) quinzenalmente, para impedir a proliferação de fungos na parte aérea das plantas.

Ao 0 e 27 dias, as plantas foram coletadas, conduzidas ao laboratório, processadas e armazenadas até o momento da realização das análises bioquímicas e enzimáticas.

3.3.2 Análises das plantas

No processamento do material vegetal para as análises, as plantas foram lavadas em água destilada e divididas em parte aérea, caulinar e radicular. Foram utilizados o limbo foliar no estágio D, as regiões meristemáticas do caule, próximas aos ápices, e as raízes adventícias. Posteriormente, uma parte foi submetida à secagem em estufa de circulação de ar, a 100°C, até peso constante, para as análises bioquímicas que seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.2, para análises da semente. A outra parte foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer a -80°C, até a realização das análises enzimáticas.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas à temperatura ambiente, enquanto as enzimáticas, a 4 °C.

3.3.2.1 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a realização dos ensaios da RN, NADH-GOGAT e GDH, o extrato enzimático foi obtido por meio da homogeneização dos tecidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,5, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e EDTA 5mM. Depois, centrifugou-se, a 16.000 xg, por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

Para a realização do ensaio da GS, o extrato enzimático foi obtido por meio da homogeneização dos tecidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,0, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, EDTA 3mM e MgCl₂ 0,01M. Depois, centrifugou-se, a 16.000 xg, por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

Em todas as extrações utilizou-se a proporção de 1:4 (p/v) para raízes e 1:5 (p/v) para caules e folhas, exceto para os extratos obtidos para GS, em que foi utilizada a proporção de 1:3 (p/v) para raízes, 1:4 (p/v) para caules e 1:5 (p/v) para folhas.

Em todos os extratos foi feita a quantificação de proteínas solúveis conforme método de Bradford (1976), utilizando-se *bovine serum albumin* (BSA) como padrão.

3.3.2.2 Ensaio enzimático da Redutase do Nitrato (RN)

A atividade da RN foi quantificada utilizando protocolo descrito por Berger e Harrison (1995) com algumas modificações. Alíquotas do extrato (100-200µL, conforme tecido) foram adicionadas ao meio de reação constituído por tampão fosfato 0,1M pH 7.5, β-NADH 0,2 mM e KNO₃ 10 mM, perfazendo um

volume final de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de NADH, após a incubação do meio, por 3 minutos, a 30°C. A oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340nm, durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto. A quantificação foi feita a partir dos 5 minutos de decaimento. A atividade total da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADH. min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MF}$.

3.3.2.3 Ensaio enzimático da Glutamina Sintetase (GS)

A atividade da GS foi determinada segundo a metodologia descrita por Purcino *et al.* (1996) em que alíquotas (200-500 μL , conforme tecido) do extrato foram adicionadas ao meio de reação constituído de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5, β -mercaptoetanol 0,01 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02M, $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,01M, glutamato monossódico 0,05M e ATP 0,01M perfazendo um volume final de 1 mL. A mistura foi incubada, a 30°C, durante 30 minutos e a reação paralisada pela adição de 1 mL de uma solução contendo FeCl_3 0,37M, HCl 0,67M e TCA 0,2M. Depois, foi centrifugada, a 16.000xg, por 5 minutos e a concentração do produto enzimático determinado em 540 nm contra um padrão de glutamyl hidroxamato (GHA). A atividade total da enzima foi expressa em $\mu\text{mol GHA. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MF}$.

3.3.2.4 Ensaio enzimático da Glutamato Sintase (NADH-GOGAT)

Alíquotas do extrato (100-200 μL , conforme tecido) foram adicionadas ao meio de reação composto de tampão fosfato 0,05 M pH 7,5, glutamina 15 mM, 2- α -cetoglutarato 15 mM, KCl 0,01 M, β -mercaptoetanol 0,02M e β -NADH 0,2 mM, perfazendo um volume final de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de NADH, após a incubação do meio, por 3 minutos, a 30°C. A oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340nm,

durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto. A atividade total da enzima foi expressa em $\mu\text{mol GLU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MF}$.

3.3.2.5 Ensaio enzimático da Glutamato Desidrogenase (GDH)

Alíquotas do extrato (50-200 μL , conforme tecido) foram adicionadas ao meio de reação composto de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 M, 2- α -cetoglutarato 0,01 M e CaCl_2 4 mM, perfazendo um volume final de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de NADH, após a incubação do meio por 3 minutos, a 30°C. A oxidação do NADH foi monitorada pelo decréscimo da absorbância em 340nm, durante 10 minutos, em intervalos de 1 minuto. A atividade total da enzima foi expressa em $\mu\text{mol GLU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{MF}$.

3.4 Análise dos dados

Os tratamentos foram obtidos pela combinação entre três fontes de nitrogênio (ausência de nitrogênio, nitrato 8 mM ou amônio 8 mM) e dois tempos de coleta (0 e 27 dias), em um fatorial 3x2. Os seis tratamentos foram distribuídos segundo delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As médias obtidas foram testadas segundo Tukey, a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SISVAR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises bioquímicas das sementes

Os teores dos compostos nitrogenados presente nas sementes são mostrados na Tabela 2. A concentração de nitrogênio total de 2,59 mmol.g⁻¹MS, comparada ao valor obtido por Alencar (2003) ao estudar a mobilização de reservas durante a germinação, foi seis vezes menor. No entanto, deve-se considerar que as sementes utilizadas neste trabalho foram armazenadas por um período de três meses, sendo natural que, durante esse período, a atividade metabólica contínua da semente, devido à sua característica recalcitrante, promovesse a redução do conteúdo de nitrogênio provavelmente perdido por volatilização da amônia liberada durante a hidrólise de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados.

Tabela 2 Compostos nitrogenados presentes em sementes de seringueira armazenadas por um período de três meses. UFLA, Lavras, MG

Partes da semente	N total (mmol.g ⁻¹ MS)	Aminoácido (mmol.g ⁻¹ MS)	Nitrato (μmol.g ⁻¹ MS)	Amônio (μmol.g ⁻¹ MS)
Endosperma	2,39	1,62	9,41	4,49
Cotilédone	2,59	1,24	9,15	4,80
Embrião	2,79	3,14	3,04	3,96
Total semente	2,59	2,00	7,20	4,42

A concentração de aminoácidos, 2 mmol.g⁻¹MS, constitui aproximadamente 77% do total de nitrogênio encontrado nas sementes e, comparada ao valor obtido por Bonome (2006), estudando as alterações bioquímicas durante o mesmo período de armazenamento, foi vinte vezes maior. Novamente, pode-se atribuir a essa diferença as flutuações ambientais, já que as

sementes utilizadas pelo autor vieram de época diferente. De acordo com Marcos Filho (2005), fatores como genótipo, condições climáticas, idade das sementes, fertilidade do solo e nutrição da planta mãe podem afetar a composição química das sementes. Além disso, outro fator a ser considerado é o método utilizado, pois, neste estudo, o tempo e a temperatura de extração foram maiores do que aqueles utilizados pelo referido autor, permitindo, assim, que mais conteúdo fosse extraído.

Observa-se, pelos dados da Tabela 2, a existência de nitrato em concentração de $7,2 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$, justificando a observação de Alves (2001), de que a atividade da enzima RN nas plantas que não receberam nitrogênio poderia ser atribuída ao conteúdo de nitrato pré-existente nas sementes, remobilizado e assimilado nas raízes das plantas jovens. Quanto à concentração de amônio, $4,42 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{MS}$, se deve, provavelmente, à desnaturação de proteínas solúveis, degradação de proteínas de armazenamento e estruturais e degradação de aminoácidos provocada pela presença de radicais livres produzidos pelo processo de oxidação, de ocorrência natural em sementes recalcitrantes armazenadas (NAUTIYAL; PUROHIT, 1985).

4.2 Análises bioquímicas das plantas

4.2.1 Determinação do N total

Na Figura 1 observa-se a concentração de nitrogênio total em plantas jovens de seringueira. Observa-se que as plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato apresentaram aumento na concentração de nitrogênio, aos 27 dias após o tratamento (DAT), sendo essa maior naquelas cultivadas com amônio. Em trabalhos de Cruz, Pelacani e Araújo (2006) realizados com

mandioca foi demonstrado maior teor de nitrogênio total nas plantas cultivadas com 100% de amônio, como também observado neste experimento.

A absorção de nitrogênio na forma amoniacal é energeticamente mais econômica para a planta, pois, ao contrário da forma nítrica, não utiliza poder redutor, já que se encontra no estado reduzido. De fato, Jackson e Volk (1995), trabalhando com milho, demonstraram que a absorção do amônio, comparada ao nitrato, é realizada rapidamente, assim como sua incorporação na forma orgânica.

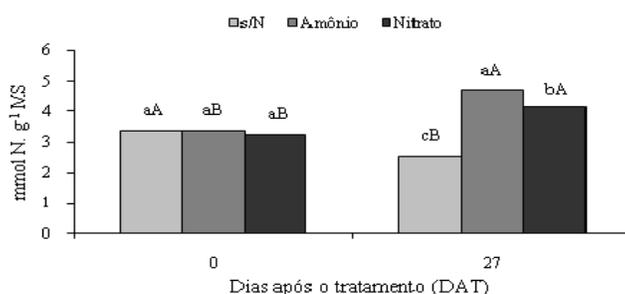


Figura 1 Concentração de nitrogênio total em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Segundo Sandoval, Alcantar e Tirado (1995), a forma amoniacal é mais desejável, pois é utilizada diretamente na síntese de amins e aminoácidos. Além disso, há de se considerar que, até o início dos tratamentos, as plantas, mesmo mantendo seu crescimento sem nitrogênio exógeno, deveriam estar com limitações metabólicas e, embora, na maioria dos casos, o fornecimento de amônio seja prejudicial devido à sua toxicidade, vale ressaltar que, neste trabalho, as plantas não apresentaram nenhum sintoma de toxidez.

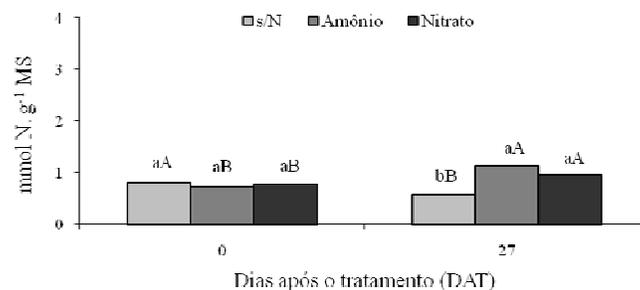
A resposta positiva ao cultivo com amônio já foi demonstrada por Lemos (1996), ao observar maior acúmulo e crescimento em altura e diâmetro em plantas de seringueira de cinco meses de idade. Necessário se faz comentar também acerca da origem da seringueira, natural da região amazônica, onde cerca de 70% dos solos é ácido (VIEIRA; SANTOS, 1987) e, nesses ambientes, a existência da forma nitrogenada amoniacal é favorecida, pois os íons amônio ficam protonados e retidos pelas partículas do solo.

Verifica-se, nas plantas cultivadas na ausência de N, redução na concentração de nitrogênio aos 27 DAT, provavelmente originada da hidrólise de compostos nitrogenados para a manutenção do metabolismo na ausência do nutriente e posteriores perdas por volatilização da amônia. Em plantas de trigo, por exemplo, o aumento do potencial de volatilização da amônia e a consequente perda de nitrogênio foram associados à quebra de proteínas e aminoácidos durante as mudanças no metabolismo (MORGAN; PARTON, 1989).

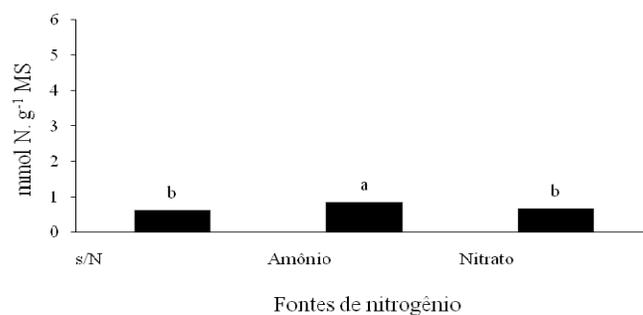
Com relação à distribuição do nitrogênio nas diferentes partes da planta, observa-se, pela Figura 2, maior concentração de nitrogênio nas folhas, conforme demonstrado em seringueira, por Viegas *et al.* (1992), Delú-Filho (1994) e Lemos (1996). Em outros trabalhos, como o de Cruz, Pelacani e Araújo (2006), com mandioca, pertencente à mesma família, observou-se o mesmo comportamento.

Millard e Neilsen (1989), trabalhando com macieiras, uma árvore decídua como a seringueira, demonstraram que o maior acúmulo de nitrogênio nas folhas nos períodos de enfolhamento destina-se a atender à demanda da biossíntese de clorofila, proteínas, aminoácidos e toda maquinaria fotossintética essenciais ao crescimento e, segundo os autores, nos períodos de limitação de nitrogênio, as folhas comportam-se como fontes, remobilizando-o para outros órgãos, principalmente a raiz, para atender à demanda de crescimento.

A



B



C

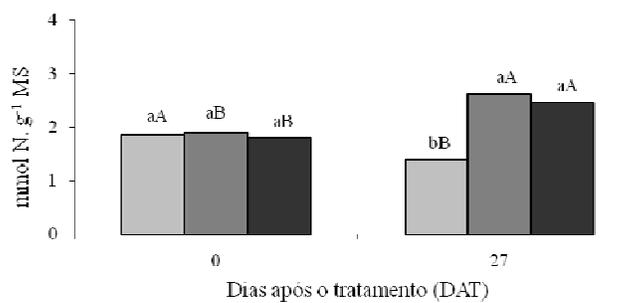


Figura 2 Concentração de nitrogênio total em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH₄⁺) ou nitrato (N-NO₃⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Verifica-se, aos 27 DAT, um aumento na concentração de nitrogênio nas raízes e folhas das plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato, não existindo diferença entre as fontes, enquanto naquelas cultivadas com a ausência do nutriente houve decréscimo nos dois tecidos. Em trabalhos com tecidos foliares de *Stylosanthes guianensis* (AMARAL; CORDEIRO; RENA, 2000) e *Vernonia herbacea* (CARVALHO *et al.*, 2006), sobre os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio, observaram o mesmo comportamento.

Contudo, o que se observa nos caules é a inexistência da dependência de absorção do nitrogênio com o tempo (vide ANOVA em anexo) e, nesse caso, conforme mostrado na Figura 2B, as plantas cultivadas com amônio mostraram maior concentração de nitrogênio, independente do tempo de exposição.

A maior concentração de nitrogênio dos caules exibida pelas plantas cultivadas em amônio se deve, provavelmente, aos aminoácidos transportados via xilema para os tecidos foliares. Alves (2001) observou um comportamento diferenciado em relação aos aminoácidos transportados em função da forma nitrogenada fornecida, sugerindo ser uma adaptação ao fornecimento do nitrogênio ao meio. Em seus experimentos, o autor demonstrou que os principais aminoácidos transportados eram a arginina e a glutamina, em diferentes proporções variáveis em função do tratamento, ou seja, nas plantas cultivadas na presença de amônio, a proporção de arginina e glutamina era de, aproximadamente, 3,5:1, enquanto naquelas cultivadas na presença de nitrato, era de 1:1. Assim, considerando que a relação molar nitrogênio:arginina é de 2 moles para 1 mol de aminoácido, poder-se-ia justificar a maior concentração de nitrogênio total nos caules das plantas cultivadas com amônio pela maior proporção de nitrogênio por mol de arginina.

