

**Antônio Paulino da Costa Netto**

**EFEITO DA PRESENÇA DE NITROGÊNIO EXÓGENO (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> E/OU NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)  
SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO  
DO AMÔNIO E REMOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre"

**Orientador**  
**Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira**



**Antônio Paulino da Costa Netto**

**EFEITO DA PRESENÇA DE NITROGÊNIO EXÓGENO (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> E/OU NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)  
SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO  
DO AMÔNIO E REMOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre"

**Orientador**  
**Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira**

**LAVRAS-MINAS GERAIS**  
**1997**

**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Costa Netto, Antônio Paulino da**

**Efeito da presença de nitrogênio exógeno (N-NO<sub>3</sub> e/ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) sobre a atividade das enzimas de assimilação do amônio, e remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) / Antônio Paulino da Costa Netto. – Lavras : UFLA, 1998.**

**45 p. : il.**

**Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.**

**Dissertação (Mestrado) - UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Seringueira - Nitrogenio. 2. Remobilização de resersa. 3. Germinação. 4. Nitratq - Amônia. 5. Enzima. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-633.89253**

**Antônio Paulino da Costa Netto**

**EFEITO DA PRESENÇA DE NITROGÊNIO EXÓGENO (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> E/OU NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)  
SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO  
DO AMÔNIO E REMOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DURANTE A  
GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.)**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de mestrado em agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre"

Aprovada em 18 de Dezembro de 1996

  
Prof. Dr. José Donizeti Alves

  
Pesq. Dr. Antônio Alvaro C. Purcino

  
Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
Orientador

Aos meus pais:

Juscelino Paulino da Costa e Dalva Vitor da Costa,  
pelo esforço para propiciar-me o melhor conforto  
possível, pelo exemplo de vida, responsabilidade e pelo  
respeito demonstrado quanto a minha maneira de ser,  
agir, e pela profissão a qual escolhi,

A minha irmã Cintya Maria da Costa pelo incentivo  
e pelos momentos de descontração durante o período,

A minha namorada Dinara Pereira Lemos, pelo  
companheirismo, dedicação, solidariedade, e amor,  
durante os momentos mais difíceis e tensos, assim como,  
pela construtiva convivência nestes últimos tempos

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por manter forte minha fé e perseverança.

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

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Biologia e ao curso de Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida.

Ao professor Luiz Edson Mota de Oliveira, por confiar na minha pessoa e no meu trabalho, pela orientação e pelo exemplo profissional.

Ao professor José Donizeti Alves, por me confiar seus bens e pelo indispensável apoio e sugestões.

Ao pesquisador Antônio Álvaro Corsetti Purcino, pela ajuda, amizade, incentivo, sugestões durante a estadia no CNPMS/EMBRAPA, e na conclusão do curso.

Ao pesquisador Paulo C. Magalhães, pela confiança, disponibilidade em ajudar, sinceridade e amizade durante minha estadia em Sete Lagoas.

Aos “meninos” da iniciação científica Soami, Ricardo, Chryz e Marcos, pela ajuda e atenção dispensadas durante o experimento.

Aos professores Antônio E. Furtini Neto, Renato Paiva, Ângela M. Soares e Amauri A. Alvarenga, pelos ensinamentos e agradável convívio.

Ao professor Rubem Delly Veiga, pelos conhecimentos em estatística e pela amizade.

Aos ex-professores da UNIFENAS, Paulão, Marcelo Polo, Hudson C. Bianchini, Chico, Alexandre C., Donizetti, Ana Lúcia, Yolanda, José Carlos, Luiz Gonzaga, Idelma, Rose, Almir, Rosana, Adilson, Genevile, Carlos e Maria Emilia, pelo apoio e conselhos.

Aos funcionários da CNPMS/EMBRAPA pela ajuda no trabalho.

Aos companheiros de CNPMS, Douglas Barduche, Cláudia Labory, Geraldo Cançado, Cristiane, Marcos Godoy, “Paraná”, César, Paulo, Pedro, Walter, Luana, Cláudia e Denilson, pela força e cooperação.

Aos amigos de república Ademir, Gustavo e Marcelo pelo alegre convívio.

Aos amigos de mestrado: Evaristo, Marcel, Marlos, Gidelma, Vespa, André (*In Memoriam*), Poliana, Josirley, Vilma, Márcia, Ilka, Jefferson, Nilda, Laura, Denis, Yoko, Bigu, Pituca, Silvana, Eva, Rinã, Ana H., Gabriela, Flávia L., Flávia D., Patrícia, Paulo, Alessandro, Bárbara, Márcia D., Pedro H., Rebeca, João C., Francislei, Sandro, Aurélio, Glauber, Ângela, Moacil, Wilton, Flávia (Tiãozinho), Flávia, Cíntia, Carlos Spaggiari, Paulo Marinho, Taubaté, Tião, Elivélton, entre outros.

Aos funcionários Dargtanhan, Evaristo, Odorêncio e Joel.

Aos demais “meninos” da iniciação científica, Rafael, Rodrigo e Darlan.

Aos funcionários da Química, Solos, CPG, Biblioteca, PRPG e DRCA.