Verifica-se também que, ao final do período experimental, as plantas cultivadas na ausência de nitrogênio apresentaram menor concentração de nitrogênio nas raízes e nas folhas, quando comparadas às concentrações iniciais.

Bologna *et al.* (2006), estudando as alterações nas quantidades de nitrogênio em diferentes estágios de desenvolvimento de plantas de trigo, relacionaram as maiores perdas de nitrogênio da planta com aquelas provenientes da parte aérea. Porém, Wetselaar e Faquhar (1980) relataram que as perdas de nitrogênio podem ocorrer não somente por volatilização da amônia na parte aérea, mas também por exsudações radiculares, lixiviações e desnitrificação.

4.2.2 Determinação de aminoácidos

Na Figura 3 observa-se a concentração de aminoácidos livres em plantas jovens de seringueira. Aos 27 DAT, houve um aumento na concentração de aminoácidos nas plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato, sendo o maior valor naquelas cultivadas com amônio.

A assimilação do nitrato, comparada ao amônio, demanda mais energia, requerendo a transferência de 8 moles de elétrons por mol de nitrato reduzido a amônio (TAIZ; ZEIGER, 2004), enquanto o amônio já se encontra em estado reduzido e pode ser incorporado diretamente em aminoácidos. Além disso, por seu caráter tóxico, a rápida incorporação em nitrogênio orgânico também é favorecida (MARSCHNER, 1995).

Com relação às plantas controle, observa-se um decréscimo na concentração de aminoácidos ao final do experimento. Vale ressaltar o mesmo comportamento com relação à concentração de nitrogênio total mostrado na Figura 1, trazendo evidências de que o catabolismo de aminoácidos provocado pela condição de deficiência de nitrogênio possa ser um dos principais fatores responsáveis pela redução do nitrogênio total da planta que, segundo Lancien, Gadal e Hodges (2000), é favorecido por qualquer condição limitante de carbono ou nitrogênio.

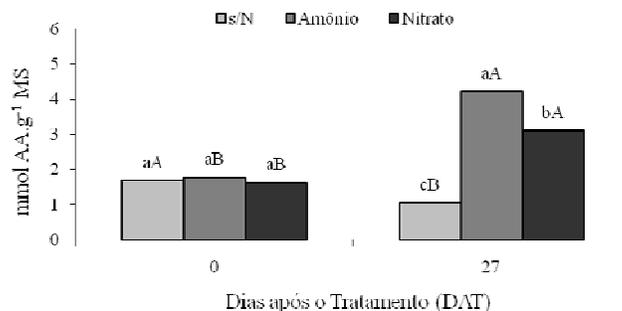


Figura 3 Concentração de aminoácidos livres em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Por meio da Figura 4 observa-se a distribuição dos aminoácidos entre as diferentes partes da planta. Verifica-se, aos 27 DAT, um aumento na concentração de aminoácidos livres nas raízes e nos caules de plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato, sendo maior naquelas cultivadas na presença de amônio em ambos os tecidos. Entretanto, a observação de que a concentração de nitrogênio total radicular (Figura 2A) foi significativamente igual para ambas as fontes, enquanto a concentração de aminoácidos livres, significativamente maior nas plantas cultivadas com amônio (Figura 4A), sugere que o amônio absorvido esteja sendo completamente assimilado nas raízes e que parte da concentração de nitrato absorvida esteja sendo transportada para outros órgãos de armazenamento ou assimilação, corroborando com as observações de Alves (2001).

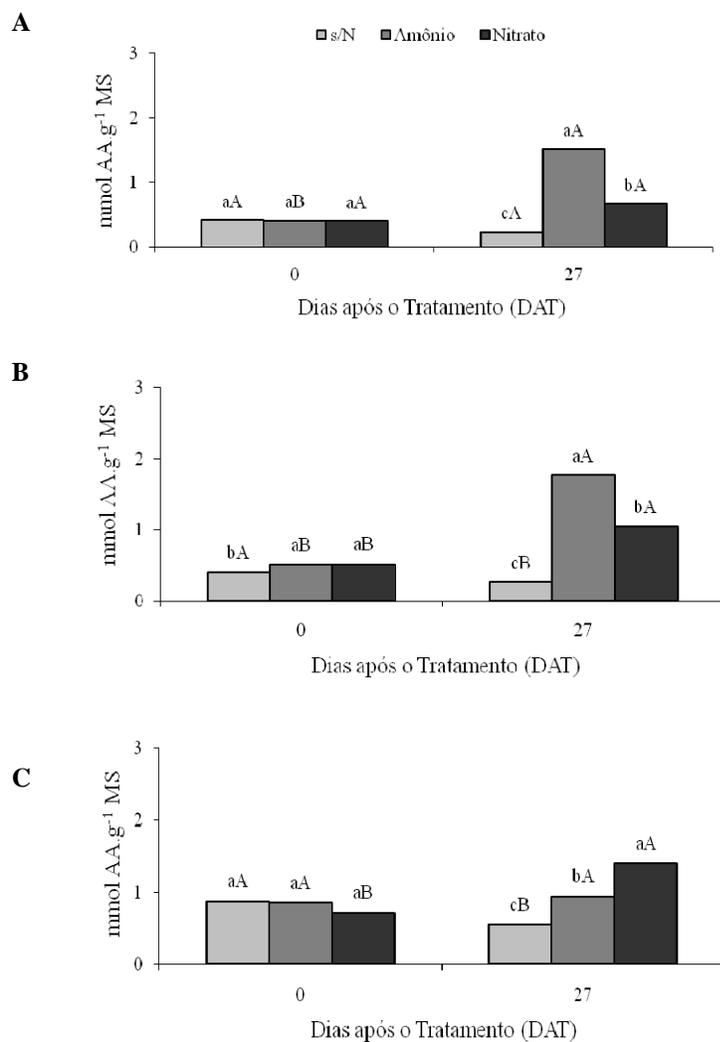


Figura 4 Concentração de aminoácidos livres em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio ($N-NH_4^+$) ou nitrato ($N-NO_3^-$), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Deve-se levar em consideração que, em se tratando de amônio, a rápida incorporação em aminoácidos é favorecida tanto pelo menor gasto energético como também por seus efeitos de toxidez (SECHLEY; YAMAYA; OAKS, 1992). Além disso, a maior concentração de aminoácidos livres nos caules das plantas que receberam amônio como forma de nitrogênio corrobora o fato de que a preferência pela forma amoniacal conduziu à maior síntese de aminoácidos radicular e maior concentração de aminoácidos translocados via xilema. No entanto, verifica-se que, nas folhas das plantas cultivadas com amônio aos 27 DAT (Figura 4C), a concentração de aminoácidos livres não se alterou, o que indica que os aminoácidos que chegam aos tecidos foliares são rapidamente utilizados. Ao contrário, para aquelas plantas cultivadas na presença de nitrato, em que houve um aumento na concentração de aminoácidos livres, sugere-se que parte do nitrato esteja sendo translocado e assimilado nos tecidos foliares.

Com relação às plantas cultivadas na ausência de nitrogênio, observa-se, pela Figura 4A, que não houve alteração na concentração de aminoácidos livres das raízes no final do experimento. No entanto, nos caules e nas folhas foi observada uma redução significativa, provavelmente ocasionada em função da remobilização para a raiz, para atender à demanda de crescimento e ou manutenção ou, ainda, pelo catabolismo, com o objetivo de prover carbono para a produção de energia.

4.2.3 Determinação de proteínas solúveis totais

Na Figura 5 observa-se o teor de proteínas solúveis totais de plantas jovens de seringueira. Por ela, se observa que tanto as plantas cultivadas na presença de amônio como aquelas cultivadas na presença de nitrato apresentaram aumento no teor proteico, sendo significativamente maior nas últimas.

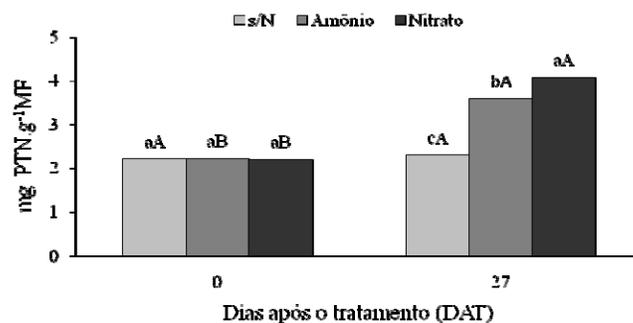


Figura 5 Teor de proteínas solúveis totais em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio ($N-NH_4^+$) ou nitrato ($N-NO_3^-$) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Comparando-se o teor proteico dessas plantas com a concentração de aminoácidos (Figura 3), observa-se que foram inversos, ou seja, para as plantas cultivadas na presença de amônio foi observada maior concentração de aminoácidos e menor teor de proteínas solúveis, enquanto naquelas cultivadas com nitrato, o contrário. Aquelas para as quais que não foi fornecida nenhuma forma nitrogenada mantiveram-se com o mesmo teor aos 27 DAT.

Na Figura 6 observa-se a distribuição de proteínas solúveis totais nos diferentes tecidos de plantas de seringueira. De modo geral, observa-se que os tecidos foliares apresentaram maior teor de proteínas solúveis, resultado das intensas atividades metabólicas inerentes ao tecido, como a própria atividade fotossintética, refletindo também em maior conteúdo de nitrogênio foliar (Figura 2C).

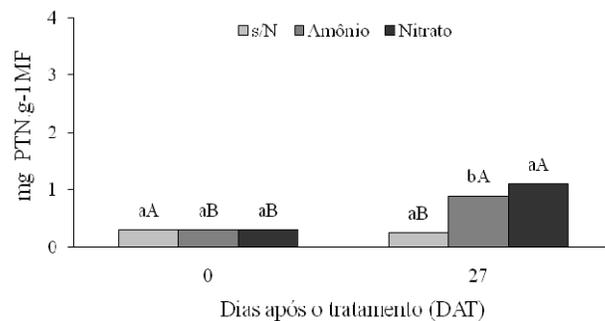
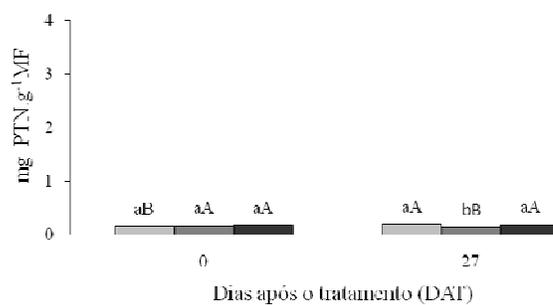
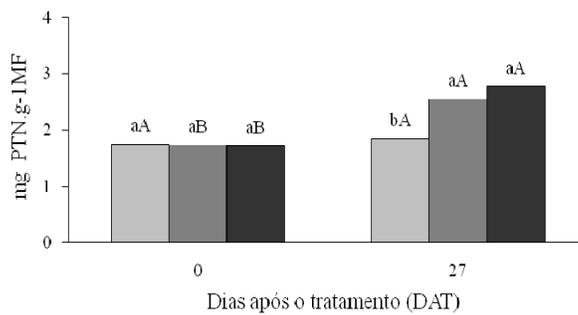
A**B****C**

Figura 6 Teor de proteínas solúveis totais em em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH₄⁺) ou nitrato (N-NO₃⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

As plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato mostraram, aos 27 DAT, maiores teores de proteínas solúveis nas raízes e nas folhas, quando comparadas ao 0 DAT. No entanto, para as raízes, maior valor foi encontrado naquelas cultivadas na presença de nitrato, provavelmente pela indução da RN, enquanto nas folhas não houve diferença significativa entre as formas nitrogenadas fornecidas. Nos caules, observa-se que as plantas cultivadas na presença de amônio mostraram redução no teor proteico aos 27 DAT, enquanto aquelas cultivadas na presença de nitrato não sofreram alterações.

Nas plantas cultivadas na ausência do nitrogênio não houve alteração no teor de proteínas solúveis nas folhas, sendo observada mudança no teor apenas nas raízes e caules, com valores menores e maiores aos 27 DAT, respectivamente.

4.2.4 Determinação do N-nítrico

Na Figura 7, encontram-se os resultados referentes à concentração de nitrato livre em plantas de seringueira. Observa-se, aos 27 DAT, que houve redução na concentração de nitrato livre em todos os tratamentos. Naquele em que as plantas foram cultivadas na presença de nitrato, a redução foi significativamente menor e, embora nessas plantas tenha se observado redução, quando se compara à redução ocorrida nas plantas cultivadas na ausência do N, verifica-se, ao contrário, um aumento. Isso pode ser explicado pelo fato de que o fornecimento de nitrato tende a aumentar o *pool* do nitrato no tecido, como demonstrado por Melzer, Gebauer e Rehder (1984), estudando os efeitos das formas de adubação nitrogenada em *Rumex obtusifolius* L. Além disso, o nitrato pode ser absorvido e armazenado nos vacúolos, sem efeitos prejudiciais (FORDE, 2000).

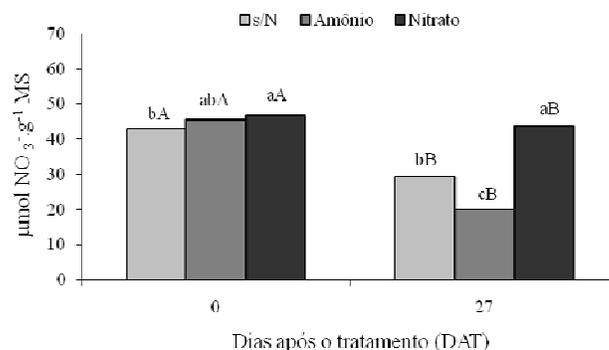


Figura 7 Concentração de nitrato em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Vale ressaltar que a concentração de nitrato presente nas plantas cultivadas na ausência de N e na presença de amônio é oriunda do conteúdo pré-existente nas sementes. Sendo assim, a maior redução na concentração de nitrato observada nas plantas cultivadas com amônio traz evidências de que o fornecimento de amônio estimulou a assimilação do nitrato endógeno, como relatado por Oaks (1994).

Na Figura 8 observa-se a distribuição do nitrato nas diferentes partes da planta. Ao final do experimento, as plantas cultivadas na presença de nitrato apresentaram nas raízes e nos caules aumento na concentração de nitrato, enquanto nas folhas, redução.

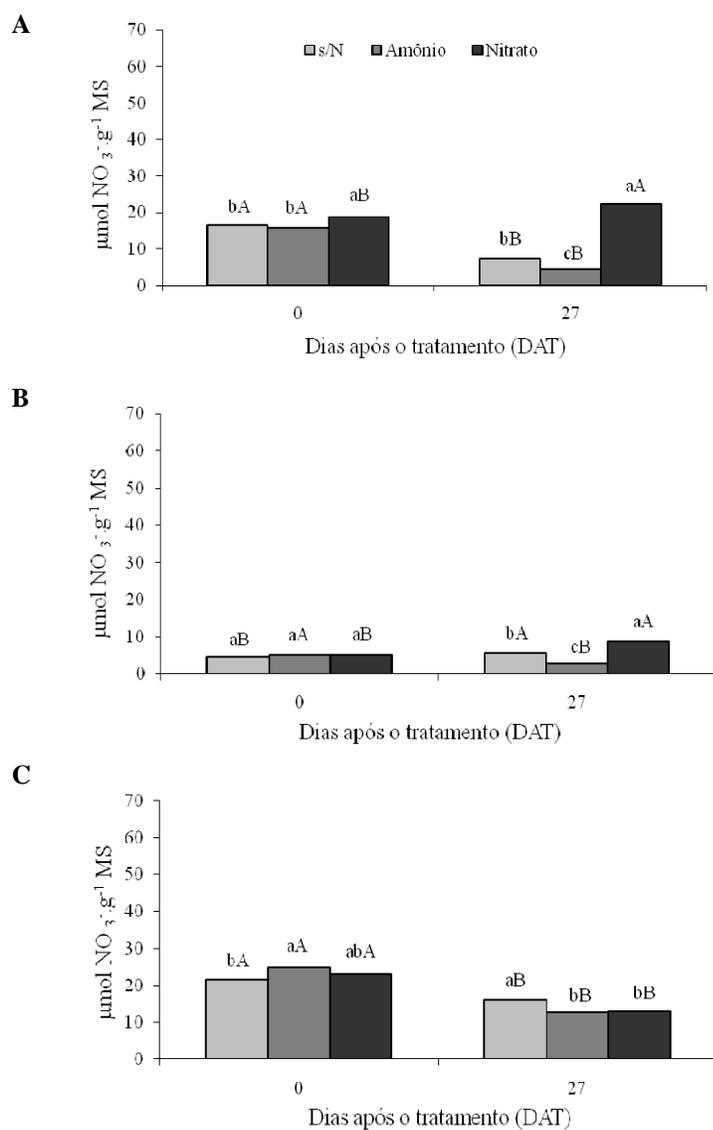


Figura 8 Concentração de nitrato em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Andrade *et al.* (2001), estudando o efeito da proporção nitrato e amônio sobre a distribuição de nitrato em *Panicum maximum*, demonstraram que o conteúdo de nitrato das raízes das plantas cultivadas com nitrato foi 4,5 vezes maior do que naquelas cultivadas com amônio em detrimento do fornecimento do próprio íon.

Além disso, nos caules de seringueira, Alves (2001) observou a presença do íon na seiva do xilema, sugerindo ser um mecanismo de controle para evitar acúmulo de íons nitrato e amônio nas raízes. Esses fatos corroboram o fato de que o aumento na concentração do nitrato caulinar demonstrado pelas plantas cultivadas na presença de nitrato pode ser atribuído à translocação do íon. Possivelmente, aos 27 DAT, a concentração de nitrato endógena excedeu a capacidade dos tecidos da raiz em assimilar o nitrato ou, ainda, a alta produção de nitrato e amônio, tóxicos para as células, inibe a assimilação, sendo necessária a translocação para outros sítios de assimilação ou armazenamento.

Nas folhas das plantas cultivadas na presença de nitrato, a concentração de nitrato aos 27 DAT sofreu redução. Embora nos trabalhos realizados até o momento não se tenham constatado a presença da enzima RN nesses tecidos, é interessante a hipótese de que existe assimilação de nitrato nos tecidos foliares da seringueira, já que, ao se verificar a concentração de aminoácidos livres dessas plantas (Figura 6), observa-se um aumento significativo em todos os órgãos estudados.

4.2.5 Determinação do N-amoniaco

Na Figura 9, observa-se, aos 27 DAT, redução na concentração de amônio em todas as plantas, sendo que, entre elas, apenas aquelas cultivadas na presença de amônio se diferenciou das demais apresentando valor superior. Barbosa, Muniz e Matinez. (2005), trabalhando com diferentes relações de

nitrito e amônio em crisântemos, observaram aumento linear na concentração de N-amoniaco em função da diminuição da relação nitrito/amônio.

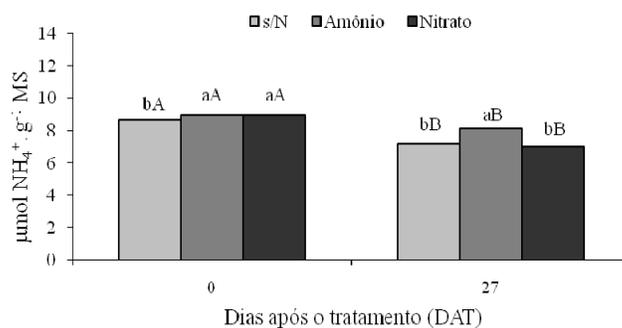


Figura 9 Concentração de amônio em plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH₄⁺) ou nitrito (N-NO₃⁻) e em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Na Figura 10 observa-se a distribuição do amônio livre nos diferentes tecidos de plantas de seringueira. As maiores concentrações de amônio foram encontradas nas raízes, o que demonstra maior capacidade da seringueira em prevenir o acúmulo desses íons na parte aérea, pois, segundo Brito e Kronzucker (2001), o amônio nos tecidos foliares pode promover o desacoplamento da fotofosforilação, inibir a síntese da clorofila e promover a degradação de cloroplastídeos e de proteínas, principalmente as estruturais.

Além disso, Barber e Mills (1980) relataram que, em mandioca, a maior retenção de amônio nas raízes de absorção se deve à capacidade desses tecidos em suportar maiores concentrações do íon e, para a seringueira, até o final do experimento, as raízes não apresentaram sintomas de toxidez.

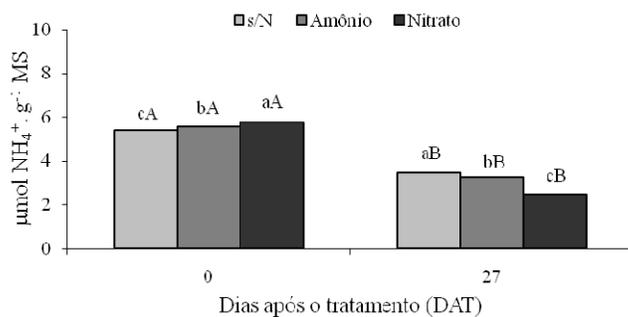
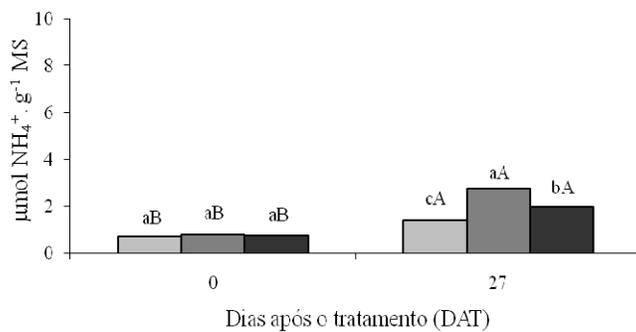
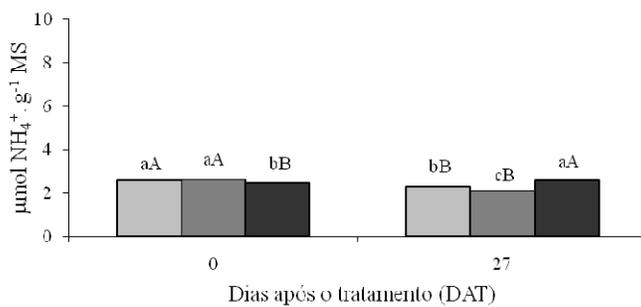
A**B****C**

Figura 10 Concentração de amônio em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Observa-se que, ao final do experimento, a concentração de amônio livre reduziu e aumentou nas raízes e caules, respectivamente, em todas as plantas estudadas, tendo, nas raízes, a maior redução acontecida nas plantas cultivadas na presença de nitrato e o maior aumento naquelas cultivadas na presença de amônio. Embora o amônio possa ser assimilado em grande parte nas raízes, algumas plantas podem transportá-lo para outras partes. Finnemann e Schjoerring (1999), trabalhando com *Brassica napus*, demonstraram a presença de altas concentrações de amônio na seiva do xilema, decorrente da translocação do íon nestes tecidos.

Delú-Filho (1994) sugeriu que o amônio proveniente da redução do nitrato é transportado no xilema das plantas até as folhas em detrimento da ausência das enzimas de assimilação nas raízes. Entretanto, Alves (2001) não detectou amônio no xilema. Assim, provavelmente, o amônio detectado é devido a hidrólises de alguns compostos nitrogenados, como, por exemplo, os fitorreguladores translocados.

A diferença de comportamento em função da concentração de amônio livre acontece somente nas folhas, em que se observa redução nas plantas cultivadas na presença de amônio e na ausência de nitrogênio, sendo, nas primeiras, maior e aumento naquelas cultivadas em nitrato.

Observando-se as Figuras 4 e 6, verifica-se um aumento na concentração de nitrogênio total e aminoácidos livres nas raízes e caules de plantas cultivadas com amônio ou nitrato, enquanto a concentração de amônio diminuiu. Em plantas de arroz, a concentração de amônio também mostrou correlação negativa com os níveis de aminoácidos livres (FERNANDES, 1991). No entanto, com relação àquelas cultivadas na ausência de N, verifica-se que essa correlação não existe, sugerindo que as reduções na concentração de amônio livre são oriundas de perdas ocorridas no catabolismo de aminoácidos e proteínas para prover N e C ao metabolismo basal.

4.2.6 Considerações

Observa-se, pelos dados da Tabela 3, que as plantas que receberam amônio como única fonte nitrogenada responderam melhor aos acréscimos em nitrogênio. Ao longo do período experimental, do total de nitrogênio fornecido a essas plantas, 4% foram absorvidos e convertidos em nitrogênio orgânico enquanto para as plantas que receberam nitrato, 3%.

Tabela 3 Percentual de redução ou acúmulo de compostos nitrogenados em plantas jovens de seringueira cultivadas na ausência de N (0/0) e na presença de amônio (0/8) ou nitrato (8/0), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). UFLA, Lavras, MG

	PLANTAS SUBMETIDAS AO CULTIVO									
	Dias após a indução dos tratamentos (DAT)									
	mmol N.g ⁻¹		mmol AAs.g ⁻¹		μmol ptn.g ⁻¹		μmol NO ₃ ⁻ .g ⁻¹		μmol NH ₄ ⁺ .g ⁻¹	
	MS		MS		MF		MS		MS	
[NO ₃ ⁻]/[NH ₄ ⁺]	0	27	0	27	0	27	0	27	0	27
0/0	3,36	2,54	1,70	1,06	2,21	2,30	42,76	29,41	8,7b	7,19
0/8	3,38	4,71	1,78	4,23	2,23	3,59	45,57	19,98	8,97	8,13
8/0	3,23	4,13	1,63	3,11	2,20	4,07	46,75	43,50	8,96	7,04
	Percentual de redução ou acúmulo na planta (%)									
[NO ₃ ⁻]/[NH ₄ ⁺]	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*	A*	B*
0/0	-24	-	-38	-	4	-	-31	-	-17	-
0/8	39	85	138	300	61	56	-56	-32	-9	13
8/0	28	63	90	193	85	77	-7	48	-21	-2

A*: Percentual obtido entre 0 DAT e 27 DAT; B* Percentual obtido aos 27 DAT, em relação ao controle (0/0) aos 27 DAT.

As plantas que receberam nitrogênio seja na forma de amônio ou nitrato, quando comparadas àquelas que não receberam o nutriente, apresentaram acréscimos em nitrogênio em todas as partes da planta, tendo, nas raízes e folhas, esses acréscimos sido iguais para ambas (Figura 2A e 2C, respectivamente). No entanto, com relação aos caules, a forma amoniacal induziu a acréscimos em torno de 27%, enquanto a forma nítrica, 9% (Figura 2B). Atribui-se, portanto, a maior resposta em nitrogênio incorporado exibido pelas plantas cultivadas na presença de amônio à concentração presente nos caules, provavelmente pela síntese e a translocação de aminoácidos oriundos da assimilação nas raízes. De fato, a observação do acréscimo em aminoácidos em relação àquelas cultivadas na presença de nitrato é maior, atingindo uma diferença de aproximadamente 48% (Tabela 3).

A maior absorção de nitrogênio exibida pelas plantas cultivadas na presença de amônio reflete-se na maior concentração de aminoácidos livres nas raízes e nos caules, com percentuais de acúmulo em torno de 262% e 247%, em relação àquelas cultivadas na ausência do nutriente, no início dos tratamentos. Naquelas cultivadas na presença de nitrato, esses percentuais são quatro e duas vezes menores para raízes e caules, respectivamente (Figura 4A e 4B).

Em contrapartida, com relação ao acréscimo protéico, as plantas cultivadas na presença de nitrato foram superiores em 24% àquelas cultivadas na presença de amônio (Tabela 3). A distribuição das proteínas solúveis nas diferentes partes da planta mostrou maiores ganhos nas raízes, sendo superior em 117% em relação àquelas cultivadas na presença de amônio (Figura 5A). Assim, ao absorver nitrogênio na forma nítrica, grande parte dos aminoácidos sintetizados na raiz é utilizada para a síntese proteica, o que não acontece quando a forma é amoniacal, em que se verifica maior acréscimo em aminoácidos livres. Isso explica os maiores percentuais de aminoácidos translocados no caule.

Já nas folhas, o aumento foi igual para ambos os cultivos, entretanto, como observado anteriormente, as plantas cultivadas na presença de amônio não apresentaram acréscimos de aminoácidos livres como aquelas cultivadas na presença de nitrato.

Houve redução de 20% da concentração de amônio das plantas cultivadas na presença de nitrato, enquanto naquelas cultivadas com amônio, de 9%. Entretanto, a comparação das reduções ocorridas nas plantas controle, aos 27 DAT, com aquelas obtidas nas plantas cultivadas na presença de amônio no mesmo período, mostra que, ao invés de reduções, ocorreram aumentos nos níveis de amônio, em torno de 13%. Da mesma forma, para a concentração de nitrato nas plantas cultivadas na presença do íon, verifica-se em vez de uma redução de 7%, um aumento de 48% (Tabela 3).

As plantas que não receberam nenhuma forma de nitrogênio apresentaram redução na concentração de nitrogênio endógena em torno de 24%, sendo mais expressiva nas raízes, seguida de folhas e caules, com percentuais de redução em torno de 29, 24% e 18%, respectivamente (Figura 2). A redução ocorrida nas raízes foi mais expressiva com relação à concentração de aminoácidos que, comparada à concentração de proteínas solúveis, foi quatro vezes maior.

Com relação aos caules e as folhas de plantas cultivadas na ausência do nutriente, houve redução na concentração de aminoácidos e aumento em proteínas solúveis, o que sugere que os aminoácidos livres estejam sendo remobilizados para a síntese de proteínas. Interessante a observação de que o conteúdo de amônio dos caules aumentou, provavelmente em função da quebra de aminoácidos para a remobilização. Tanto o nitrato e como o amônio endógeno sofreram redução, sendo mais expressiva nas raízes.

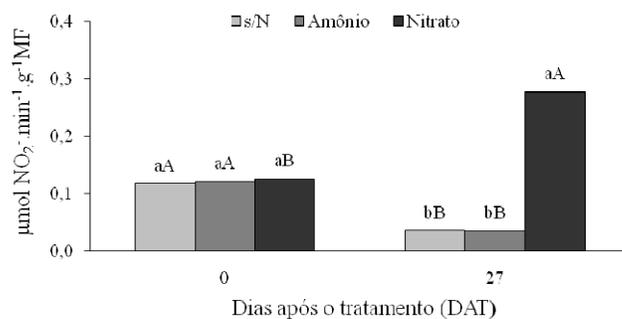
4.3 Análises enzimáticas

4.3.1 Atividade da Redutase do Nitrato (RN)

Na Figura 11 observa-se a atividade *in vitro* da RN presente nas raízes e caules de plantas de seringueira submetidas a diferentes fontes de nitrogênio e tempos. De maneira geral, nas raízes, aos 27 DAT, houve aumento da atividade da enzima nas plantas cultivadas com nitrato, evidenciando a indução da enzima pelo substrato (BEEVERS; HAGEMAN, 1969; SOLOMONSON; BARBER, 1990), já que, nas plantas cultivadas na presença de amônio e na ausência de nitrogênio, a atividade reduziu-se a valores significativamente iguais, respectivamente. No entanto, a concentração nítrica nas raízes não apresentou redução. Ao contrário, houve um aumento (Figura 8A), implicando que, aos 27 DAT, a enzima, provavelmente, sofreu saturação em nível de substrato, acumulando nitrato nos vacúolos das raízes e ou translocando-o para outras partes da planta, para ser armazenado ou assimilado. Holf, Truong e Caboche (1994) relataram que o *pool* de nitrato celular não está necessariamente relacionado com a atividade da RN.

Vale ressaltar a atividade enzimática observada nos caules nesse mesmo período, evidenciando que parte do nitrato absorvido e não assimilado pelas raízes estaria sendo translocada para os caules para assimilação. Isso pode ser confirmado pelo aumento na concentração de aminoácidos (Figura 4B) e, apesar de não ser comum citar esses tecidos como sítios de assimilação, há que se pensar que, por se tratar de plantas em crescimento e que passaram por um período de restrição nitrogenada, provavelmente existem mecanismos que favoreçam a síntese *in situ* para maior aproveitamento energético nos tecidos em crescimento.

A



B

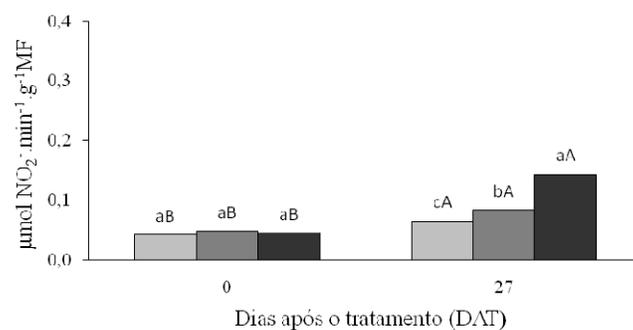


Figura 11 Atividade da redutase do nitrato em raízes (A) e caules (B) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Em alguns trabalhos já foi demonstrada a presença da enzima nos tecidos caulinares. Cazetta e Villela (2004), em trabalho com *Brachiaria radicans* Napper, observaram atividade da enzima nos caules em níveis considerados altos, três vezes menor do que a atividade nas folhas, o principal sítio de redução nessa espécie e Yoneyama *et al.* (1987), em *Brassica campestris* L., observaram a presença da enzima em todos os tecidos da planta.

Observa-se, nos caules, um aumento da atividade aos 27 DAT nas plantas cultivadas na presença de amônio e na ausência do nitrogênio. Vale ressaltar que o comportamento enzimático apresentado pelas plantas controle e aquelas cultivadas na presença de amônio parece ser decorrente da assimilação do nitrato pré-existente armazenado nos vacúolos, quando a planta se encontrava com limitação de nutrientes. Donato *et al.* (2004), avaliando a atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob diferentes níveis de nitrogênio, demonstraram que as plantas cultivadas com amônio e na ausência de nitrogênio apresentaram atividade da RN associada à presença da isoforma constitutiva da RN, o que pode ser relacionado para a seringueira também.

Com relação aos tecidos foliares, Delú-Filho (1994) não detectou atividade *in vivo* da RN em seringueira. Outros trabalhos conduzidos por Lemos (1996) conduziram à hipótese de que a assimilação do nitrato em seringueira acontecia somente no sistema radicular, embora Alves (2001) tenha demonstrado transporte de nitrato no xilema. Neste trabalho, pelo método *in vitro* aplicado, não foi detectada enzima ativa nos tecidos foliares, o que não implica, necessariamente, na inexistência da enzima nesses tecidos, pois se observa aumento na concentração de aminoácidos (Figura 4C) e redução na concentração de nitrato foliar (Figura 8C). Em oposição, essas observações poderiam vir da redistribuição de aminoácidos para outros órgãos. Entretanto, fisiologicamente, o processo de assimilação do nitrato é energeticamente dispendioso e, especialmente nesses tecidos, há que se considerar a alta produção de açúcares, de poder redutor e energia vinculada à fotoquímica e ao processo fotossintético como um todo, sendo, portanto, mais vantajoso assimilá-lo *in situ*.

Segundo Srivasankar e Oaks (1994), a assimilação do nitrato é controlada pelo *pool* de metabólitos e pela luz. Isso foi demonstrado por Scheible *et al.* (1997), quando o suplemento de nitrato conduziu a um marcante aumento do nível de transcritos e atividade das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), promovendo um acúmulo de malato e 2-oxoglutarato, este último essencial para o processo de assimilação.

4.3.2 Atividade da Glutamina Sintetase (GS)

Na Figura 12, observa-se que a atividade da GS foi mais pronunciada nas folhas do que nas raízes e caules. O teste de comparação de média mostrou que, nas raízes, houve um aumento na atividade enzimática para plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato, sendo maior nessas últimas, evidenciando que a presença de amônio ou nitrato no meio de cultivo induziu a um aumento da atividade sintética da enzima. Realmente, observa-se, pela Figura 2A e 4A, aumento na concentração de N total e aminoácidos livres, respectivamente, para ambas as fontes.

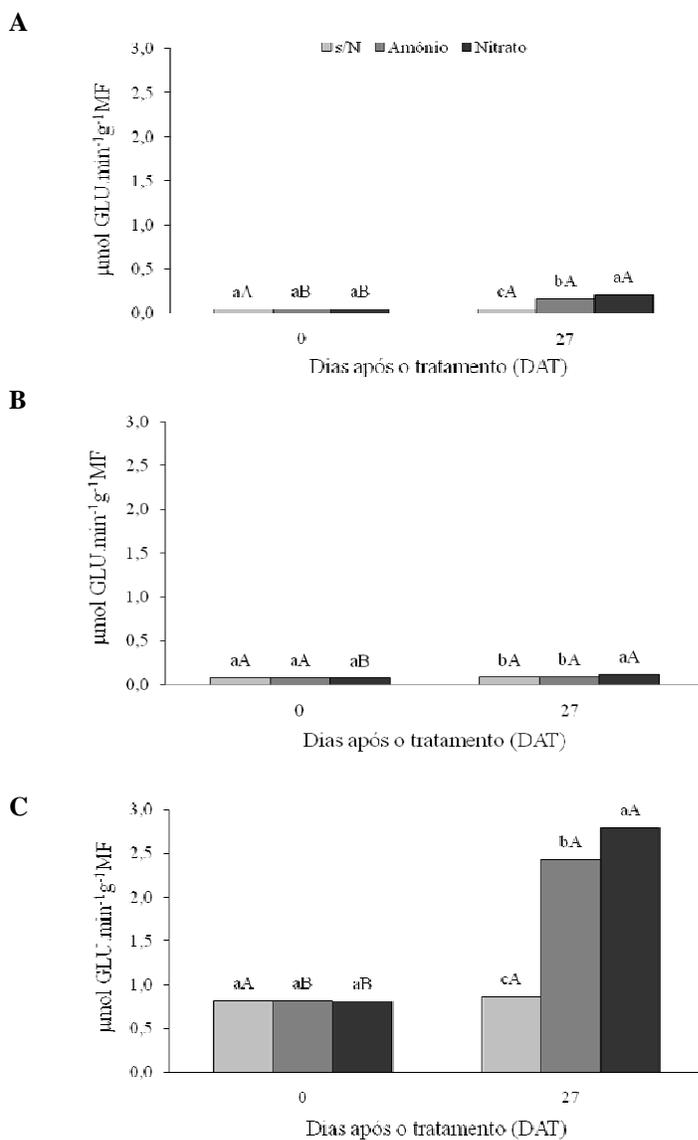


Figura 12 Atividade da Glutamina sintetase (GS) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Lemos (1996), avaliando a atividade da GS nas raízes de seringueira de cinco meses de idade, observou estímulo com a adição de nitrato e decréscimo à medida que se acrescentava amônio ao meio de cultivo, sugerindo que a enzima presente nas raízes é dependente do amônio proveniente da redução do nitrato, fato que não foi observado no presente trabalho, pois a atividade da enzima nas plantas cultivadas na presença de amônio aumentou significativamente, embora com menor valor do que aquelas cultivadas na presença de nitrato.

Delú-Filho (1994), trabalhando com plantas de sete meses de idade, não observou resposta da GS radicular em função das diferentes doses de nitrato aplicado, sugerindo que os íons amônio originados da redução do nitrato não fossem incorporados em aminoácidos nas raízes. No entanto, a inexistência da atividade da GS radicular parece ser devido ao tempo de exposição ao fornecimento de nitrogênio, pois, como observado por Alves (2001), aos 6 dias de indução, a atividade da GS radicular foi mais estimulada em plantas cultivadas na presença de nitrato do que naquelas cultivadas na presença de amônio e, aos 45 dias, a situação era inversa. Assim, sugere-se que a inexistência da enzima observada nos trabalhos de Delú-Filho (1994) é decorrente não só do tempo de exposição, como também do estágio de desenvolvimento das plantas.

A observação da atividade da RN nas raízes (Figura 11A), associada com os valores obtidos pela GS (Figura 12A) nos mesmos tecidos, mostra que a participação da GS é assimilar tanto amônio absorvido quanto aquele oriundo da redução do nitrato, como pode ser visto pelo aumento na concentração de aminoácidos (Figura 4A).

Nos caules, o comportamento das plantas cultivadas na presença de amônio ou na ausência do nutriente foi significativamente igual sem alteração na atividade da GS aos 27 DAT, enquanto aquelas cultivadas na presença de nitrato sofreram um leve aumento na atividade. Miflin e Habash (2002) relataram que,

para a manutenção do balanço de carbono e nitrogênio, a GS também pode ser localizada em tecidos e órgãos envolvidos com a geração e o transporte de N reduzido.

Nas folhas, a atividade da GS aos 27 DAT aumentou para plantas cultivadas com amônio ou nitrato, tendo, nessas últimas, o valor médio maior. Nesse período, o aumento significativo em aminoácidos (Figura 4C) e proteínas (Figura 6C) e a redução da concentração do nitrato sugere que a GS foliar estaria sintetizando aminoácidos a partir do amônio assimilado primariamente.

4.3.3 Atividade da Glutamato Sintase (NADH-GOGAT)

Na Figura 13 observa-se o comportamento da enzima NADH-GOGAT nas raízes e nos caules de plantas cultivadas na ausência de nitrogênio e na presença de amônio ou nitrato. Aos 27 DAT, observa-se que, para todas as fontes, as raízes apresentaram um aumento na atividade enzimática da NADH-GOGAT, tendo as plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato não se diferenciado, apresentando os maiores valores médios. Nos caules observa-se que, independente da fonte nitrogenada, a atividade enzimática só respondeu ao tempo de exposição, apresentando aumento aos 27 DAT.

A comparação das atividades enzimáticas obtidas para a GS (Figura 12) com aquelas obtidas para a NADH-GOGAT (Figura 13) mostra que a transaminação é inferior à síntese de glutamina, indicando que a glutamina sintetizada esteja sendo translocada para os tecidos foliares para a transaminação. Vale ressaltar que a atividade da Fd-GOGAT não foi realizada neste trabalho, mas sabe-se que em trabalhos anteriores foi demonstrada alta atividade da Fd-GOGAT.

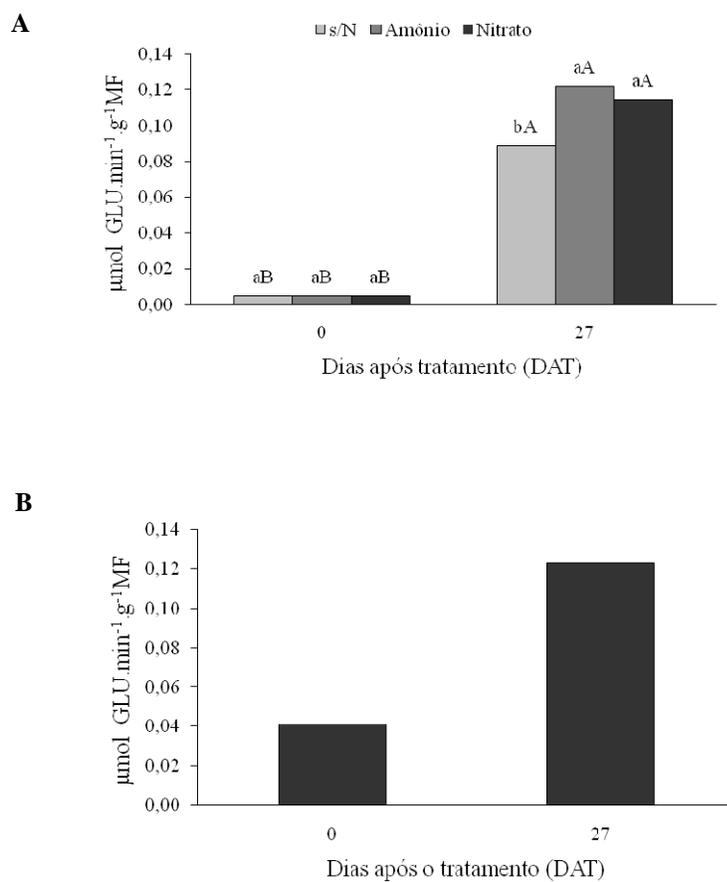


Figura 13 Atividade da Glutamato sintase (NADH-GOGAT) em raízes (A) e caules (B) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH_4^+) ou nitrato (N-NO_3^-), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

4.3.4 Atividade da Glutamato Desidrogenase (GDH)

Na Figura 14, observa-se a atividade da enzima GDH nas raízes e caules de plantas jovens de seringueira. Aos 27 DAT, a atividade da GDH radicular aumentou em todas as fontes testadas, tendo aquelas cultivadas na presença de amônio, apresentado maior valor médio.

Lemos (1996) sugeriu possível indução da GDH nas raízes em função dos baixos valores da atividade da GS. Verifica-se, por meio deste trabalho, que a GDH é realmente induzida. A atividade da enzima nas plantas cultivadas na presença de nitrato alcançou valores parecidos à atividade da GS (Figura 12A), enquanto naquelas cultivadas na presença de amônio foi pelo menos duas vezes maior. Esse comportamento associado com a observação dos baixos valores apresentados pela GS (Figura 12A) corrobora o fato de a GDH ser estimulada pelo amônio, sugerindo que a reação catalisada por ela, nessas plantas, atue no sentido do anabolismo de aminoácidos. Segundo Lancien, Gadal e Hodges (2000), a reação de aminação é favorecida por amônio, glutamina ou açúcares.

Nas raízes de plantas cultivadas na ausência de nitrogênio, observa-se que os valores da GDH são quatro vezes maiores aos apresentados pela GS (Figura 12A) e, devido à condição de deficiência do mineral e às reduções dos níveis de nitrogênio total (Figura 2A), aminoácidos (Figura 4A) e proteínas (Figura 6A), sugere-se que a GDH esteja atuando com função catabólica.

Melo-Oliveira, Oliveira e Coruzzi (1996) demonstraram que a função catabólica da isoenzima era reabastecer o ciclo dos ácidos tricarbóxicos provendo 2-oxoglutarato em condições de limitação de carbono. No entanto, Aubert *et al.* (2001), utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN¹³C e ³¹P), demonstraram que a participação da GDH se estende tanto para atender à demanda do metabolismo de carbono, provendo 2-oxoglutarato

quando o *pool* de metabólitos como malato é reduzido quanto à demanda de substrato para que a via primária de assimilação possa ocorrer.

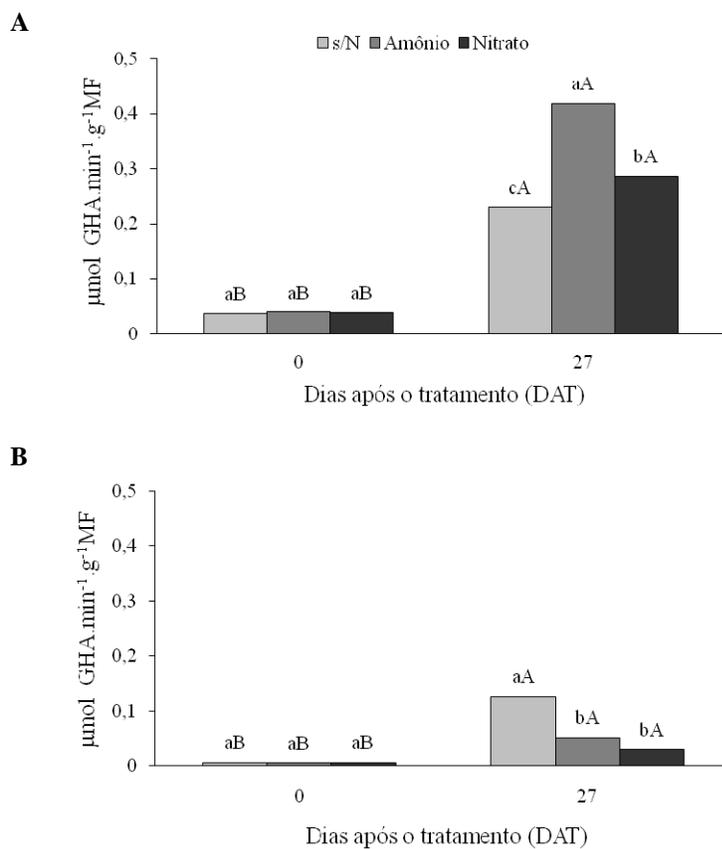


Figura 14 Atividade da glutamato desidrogenase (GDH) em raízes (A) e caules (B) de plantas jovens de seringueira, cultivadas na ausência de N (s/N) e na presença de amônio (N-NH₄⁺) ou nitrato (N-NO₃⁻), em função do período de tempo (0 e 27 DAT). Letras minúsculas comparam fontes de nitrogênio dentro do tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de fonte de nitrogênio, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey. UFLA, Lavras, MG

Nos caules, observa-se aumento da atividade enzimática aos 27 DAT, nas três fontes testadas, tendo as plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato não diferido, apresentado valores menores do que aquelas cultivadas na ausência do nutriente. Nas folhas não houve interação entre os tempos e nem entre as fontes, ou seja, a enzima esteve presente ativamente em todos os tempos e em todos os tratamentos. Vale ressaltar que a atividade da GDH nos tecidos foliares das plantas cultivadas na presença de amônio ou nitrato (em torno de 0,8 $\mu\text{mol GLU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) comparada à atividade da GS (Figura 12C) foi cerca de três vezes inferior.

Delú-Filho *et al.* (1998) demonstraram alta atividade da GS foliar, sugerindo que a assimilação primária acontecesse preferencialmente pela via GS/Fd-GOGAT, sendo comprovado mais tarde nos experimentos de Lemos *et al.* (1999), que demonstraram alta atividade da Fd-GOGAT. No entanto, os mesmos autores não descartaram a participação da GDH.

Embora no presente trabalho não se tenha avaliado a enzima Fd-GOGAT e sabendo-se que o ciclo GS/GOGAT é o maior mecanismo de assimilação de amônio primário e secundário em plantas superiores (PERSSON; GARDESTRÖM; NASHOLM, 2006), a partir dos valores da atividade da GDH verifica-se que a enzima parece estar atuando conjuntamente com a GS. No entanto, sua real função frente à utilização de diferentes formas de nitrogênio só pode ser determinada por métodos radioativos de detecção, pois, segundo Oaks (1995), os ensaios *in vitro* não discriminam o sentido da reação.

5 CONCLUSÕES

1. A nutrição amoniacal exerce efeitos positivos, apresentando melhores respostas em nitrogênio total, aminoácidos e proteínas, comparada à nutrição nítrica.

2. Plantas cultivadas na presença de amônio apresentam maior acúmulo de N nos caules e aminoácidos nas raízes e caules, enquanto aquelas cultivadas na presença de nitrato, maior acúmulo de proteínas solúveis nas raízes e caules.

3. Independente da forma nitrogenada, maiores conteúdos de N e proteínas solúveis são encontrados nas folhas.

4. A forma nitrogenada promove respostas diferenciadas com relação ao comportamento das enzimas do metabolismo do nitrogênio.

5. A assimilação, tanto da forma nítrica quanto amoniacal, acontece via GS/GOGAT. No entanto, existe forte dependência entre a atividade da GS e o *pool* de nitrato celular, bem como entre a atividade da GDH e o *pool* de amônio celular.

6. O nitrogênio nítrico é em parte assimilado nas raízes, preferencialmente via GS/GOGAT, com pequena participação da GDH; outra parte é, provavelmente, translocada para os caules.

7. O nitrogênio amoniacal é assimilado totalmente nas raízes via GS/GOGAT e com significativa participação da GDH.

8. A alta atividade da enzima GS nas folhas implica na sua participação na assimilação primária e secundária do amônio, independente da fonte nitrogenada.

9. A enzima GDH foliar se mostra ativa, ainda que em papel secundário, independente das fontes ou do tempo de exposição ao tratamento.

10. A atividade da RN *in vitro* é maior nas plantas que receberam nitrato, sendo detectada nas raízes e caules e não detectada nos tecidos foliares. No

entanto, todos os indícios apontam sua participação no metabolismo foliar requerendo, portanto, um estudo aprofundado da cinética da enzima neste tecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. A. A. de. **Mobilização e distribuição de reservas de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante a germinação e o crescimento inicial.** 59p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

ALVES, E.M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira.** 57p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

AMARAL, J.A.T.; CORDEIRO, A.T.; RENA, A.B. Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a composição de metabólitos nitrogenados e de carboidratos em *Stylosanthes guianensis* e *S. macrocephala*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 313-320, 2000.

ANDRADE, S.R.M.; SANT'ANNA, R.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R. **Efeito da proporção $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ na distribuição de nitrato e na atividade in vitro da redutase do nitrato em plantas de *Panicum maximum*.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 16p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 9, p. 511-586, 1986.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**, 16 ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, MD, 1998.

AUBERT, S.; BLIGNY, R.; DOUCE, R.; RATCLIFFE, R.G.; ROBERTS, J.K.M. Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 354, p. 37-45, 2001.

BARBER, A.V.; MILLS, H.A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. **Horticultural Review**, v. 2, p. 395-423, 1980.

BARBOSA, J.B.; MUNIZ, M.A.; MATINEZ, H.E.P. Concentração de macronutrients em crisântemo de vaso, cultivado sob diferentes relações $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n. 3, p. 387-394, 2005.

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, v. 20, p. 495-522, 1969.

BERGER, J.A.; HARRISON, P.J. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 1, p. 82-93, 1995.

BLOOM, A.J.; SUKRAPANNA, S.S.; WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v.99, p.1294-1301, 1992.

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

BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; LANGE, A.; TRIVELIN, P.C.O. Perda de nitrogênio pela parte aérea de plantas de trigo. **Ciência rural**, v. 36, n. 4, p. 1106-1111, 2006.

BONOME, L.T. da S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento**. 124p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Constancy of nitrogen turnover kinetics in the plant cell: insights into the integration of subcellular N fluxes. **Planta**, v. 213, p. 175-181, 2001.

CARVALHO, P.G.; AIDAR, M.P.M.; ZAIDAN, L.B.P.; CARVALHO, M.A.M. Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas a diferentes fontes de nitrogênio. **Hoehnea**, v. 33, n. 1, p. 89-97, 2006.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications of Soil Science and Plant Annals**, v. 6, p.71-80, 1975.

CATALDO, D.A.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. **Crop Science**, v.14, p.854-856, 1974.

CAZETTA, J.O.; VILLELA, L.C.V. Nitrate reductase in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). **Scientia Agrícola**, v. 61, n. 6, p. 640-648, 2004.

COMETTI, N. N.; MATIAS, G.C. S.M.; ZONTA, E.; MARY, W.; FERNANDES, M.S. Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 748-753, 2005.

CRUZ, J.L.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W.L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, v. 65, n. 3, p. 467-475, 2006.

DEAN, J.V.; HARPER, J.E. The conversion of nitrite oxides (s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiology**, v. 88, p. 389-395, 1988.

DELÚ-FILHO, N. **Efeito do N-NO₃⁻ sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.).** 87p.Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

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

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G. de; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E. de; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

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

FERNANDES, M.S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-N to fresh weight of rice plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 14, n. 11, p. 1151-1164, 1991.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELO, R.O.P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n. 2, p.111-118, 1995.

FINNEMANN, J.; SCHJOERRING, J. K. Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 469-477, 1999.

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p. 219-235, 2000.

FORDE, B.G.; CLARKSON, D.T. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. **Advances in Botanical Research**, v. 30, p. 1-90, 1999.

GLASS, A.D.M.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N.; KINGHORN, J.R.; KRONZUCKER, H.J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M.Y.; UNCLES, S.E.; VIDMAR, J.J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 855-864, 2002.

HIREL, B.; LEA, P.J. Ammonia assimilation. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF, eds. **Plant nitrogen**. Berlin: Springer-Verlag, 2001, p. 79–100.

HOFF, T.; TRUONG, H.N.; CABOCHE, M. The use the mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 489-506, 1994.

HUPPE, H.C.; TURPIN, D.H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 577-607, 1994.

IMSANDE, J.; TOURAINE, B. N. Demand and regulation of nitrate uptake. **Plant Physiology**, v.105, p.3-7, 1994.

JACKSON, W.A.; VOLK, R.J. Attributes of the nitrogen uptake system of maize *Zea mays* L.: maximal suppression by exposure to both nitrate and ammonium. **New Phytology**, v. 120, p. 327-335, 1995.

KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, v. 106, p. 817-821, 1994.

LANCIEN, M.; GADAL, P.; HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. **Plant Physiology**, v. 123, p. 817-824, 2000.

LEA, U.S.; LEYDECKER, M-T.; QUILLERÉ, I.; MEYER, C.; LILLO, C. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1085-1094, 2006.

LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, v. 251, p. 614–516, 1974.

LEJAY, L.; GANSEL, X.; CERESO, M.; TILLARD, P.; MULLER, C.; KRAPP, A.; VON WIRE, N.N.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. **The Plant Cell**, v. 15, p. 2218-2232, 2003.

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

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

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2000, v. 1, 352p.

MAGALHÃES, J.R.; MACHADO, A.T.; FERNANDES, M.S. Nitrogen assimilation efficient in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 163-166, 1993.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995, 889p.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C; REISDORF-CREN, M.; PAGEAU, K.; LELANDAIS, M.; GRANDJEAN, O.; KRONENBERGER, J.; VALADIER, M.; FERAUD, M.; JOUGLET, T.; SUZUKI, A. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, v. 140, p. 444–456, 2006.

MCNALLY, S.F.; HIREL, B.; GADAL, P.; MANN, A.F.; STEWART, G.R. Glutamine synthetases of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. **Plant Physiology**, v. 72, p. 22–25, 1983.

MELO-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, I.C.; CORUZZI, G.M. Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 4718-4723, 1996.

MELZER, A.; GEBAUER, G.; REHDER, H. Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. **Oecologia**, v. 63, n. 3, p. 380-385, 1984.

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v. 15, p. 873-885, 1976.

MIFLIN, B.J.; HABASH, D.Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 979–987, 2002.

MILLARD, P.; NEILSEN, G.H. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilization of stores N for the seasonal growth of apple trees. **Annals of Botany**, v. 63, p. 301-309, 1989.

MORGAN, J.A.; PARTON, W.J. Characteristics of ammonia from spring wheat. **Crop Science**, n.29, p. 726-731, 1989.

NAUTIYAL, A.R.; PUROHIT, A.N. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. **Seed Science and Technology**, v.13, p.69-76, 1985.

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

OAKS, A. Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. **Canadian Journal Botany**, v.73, p. 1116-1117, 1995.

ORIHUEL-IRANZO, B.; CAMPBELL, W.H. Development of NAD(P)H: and NADH: nitrate reductase activities in soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v. 65, p. 595-599, 1980.

PEREIRA, J. P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 237-244, 1980.

PERSSON, J.; GARDESTRÖM, P.; NASHOLM, T. Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n. 11, p. 2651-2659, 2006.

PURCINO, A.A.C.; PAIVA, E.; SILVA, M.R.; ANDRADE, S.R.M. Influence of *Azospinillum* inoculation and nitrogen supply on the grain yield, and carbon- and nitrogen-assimilating enzymes in maize. **Journal of plant nutrition**, v. 19, p. 1045-1060, 1996.

RAAB, T.K.; TERRY, N. Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO_3^- versus NH_4^+ . **Plant Physiology**, v. 107, p. 575-584, 1995.

SANDOVAL, V.M.; ALCANTAR, G.G.; TIRADO, T.J.L. Use of ammonium in nutrient solutions. **Journal Plant Nutrition**, v. 18, p. 1449-1457, 1995.

SECHLEY, K.A.; YAMAYA, T.; OAKS, T. Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. **Internacional Review Cytology**, v. 134, p. 85-163, 1992.

SCHEIBLE, W-R.; GONZÁLES-FONTES, A.; LAUERER, M.; MÜLLER-RÖBERT, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v. 9, p. 783-798, 1997.

SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 609-620, 1996.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 225-253, 1990.

STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 959-970, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed, Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TEMPLE, S.J.; VANCE, C.P.; GANTT, J.S. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends Plant Science**, v. 3, p. 51-56, 1998.

THORNTON, B. Inhibition of nitrate influx by glutamine in *Lolium perenne* depends upon the contribution of the HATS to the total influx. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 761-769, 2004.

VALARINI, M.J.; GODOY, R. Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 500-504, 1994.

VIDMAR, J.J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M.Y.; SCHOERRING, J.K.; TOURAINÉ, B.; GLASS, A.D.M. Regulation of high affinity nitrate transporter genes and high affinity nitrate influx by nitrogen pools in plant roots. **Plant Physiology**, v. 123, p. 307-318, 2000.

VIÉGAS, I. de J.M.; HAAG, H.P.; BUENO, N.; PEREIRA, J. da P. Nutrição mineral de seringueira. XII. Absorção de macro e micronutrientes nos primeiros 240 dias. **Scientia Agricola**, v. 49, n. 1, p. 41-52, 1992.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T.C. **Amazônia**: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: Ceres, 1987. 416p.

WEINER, H.; KAISER, W.M. Binding 14-3-3 protein is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. **FEBS Letters**, v. 480, p. 217-220, 2001.

WETSELAAR, R.; FARQUHAR, G.D. Nitrogen losses from tops of plants. **Advances in Agronomy**, n. 23, p. 263-302, 1980.

WOO, K.C.; OSMOND, B. Stimulation of ammonia and 2-oxoglutarate-dependent O₂ evolution in isolated chloroplast by dicarboxylates and the role of the chloroplast in photorespiratory nitrogen recycling. **Plant Physiology**, v. 69, p. 591-596, 1982.

YAMAYA, T.; OAKS, A. Synthesis of glutamate by mitochondria - an anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 749-756, 1987.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analytic**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YONEYAMA, T.; YAMADA, H.; YAMAGATA, M.; KOUCHI, H. Nitrate reduction and partitioning of nitrogen in Komatsuna (*Brassica campestris* L. var. *rapa*) plants: compartmental analysis in combination with ¹⁵N tracer experiments. **Plant and Cell Physiology**, v. 28, n. 4, p. 679-696, 1987.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS DURANTE O ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

RESUMO

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. Caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes. In: **Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. ADR. De Juss.) Muell. Arg.] e caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes**. LAVRAS: UFLA, 2011. Cap 2, p.89-111. (Tese - Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

A recalcitrância, característica fisiológica apresentada pelas sementes de seringueira, é um dos principais problemas a ser minimizado quando o armazenamento se faz necessário, pois conduz a diversas alterações bioquímicas e metabólicas que diminui a longevidade das mesmas. Sementes de seringueira possuem alto conteúdo lipídico, susceptíveis à oxidação devido à presença de insaturações, favorecendo a sua degradação e a perda da qualidade do óleo vegetal. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar os lipídeos presentes no óleo de sementes de seringueira durante o armazenamento, no intuito de avaliar a modificação lipídica decorrente dos processos peroxidativos. O óleo vegetal foi obtido de sementes armazenadas a zero, 60 e 105 dias, por meio da extração contínua com éter etílico em aparato de soxhlet. A determinação da composição química foi feita por CG/EM e os padrões de similaridade estrutural, comparados à espectroscopia Wiley 275. Observa-se, que o óleo de sementes de seringueira, no 0 dia de armazenamento, tem como constituintes os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, sendo este último mais abundante. Aos 60 dias, observa-se o aparecimento do ácido oleico e, aos 105 dias, o total desaparecimento do ácido linolênico sendo o ácido oleico, nesse período, o composto de maior abundância. Dessa forma, conclui-se que, durante o armazenamento, há redução no número de insaturações dos ácidos graxos em função da peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Lipídeos. Caracterização. Armazenamento.

*Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA.

ABSTRACT

SHAN, Andrea Yu Kwan Villar. Lipids characterization of seed storage. In: **Nitrogen assimilation in seedlings of rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. FROM JUSS.) MUELL. ARG.] and lipids characterization of seed storage**. LAVRAS: UFLA, 2011. Chapter 2, p. 89-111. (Thesis - Doctorate in Agronomy/Plant Physiology)*

The recalcitrance, physiology characteristic presented by rubber tree seeds is the most problems to be minimized when the storage is necessary, because it leads to diverse biochemistry and metabolic alteration that decrease the longevity. Rubber tree seeds has high lipid content susceptible to oxidation due to unsaturation presence, which favoring its degradation and loss of vegetal oil quality. Thus, this work was carried out with the objective to characterize the lipids present in rubber seeds oil during the storage and the aim to evaluate the lipid modification due peroxidative process. The vegetal oil was obtained from seeds storage from 0, 60 and 105 days, by continuous extraction with ethyl ether in soxhlet apparatus. The chemistry composition was determined by GC/MS and the structural similarity pattern compared to espectroteca Wiley 275. It can be observed by results that the rubber tree seeds oil to 0 day of storage has as constituents palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, being the latter more abundant. At 60 days is observed the oleic acid appearance and at 105 days the total disappearance of linolenic acid and oleic acid in this period is the most abundant compound. Thus, it can be conclude that during storage the number of unsaturated fatty acids is a reduced in function of lipid peroxidation.

Key-words: Lipids. Characterization. Storage.

* Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Adviser).

1 INTRODUÇÃO

A seringueira é uma planta amplamente conhecida e explorada devido à sua capacidade de produção da borracha natural, cuja matéria-prima é utilizada na fabricação de pneumáticos e em um grande número de manufaturados imprescindíveis à vida moderna.

No Brasil, atualmente, sua propagação é feita pelo método de reprodução assexuada conhecido como enxertia, e suas sementes ficam restritas quase que exclusivamente para a produção de porta-enxertos. Entretanto, no processo de globalização, há uma enorme tendência em se buscar maior aproveitamento dos recursos fornecidos por uma cultura. Nesse sentido, a cultura da seringueira tem se destacado não só pela qualidade do látex do qual se extrai a borracha natural, mas também pela madeira que vem sendo utilizada em grande escala pela indústria moveleira e pelo uso de suas sementes como fonte de subprodutos como sabão, cosméticos, resinas, vernizes e tintas e na ração animal. Mais recentemente, as sementes mostraram-se como uma alternativa à produção de biodiesel, já que são classificadas como oleaginosas, devido ao alto conteúdo de lipídios de reserva, principalmente triglicerídeos. Assim, em países asiáticos têm sido desenvolvidas pesquisas sobre as possibilidades de aproveitamento destas sementes como combustível alternativo na indústria automotiva.

No entanto, sua característica recalcitrante lhes confere, entre outros fatores, perda de viabilidade germinativa, como consequência de um processo deteriorativo provocado por alterações bioquímicas e metabólicas que podem comprometer sua utilização, transformando-se em um problema para a produção em escala comercial.

Entre essas alterações, podem-se citar a redução da síntese proteica e a degradação de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Estes últimos, os quais abrangem tanto aqueles de reserva como também estruturais, devido ao alto grau de insaturação de sua estrutura química, são mais susceptíveis a oxidações enzimáticas e espontâneas, as quais geram espécies altamente destrutivas que, em cadeia, favorecem a rápida deterioração e a morte celular.

Em estudos realizados anteriormente, visando minimizar os efeitos da recalitrância de sementes de seringueira durante seu armazenamento, foi demonstrada a existência de degradação de lipídios, provavelmente associado à reação de peroxidação (BONOME, 2006), o qual pode ser um indicativo do estresse oxidativo celular.

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma série de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados, conduzindo à destruição de sua estrutura, à falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular (PORTER, 1984). Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a composição lipídica do óleo de sementes de seringueira em função do período de armazenamento, no intuito de correlacionar suas possíveis alterações ao processo peroxidativo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A cultura da seringueira vem sendo explorada para fins comerciais desde o final do século XIX. Sua grande importância econômica vem do fato de ser a maior fonte natural de borracha, a qual apresenta propriedades físicas e químicas superiores às borrachas sintéticas, tais como elasticidade, flexibilidade, resistência à abrasão e à corrosão, impermeabilidade e fácil adesão a tecidos e ao aço (CORNISH, 2001). Atualmente, é uma espécie que se destaca não só pela borracha, mas por todos os produtos que tem a oferecer.

A madeira de seringueira, por exemplo, tornou-se importante fonte de renda após a exploração do látex (GORINI, 2000). A Malásia, onde 70% da madeira utilizada é oriunda da seringueira, se destaca pela produção e exportação de móveis para o Japão e, em alguns países, como Índia, Nigéria e Sri Lanka, outra parte da planta, a semente, tem recebido atenção especial, com exceção daquela associada à propagação (MAY; GONÇALVES, 1999).

Nos países anteriormente citados, as sementes são utilizadas como fonte de matéria-prima para revestimento anticorrosivo e adesivo, para alimentação animal na substituição ao óleo de linhaça, para a indústria de tintas, para a produção de sabões e resinas e para a produção de biodiesel (TEAN; SAETH; SAMKOL, 2002).

As sementes são de formas bem variáveis, desde globosa até alongada, envolvidas por uma cápsula piramidal, de pericarpo lenhoso, formando o fruto de característica trilocular. O tegumento mostra-se coriáceo, com superfície externa brilhante e manchada, e o endosperma é dicotiledonar (CASTRO; VIRGENS FILHO, 1987). Segundo Alencar (2003), aproximadamente 47% da semente seca representa o endosperma, 45% o tegumento, 7% os cotilédones e 0,5% o eixo embrionário.

Quanto aos seus constituintes químicos, vários autores determinaram como majoritários os lipídeos e, em menores proporções, frações proteicas e carboidratos, classificando-as como oleaginosas. Selle *et al.* (1983) e Nwokolo (1987) encontraram teores de lipídeos em torno de 48%. Em outro experimento, Aigbodion (1994) estimou que as sementes contêm quantidade média de 43% de óleo, podendo variar de 38% até 46%. Mais recentemente, Alencar (2003) determinou que a fração lipídica de sementes produzidas no Brasil tinha teores de 37,5%, enquanto Bonome (2006), em torno de 45%.

Os óleos vegetais são constituídos, basicamente, por triglicerídeos, moléculas nas quais cadeias longas de ácido graxo (12 a 24 átomos de carbono), com diferentes graus de insaturação, são unidas às hidroxilas do glicerol, formando uma molécula triesterificada de alto peso molecular (600 a 900 g. mol⁻¹). De forma geral, estão presentes em aproximadamente 95% do óleo, enquanto o restante é constituído de ácidos graxos livres, fosfolipídeos, carotenos, tocoferóis e traços de água (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Geralmente, a composição química em ácidos graxos, embora seja variável de espécie para espécie, inclui os ácidos láurico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico em maior quantidade, podendo constituir até 60% da massa de algumas sementes oleaginosas (BUCKERIDGE *et al.* 2004).

No óleo de sementes de seringueira, Ikwuagwu, Ononogibu e Njoku (2000) demonstraram a existência de ácidos graxos insaturados predominantemente, entre eles os ácidos palmitoleico (16:1^{Δ9}), oleico (18:1^{Δ9}), linoleico (18:2^{Δ9,12}), linolênico (18:3^{Δ9,12,15}) e araquidoleico (20:4^{Δ5,8,11,14}). No entanto, tanto o teor do óleo como sua constituição química são bastante variáveis, pois dependem tanto dos fatores genéticos quanto ambientais. Neste contexto, por serem as sementes de seringueira recalcitrantes, a tendência é de que existam alterações bioquímicas, metabólicas e fisiológicas oriundas dos

inúmeros processos deteriorativos que se iniciam a partir da colheita até a semeadura.

Sementes recalcitrantes são dispersas da planta-mãe com alto nível de água e são intolerantes à dessecação, mantendo-se com grau de umidade suficiente para a aceleração do processo respiratório, culminando em uma redução acentuada da disponibilidade de reservas (FARRAND; PAMMENTER; BERJAK, 1988). Segundo Moretto e Fett (1998), quanto maior for a taxa respiratória das sementes, mais rápida será a deterioração da matéria-prima armazenada.

Modificações expressivas são observadas nas principais reservas das sementes quando estão em processo de deterioração. De acordo com Abdul-Baki e Anderson (1972), há um aumento de ácidos graxos livres, de fosfatos ácidos e de aminoácidos, produzidos pela ação das lipases, das fitases e das proteases, respectivamente, acidificando o vacúolo e favorecendo a produção de radicais livres que, por sua vez, aceleram o processo degradativo. Entre os três grupos, o maior e o mais rápido aumento ocorre nos ácidos graxos que, por possuírem mais insaturações, são mais susceptíveis à peroxidação (SMITH; BERJAK, 1995).

As reações peroxidativas em lipídios são as maiores causas de deteriorações das sementes durante o seu envelhecimento. Iniciam-se com a geração espontânea de radicais livres por meio da auto-oxidação ou por catálises enzimáticas oxidativas (FERGUSON *et al.*, 1990). Estes radicais livres podem produzir danos em membranas e continuar a propagar outros radicais livres, gerando uma reação em cadeia que termina em um processo degenerativo irreversível que conduz à perda da viabilidade germinativa (McDONALD, 1999). Além disso, a modificação lipídica causada pelas reações peroxidativas influencia negativamente as propriedades do óleo exploradas para a produção de biodiesel, tais como o número de cetano, o calor de combustão, a viscosidade e o

ponto de entupimento (TECPAR, 2004), sendo de fundamental importância determinar a extensão da deteriorização no intuito de definir um tempo limite de armazenamento em que as sementes ainda seriam viáveis para tal.

Segundo Bewley e Black (1994), a peroxidação de lipídios acontece pela remoção de um hidrogênio de um grupo metil adjacente à dupla ligação de um ácido graxo insaturado, produzindo um radical livre e um ácido. Este reage com o oxigênio molecular, resultando em um rearranjo na cadeia do ácido graxo, culminando com a formação de um radical peróxido que, por sua vez, reage com outro ácido graxo insaturado, formando um hidroperóxido, o qual é instável e se degrada favorecendo a formação de novos radicais livres, perpetuando o processo. Alternativamente a esse processo, a lipoxigenase, uma enzima presente em sementes, também é capaz de produzir oxigênio reativo que, por sua vez, catalisa a reação de peroxidação de lipídios, utilizando como substrato os fosfolipídios da membrana (WANG *et al.*, 1990).

Bonome (2006), estudando o comportamento bioquímico e fisiológico de sementes de seringueira durante o armazenamento, objetivando a manutenção da viabilidade das mesmas, observou a ocorrência de peroxidação mesmo no tratamento em que obteve melhor resposta, atribuindo a posterior queda na taxa de reação à possível ausência de substrato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas do Departamento de Biologia, em conjunto com o Laboratório de Produtos Vegetais, no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Aquisição das sementes

As sementes de seringueira utilizadas neste trabalho foram provenientes de plantios policlonais pertencentes à fazenda Água Milagrosa, localizada no município de Tabapuã, estado de São Paulo.

As sementes foram colhidas na primeira quinzena de março de 2004 e imediatamente transportadas para a UFLA. Em seguida, foram repartidas em porções e acondicionadas em sacos de papel de 3 kg, os quais, posteriormente, foram embalados em sacos de polietileno, lacrados e perfurados com auxílio de uma agulha (6 orifícios), como recomendado por Pereira (1980) e modificado por Bonome (2006). Concluído o processo de embalagem, as sementes foram armazenadas à temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$, por um período de 105 dias.

3.2 Preparação do material vegetal

Em intervalos de 0, 60 e 105 dias de armazenamento, amostras de sementes foram retiradas de suas embalagens, destegumentadas e, posteriormente, com o auxílio de um bisturi, submetidas à separação do embrião em relação ao endosperma. Imediatamente depois desse procedimento, os endospermas foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer, a -80°C , até a realização da liofilização.

Concluída a liofilização do material, realizou-se a moagem em moinho resfriado a 4°C e o material moído foi utilizado para a extração e análise do óleo vegetal.

3.3 Análise do óleo vegetal

3.3.1 Obtenção do óleo

Para a obtenção do óleo vegetal, o material vegetal (endosperma) foi submetido à extração contínua com éter etílico, em temperatura de 60°C, por 4 horas, utilizando-se um aparato de Soxhlet. Depois, foi conduzido a um evaporador rotatório sob pressão reduzida para a recuperação do solvente e a obtenção do óleo puro.

3.3.2 Determinação da composição química

A determinação da composição química do óleo foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), utilizando-se cromatógrafo gasoso Hewlett Packard G-1530A, coluna cromatográfica DB-1 (30m X 0,25mm X 0,25mm) e espectrômetro de massas Hewlett Packard 5973.

Para a corrida cromatográfica, as amostras foram derivatizadas com diazometano e as condições de operação adotadas foram: temperatura do injetor em 270°C, temperatura da linha de transferência em 290°C, gás de arraste hélio (1 mL/min), razão de split 1:20, energia de impacto eletrônico 70 eV com programação de temperatura: iniciando 100°C/4minutos (delay), aumentando-se 5°C/minuto até atingir 290°C, permanecendo a esta temperatura por 5 minutos. Tempo de não detecção do solvente (delay): 4 minutos.

Os picos espectrais obtidos foram comparados com uma espectrostecca Wiley 275 Hewlett Packard 1984-1994 Versão G1034C, para a determinação dos padrões de similaridade estrutural.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 15, 16, 17, observam-se os cromatogramas obtidos do óleo das sementes armazenadas a 0, 60 e 105 dias, respectivamente e nas Tabelas 4, 5 e 6, os constituintes lipídicos identificados e listados pelo tempo de eluição.

De maneira geral, observa-se que o óleo é constituído de ácidos graxos saturados de 16 e 18 carbonos e insaturados de 18 carbonos. Entre os ácidos graxos saturados foram identificados os ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0), e insaturados, oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3), corroborando s dados observados em sementes de seringueira, por Aigbodion (1994) e Ikwuagwu, Ononogibu e Njoku (2000).

A zero dia de armazenamento, observa-se que o ácido graxo mais abundante é o linolênico, seguido do linoleico e dos ácidos esteárico e palmítico, corroborando os resultados obtidos por Haridasan (1992), com sementes de seringueira recém-coletadas (Tabela 4). Similarmente ao demonstrado pelo referido autor, os ácidos graxos insaturados existem em maior percentual.

Njoku (1996) demonstraram que o óleo de sementes de seringueira é constituído por aproximadamente 17%-20% de ácidos graxos saturados (mirístico, palmítico, esteárico, entre outros) e 77%-82% de ácidos graxos insaturados (palmitoleico, oleico, linoleico, linolênico e araquidolênico).

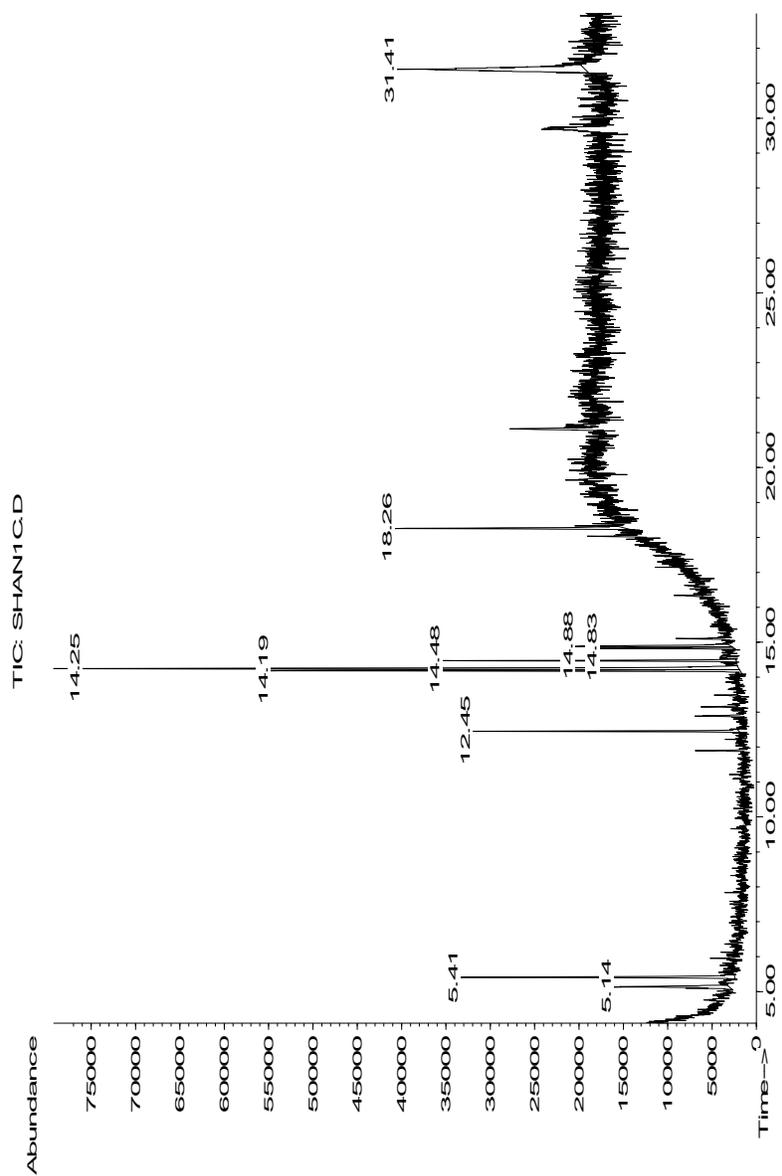


Figura 15 Cromatograma do óleo de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, a zero dia de armazenamento. UFLA, Lavras, MG

Tabela 4 Composição lipídica de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, a zero dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG

Nº	Tempo de retenção	Razão (%)	Composto	Nome comum
1	12.45	28.05	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico
2	14.19	55.52	Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico
3	14.25	100.00	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	Ácido linolênico
4	14.48	33.17	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico

Aos 60 dias de armazenamento, não se verificam mudanças na composição química, exceto pelo aparecimento do ácido oleico em pequenas proporções, como se observa na Tabela 5.

O aparecimento do ácido oleico, um composto monoinsaturado, provavelmente já constitui uma evidência da peroxidação dos ácidos insaturados di e tri-insaturados, presentes em maior proporção, ao longo do armazenamento.

Paula *et al.* (1997) observaram redução dos três ácidos graxos analisados (linolênico, linoleico e oleico), quando as sementes foram armazenadas a 20°C, durante um período de 60 dias, considerando essa redução uma indicação de que os lipídios estariam passando por processo de peroxidação.

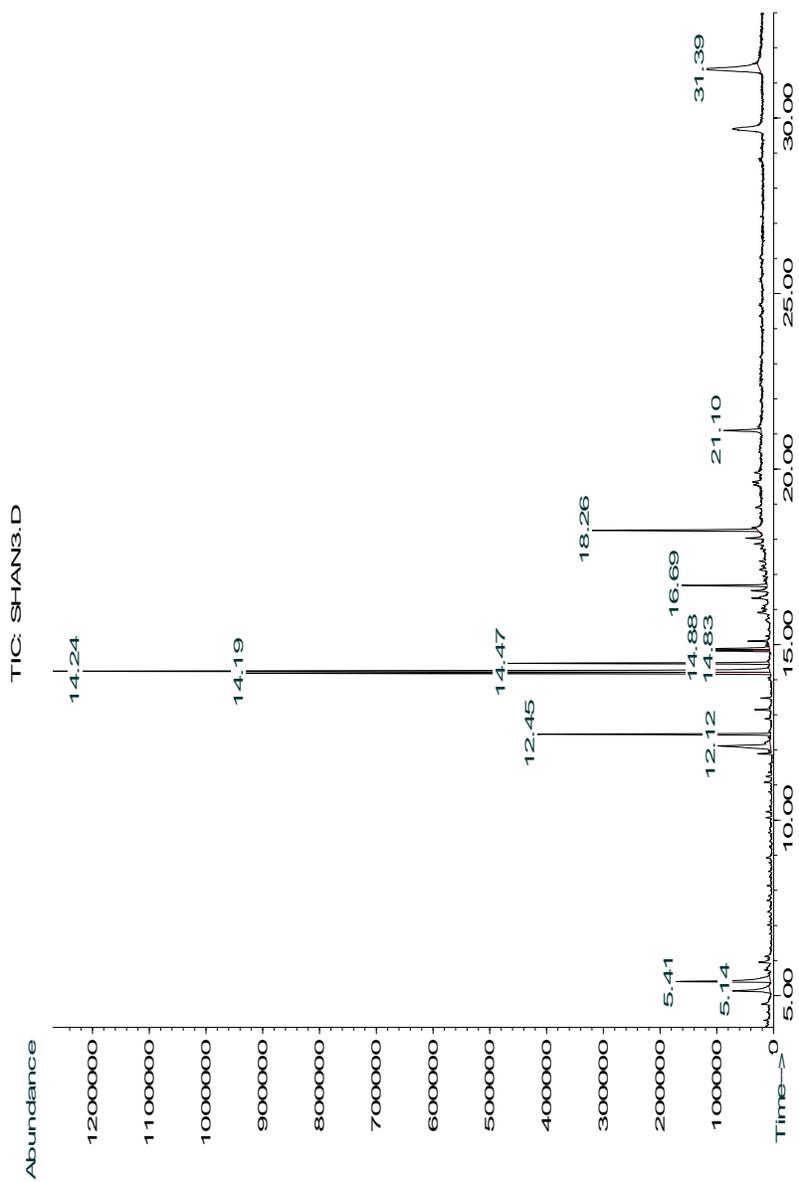


Figura 16 Cromatograma do óleo de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, aos 60 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG

Tabela 5 Composição lipídica de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, aos 60 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG

Nº	Tempo de retenção	Razão (%)	Composto	Nome comum
1	12.45	25.91	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico
2	14.18	58.92	Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico
3	14.25	100.00	Ácido (Z)-9,12,15-octadecenoico	Ácido linolênico
4	14.47	28.14	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico
5	14.83	6.25	Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico
6	14.88	10.90	Ácido (Z)- 9-octadecenoico	Ácido oleico

Pelos dados da Tabela 6, observa-se que, aos 105 dias de armazenamento, o ácido graxo de maior abundância é o oleico, enquanto se verifica a ausência total do ácido linolênico, podendo atribuir a esse fato à destruição das duplas ligações presentes no ácido, decorrentes da peroxidação.

Bonome (2006), estudando as alterações bioquímicas em sementes de seringueira durante o armazenamento, observou aumento da peroxidação de lipídios nos primeiros 100 dias de armazenamento, em todos os tratamentos testados com tendência de queda após esse período, excetuando-se aquele em que as sementes foram armazenadas à temperatura ambiente e sem tratamento fungicida, como é o caso das amostras testadas neste experimento. Nesse caso, ao invés de aumento, foi observado um decréscimo durante todo o período de armazenamento.

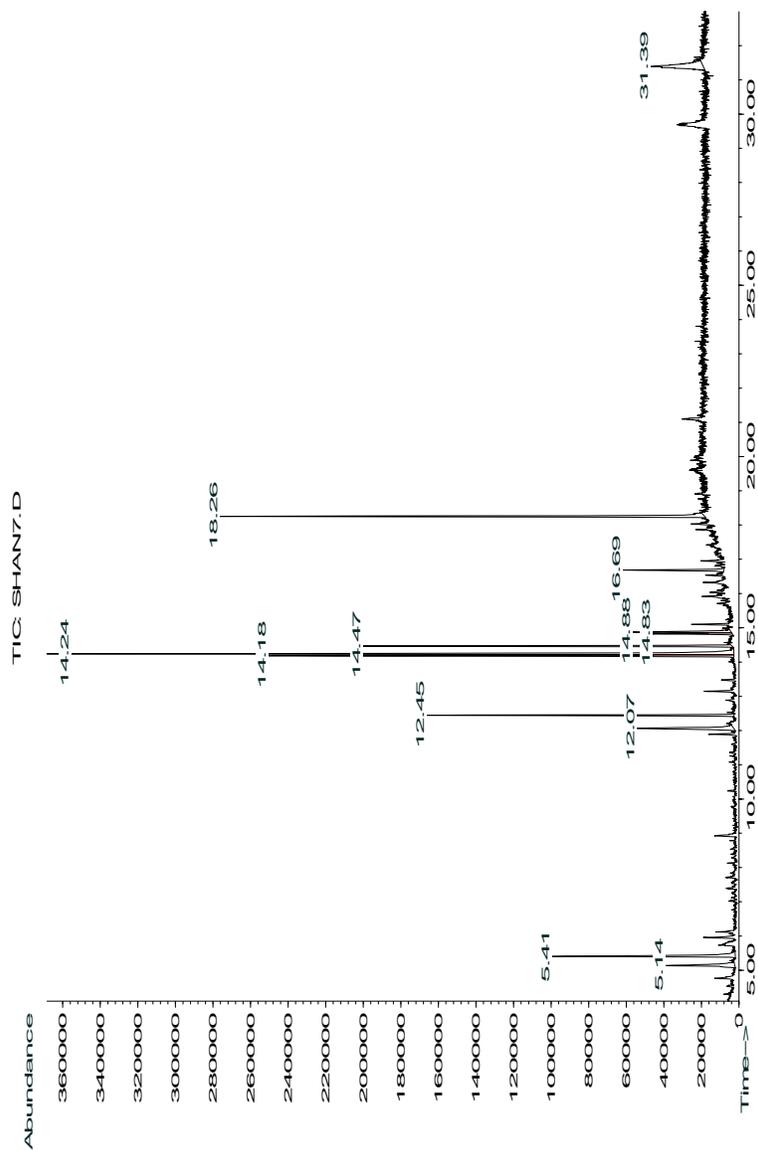


Figura 17 Cromatograma do óleo de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, aos 105 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG

Tabela 6 Composição lipídica de sementes de seringueira não tratadas, à temperatura ambiente, aos 105 dias de armazenamento. UFLA, Lavras, MG

Nº	Tempo de retenção	Razão (%)	Composto	Nome comum
1	12.45	33.31	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico
2	14.19	54.21	Ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico
3	14.24	100.00	Ácido (Z)-9-octadecenoico	Ácido oleico
4	14.47	40.31	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico
5	14.88	15.37	Ácido (Z)- 9-octadecenoico	Ácido oleico

Stewart e Bewley (1980), avaliando a peroxidação de lipídios em eixo embrionário de sementes de soja submetidas ao envelhecimento acelerado, verificaram incremento na peroxidação de lipídios nos primeiros dias de envelhecimento e posterior queda nesses valores com o avanço do mesmo, ocorrido em função da redução no teor do ácido linolênico, o que implica na redução dos pontos susceptíveis ao ataque radicalar. Segundo Bewley e Black, (1994), os ácidos graxos insaturados são os substratos iniciais para a peroxidação.

Aigobodion (1994), estudando a modificação na composição química dos ácidos graxos em sementes de seringueira recém-colhidas e armazenadas por um ano, demonstrou que a fração composta dos ácidos graxos insaturados foi significativamente diferente após um ano de armazenamento, mostrando diminuição do ácido linolênico e aumento dos ácidos linoleico e oleico. Vale ressaltar que estes resultados corroboram os observados no presente estudo.

5 CONCLUSÕES

1. O óleo de sementes de seringueira a 0 dia de armazenamento é constituído dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, sendo este último mais abundante.

2. Aos 60 dias de armazenamento, a composição lipídica é acrescida por pequenas frações do ácido oleico em relação ao composto de maior abundância, o ácido linolênico.

3. Aos 105 dias de armazenamento, há completo desaparecimento do ácido linolênico, sendo o composto de maior abundância o ácido oleico.

4. O grau de insaturação dos ácidos graxos diminui devido à peroxidação lipídica durante o armazenamento, contribuindo para o processo degenerativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. In: KOSLOWSKI, T. T. **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. v. 1, 416 p.

AIGBODION, A. Effect of storage of seeds on quality of rubber seed oil. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, v. 7, n. 2, p. 141-143, 1994.

ALENCAR, M. A. A. de. **Mobilização e distribuição de reservas de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante a germinação e o crescimento inicial**. 59p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BONOME, L.T. da S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento**. 124p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A.S. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

CASTRO, P.R.C.; VIRGENS FILHO, A.C. Ecofisiologia da seringueira. In: **Ecofisiologia da produção agrícola**. Potafós: Piracicaba, 1987. 249p.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1123-1134, 2001.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Recalcitrance: a current assessment. **Seed Science and Technology**, v.16, p.155-166, 1988.

FERGUSON, J.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.M. Changes during early soybean seed and axes deterioration: **Lipids Crop Science**, v.30, p.179-182, 1990.

GORINI, A.P.F. **A indústria de móveis no Brasil**. São Paulo: Associação Brasileira das Indústrias do Mobiliário – Abimóvel, 2000. 80p.

HARIDASAN, V. Ancillary income from rubber plantations. In: SETHURAJ, M.R.; ATHEW, N.M. eds. **Natural rubber: biology cultivation and technology**. Índia, Elsevier Science Publishers, 1992, p. 561-567.

IKWUAGWU, O.E.; ONONOGBU, I.C.; NJOKU, O.U. Production of biodiesel using rubber [*Hevea brasiliensis* (Kunth. Muell.)] seed oil. **Industrial Crops and Products**, v. 12, p. 58-62, 2000.

MAY, A.; GONÇALVES, P.S. Produtos complementares do seringal. **Borracha Atual**, v. 5, n. 20, p. 17-22, 1999.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 150 p.

NJOKU, O.U. **The cell wall structures and the industrial utilization of the oil of para-rubber seed in paint manufacture**, 80p. (Ph D. Thesis).University of Nigeria, Nsukka, 1996.

NWOKOLO, E. Biochemical and nutritional qualities of rubber-sees meal. **Tropical Agriculture**, v. 64, n. 3, p. 170-171, 1987.

PAULA, N. F.; BORGES, E.E. de L.; BORGES, R. de C.G.; PAULA, R.C. de. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p.326-333, 1997.

PEREIRA, J. P. Conservação da viabilidade do poder germinativo da semente de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 237-244, 1980.

PORTER, N.A. Chemistry of Lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.105, p.273-282, 1984.

SELLE, C.M.; GONZÁLEZ DE MÉLIA, E.; ELIAS, L.G.; BRESSANI, R. Evaluation of chemical and nutritional characteristics of the seeds of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Archivos latinoamericanos de Nutrición**. Caracas, n. 33, p. 884-901, 1983.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with the loss of viability of storage desiccation-tolerant and desiccation –sensitive seeds. In: KIMOJEL, Y.; GOLILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.

STEWART, R. R. C.; BEWLEY, J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 245-248, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed, Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TEAN, B; LY, J.; SAETH, K.; SAMKOL, P. Utilization by pigs of diets containing Cambodian rubber seed meal. **Livestock Research for Rural Development**, v.14, n. 1. Disponível em <http://cipav.org.co/lrrd/lrrd14/1/ly141.htm>

TECPAR. **Instituto de Tecnologia do Paraná**. Paraná, 2004. Disponível em: <<http://www.tecpar.br/cebio/>. Acesso em: 17 dez 2004.

WANG, J.; FUGIMOTO, K.; MIYAZAWA, T.; ENDO, Y.; KITAMURA, K. Sensitivity of lipoxygenase-lacking soybean seeds to accelerated aging and their chemiluminescence levels. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, p. 3739-3742, 1990.

ANEXOS

ANEXOS A

ANEXO 1A	Resumo da análise de variância (ANOVA) de acordo com o esquema fatorial 3x2 com o desdobramento das interações entre diferentes fontes de nitrogênio <i>versus</i> tempo de absorção, da concentração de amônio, nitrato e nitrogênio total em raiz, caule, folha e planta de seringueira. UFLA, Lavras, MG113
ANEXO 2A	Resumo da análise de variância (ANOVA) de acordo com o esquema fatorial 3x2 com o desdobramento das interações entre diferentes fontes de nitrogênio <i>versus</i> tempo de absorção, da concentração de aminoácidos livres e proteínas solúveis totais em raiz, caule, folha e planta de seringueira. UFLA, Lavras, MG114
ANEXO 3A	Resumo da análise de variância (ANOVA) de acordo com o esquema fatorial 3x2 com o desdobramento das interações entre diferentes fontes de nitrogênio <i>versus</i> tempo de absorção, das atividades das enzimas RN na raiz e caule, NADH-GOGAT na raiz e caule, GDH na raiz caule e folha e GS na raiz, caule e folha de plantas de seringueira. UFLA, Lavras, MG115

Anexo 1A Resumo da análise de variância (ANOVA) de acordo com o esquema fatorial 3x2, com o desdobramento das interações entre diferentes fontes de nitrogênio *versus* tempo de absorção, da concentração de amônio, nitrato e nitrogênio total em raiz, caule, folha e planta de seringueira. UFLA, Lavras, MG

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS											
		RNH ₄	CNH ₄	FNH ₄	NH ₄ PLAN	RNO ₃	CNO ₃	FNO ₃	NO ₃ PLAN	RNT	CNT	FNT	NTPLAN
Fonte de nitrogênio (N)	2	0,2278**	1,0276**	0,0532**	0,8952**	243,65**	16,051**	2,3360ns	326,94**	0,1239**	0,1134**	0,0898**	2,5028**
Tempo (T)	2	37,772**	10,210**	0,2986**	12,229**	196,51**	5,7899**	520,45**	1185,1**	0,0893*	0,0120ns	0,5497**	1,3217**
Interação NxT	4	1,0313**	0,8226**	0,2286**	0,5854**	123,20**	16,699**	22,502**	250,27**	0,2131**	0,0547ns	0,8851**	2,6000**
Tratamentos	(5)												
Resíduo	27	0,0035	0,0031	0,0043	0,1170	1,2534	0,5566	1,3877	3,4248	0,0114	0,0151	0,0282	0,0426
CV (%)		1,3700	3,9400	2,6900	1,3300	7,8900	14,160	6,3500	4,8700	12,800	17,120	8,3800	5,8100
Desdobramento da interação (NxT)													
N dentro de tempo (00)	2	0,1569**	0,0063ns	0,0336**	0,0983**	10,252**	0,2863ns	9,8708**	16,809*	0,0065ns	0,0099ns	0,0076ns	0,0233ns
N dentro de tempo (27)	2	1,1022**	1,8440**	0,2481**	1,3823**	356,60**	32,464**	14,967**	560,40**	0,3305**	0,1582*	1,7673**	5,0795**
Tempo dentro de N (0 N)	2	7,4499**	0,9513**	0,1478**	4,5733**	164,73**	3,6643*	63,136**	355,93**	0,1078**	0,0312ns	0,4311**	1,3495**
Tempo dentro de N (NH ₄)	2	10,439**	7,7572**	0,5706**	1,4427**	257,13**	8,6104**	296,06**	1308,7**	0,3374**	0,0843ns	1,0461**	3,5874**
Tempo dentro de N (NO ₃)	2	21,946**	3,1474**	0,3740**	7,3836**	21,064**	26,913**	206,26**	21,016ns	0,0703ns	0,0057ns	0,8427**	1,5848**

Valores acompanhados de **, * e ^{ns} significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente. FV (fonte de variação). GL (graus de liberdade). CV% (coeficiente de variação). NITROG (tratamento com 0N, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻). TEMPO (tempo 0 DAT e 27 DAT). RNH₄ (amônio na raiz). CNH₄ (amônio no caule). FNH₄ (amônio na folha). NH₄PLAN (amônio na planta). RNO₃ (nitrato na raiz). CNO₃ (nitrato no caule). FNO₃ (nitrato na folha). NO₃PLAN (nitrato na planta). RNT (nitrogênio total na raiz). CNT (nitrogênio total no caule). FNT (nitrogênio total na folha). NTPLAN (nitrogênio total na planta).

Anexo 2A Resumo da análise de variância (ANOVA) de acordo com o esquema fatorial 3x2, com o desdobramento das interações entre diferentes fontes de nitrogênio *versus* tempo de absorção, da concentração de aminoácidos livres e proteínas solúveis totais em raiz, caule, folha e planta de seringueira. UFLA, Lavras, MG

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS							
		RAAL	CAAL	FAAL	AALPLAN	PSTR	PSTC	PSTF	PSTPLAN
Fonte de nitrogênio (N)	2	0,8483**	1,3110**	0,2362**	5,4013**	0,3975**	0,0017*	0,4454**	1,6629**
Tempo (T)	2	0,9348**	1,8106**	0,1355**	7,1855**	1,2068**	0,0000ns	2,6176**	7,4039**
Interação NxT	4	0,8583**	0,9607**	0,5168**	4,9784**	0,3869**	0,0021*	0,4969**	1,6848**
Tratamentos	8								
Resíduo	27	0,0172	0,0056	0,0139	0,0233	0,0008	0,0004	0,0454	0,0454
CV (%)		21,530	9,9800	13,220	6,7700	5,2100	12,170	10,320	7,7000
Desdobramento da interação (NxT)									
N dentro de tempo (00)	2	0,0002 ns	0,1780ns	0,0310ns	0,2240ns	0,0001ns	0,0002ns	0,0008ns	0,0002ns
N dentro de tempo (27)	2	1,7064**	2,2540**	0,7220**	10,357**	0,7842**	0,0035**	0,9461**	3,3476**
Tempo dentro de N (0 N)	2	0,0674 ns	0,0354ns	0,2088**	0,8184**	0,0039*	0,0020*	0,0206ns	0,0161ns
Tempo dentro de N (NH ₄)	2	2,4473**	3,1379**	0,0149ns	11,957**	0,6898**	0,0021*	1,3475**	3,7852**
Tempo dentro de N (NO ₃)	2	0,1368*	0,5587**	0,9455**	4,3668**	1,2869**	0,0001ns	2,2432**	6,9724**

Valores acompanhados de **, * e ^{ns} significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente. FV (fonte de variação). GL (graus de liberdade). CV% (coeficiente de variação). NITROG (tratamento com 0N, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻). TEMPO (tempo 0 DAT e 27 DAT). RAAL (aminoácido livre na raiz). CAAL (aminoácido livre no caule). FAAL (aminoácido livre na folha). AALPLAN (aminoácido livre na planta). PSTR (proteína solúvel total na raiz). PSTC (proteína solúvel total no caule). PSTF (proteína solúvel total na folha). PSTPLAN (proteína solúvel total na planta).

Anexo 3A Resumo da análise de variância (ANOVA) de acordo com o esquema fatorial 3x2, com o desdobramento das interações entre diferentes fontes de nitrogênio *versus* tempo de absorção, das atividades das enzimas RN na raiz e caule, NADH-GOGAT na raiz e no caule, GDH na raiz, no caule e na folha e GS na raiz, no caule e na folha de plantas de seringueira. UFLA, Lavras, MG

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS									
		RRN	CRN	RGOGAT	CGOGAT	RGDH	CGDH	FGDH	RGS	CGS	FGS
Fonte de nitrogênio (N)	2	0,0412**	0,0034**	2,1971**	0,7563ns	60,708**	18,504**	14,119ns	0,0148**	0,0005**	2,0761**
Tempo (T)	2	0,0002ns	0,0163**	232,35**	144,26**	1623,8**	87,914**	122,32ns	0,0517**	0,0023**	8,8422**
Interação NxT	4	0,0371**	0,0032**	2,9650**	0,9046ns	66,883**	18,482**	36,740ns	0,0132**	0,0008**	2,1122**
Tratamentos	(8)										
Residuo	27	0,0005	0,0001	0,3074	0,2783	2,0676	0,5019	30,602	0,0001	0,0001	0,0065
CV (%)		19,810	12,260	16,320	10,720	13,690	31,700	11,550	12,880	10,54	5,6600
Desdobramento da interação (NxT)											
N dentro de tempo (00)	2	0,0001ns	0,0000ns	0,0000ns	0,0112ns	0,0146ns	0,0003ns	2,7197ns	0,0000ns	0,0000ns	0,0001ns
N dentro de tempo (27)	2	0,0782**	0,6596**	4,3936**	1,6497*	136,58**	36,986**	48,139ns	0,0280**	0,0012**	4,1883**
Tempo dentro de N (0 N)	2	0,0133**	0,0011**	50,834**	53,658**	267,65**	105,11**	152,04ns	0,0000ns	0,0000ns	0,0044ns
Tempo dentro de N (NH ₄)	2	0,0152**	0,0025**	99,138**	34,223**	1043,0**	15,626**	43,718ns	0,0269**	0,0003ns	5,1866**
Tempo dentro de N (NO ₃)	2	0,0459**	0,0190**	86,770**	58,182**	446,82**	4,1404*	0,0458ns	0,0511**	0,0036**	5,8756**

Valores acompanhados de **: * e ^{ns} significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente. FV (fonte de variação). GL (graus de liberdade). CV% (coeficiente de variação). NITROG (tratamento com 0N, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻). TEMPO (tempo 0 DAT e 27 DAT). RRN (redutase do nitrato na raiz). CRN (redutase do nitrato no caule). RGOGAT (GOGAT na raiz). CGOGAT (GOGAT no caule). RGDH (GDH na raiz). CGDH (GDH no caule). FGDH (GDH na folha). RGS (GS na raiz). CGS (GS no caule). FGS (GS na folha).