Aos amigos de pedal: Jâninho, Adriano, Buda, Marquito, Gustavo, Eduardo, Toniho, Zeca, Bruno e todo resto da galera, obrigado por mostrar que a vida não é somente feita de trabalho.

Aos amigos, Izonel C. Neto, Guilherme A. C. Gomes, e Eustáquio, pela amizade e “socorro” durante o curso.

Aos professores do Departamento de Biologia pelos conselhos e exemplo de dedicação ao ensino de nível superior.

Ao ex-professor da UFLA, Eros Gomide Alvarenga, pela confiança, bom-senso, e amizade.

A Família de Neuza Maria Periera Lemos, pela paciência e compreensão dispensada neste período de conviência.

Aos meus avós, José Braz Vitor e Adélia Carvalho Vitor, pelo exemplo de humildade e dedicação familiar.

A todos os parentes das famílias Paulino da Costa e Carvalho-Vitor, que estiveram presentes durante esta caminhada.

A todos que de alguma forma se fizeram presentes.

## **BIOGRAFIA**

Antônio Paulino da Costa Netto, filho de Juscelino Paulino da Costa e Dalva Vitor da Costa, nasceu em Alfenas-Minas Gerais, no dia 05 de Julho de 1973.

Em 1987, ingressou na Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho, tendo concluído o curso em 1990, mesmo ano onde inciou o curso de Agronomia pelo Instituto de Ciências Agrárias da Universidade de Alfenas, concluindo o mesmo em 1994. No ano de 1995, ingressou-se no curso de Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, concluindo este em Dezembro de 1997.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1) Efeito de diferentes relações $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ , na distribuição e produção de massa seca.....	3
2.2) Fontes de nitrogênio ( $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ ), mobilização de reservas e atividade das enzimas de assimilação do amônio .....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1) Obtenção das plantas e meio de cultivo.....	12
3.2) Características avaliadas .....	15
3.2.1) Determinação de massa seca e nitrogênio total .....	15
3.2.2) Obtenção dos extratos enzimáticos.....	15
3.2.3) Determinação de proteínas solúveis .....	16
3.2.4) Ensaios enzimáticos da GS, NADH-GOGAT, Fd-GOGAT e GDH.....	16
3.3) Análises eletroforéticas.....	18
3.3.1) Confecção dos géis.....	18
3.3.2) Separação eletroforética, coloração e descoloração .....	19
3.4) Western Blot .....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1) Análises eletroforéticas:.....	36
5 CONCLUSÕES .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
1	Massa Seca nas diferentes partes da semente	27
2	Massa Seca nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	28
3	Teor de nitrogênio e conteúdo de nitrogênio nas diferentes partes da semente e por semente	29
4	Conteúdo de nitrogênio nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	30
5	Proteínas solúveis totais nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	31
6	Atividade específica da GS nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	32
7	Atividade específica da NADH-GOGAT para o sistema radicular nos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	33
8	Atividade específica da FD-GOGAT para a parte aérea nos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	34
9	Atividade específica da GDH nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de $\text{N-NO}_3^-$ e/ou $\text{N-NH}_4^+$	35
10	Padrão eletroforético de proteínas obtidos em gel de poliacrilamida em gradiente de 7,5 a 18%	36
11	Western com o anticorpo da Rubisco	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Página
1	Composição das soluções nutritivas (Lemos, 1996)	14
2	Composição dos géis e sobre gel	18
3	Acúmulo de nitrogênio em pantas de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg. em função de diferentes relações de nitrato amônio no meio de cultivo	23

## RESUMO

COSTA-NETTO, Antônio Paulino da. **Efeito da presença de nitrogênio exógeno ( $\text{N-NO}_3^-$  e/ou  $\text{N-NH}_4^+$ ), sobre a atividade das enzimas de assimilação do amônio e remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plantas de Seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.).** Lavras: UFLA, 1996. 44p. (Dissertação -Mestrado em Fisiologia Vegetal).

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da ausência de nitrogênio e do seu fornecimento nas formas de  $\text{N-NO}_3^-$  e/ou  $\text{N-NH}_4^+$ , sobre a remobilização das reservas da semente, especialmente as nitrogenadas sobre, a produção de massa seca e sobre a atividade das enzimas Glutamina Sintetase (GS), Glutamato Sintase dependente de NADH (NADH-GOGAT) e dependente de Ferridoxina (Fd-GOGAT); e da Glutamato Desidrogenase (GDH), durante a germinação e estádios iniciais de desenvolvimento de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.). Este experimento foi conduzido em casa de vegetação e em sala-de-crescimento por um período de 86 dias onde foram fornecidas soluções nutritivas com as relações 0/0, 8/0, 0/8, 4/4 mM de nitrogênio na forma de nitrato e amônio com concentração de 8 mM e solução nutritiva sem nutrientes. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos contendo 3,5 litros de areia como suporte de cultivo. As soluções nutritivas foram trocadas a cada sete dias. Foram avaliados em cada fase do desenvolvimento das plantas o acúmulo de massa seca, o teor de proteínas, o conteúdo de nitrogênio e a atividade das enzimas de assimilação do amônio. Os resultados obtidos mostraram que o fornecimento de nitrogênio no meio de cultivo, não favoreceu o acúmulo e a distribuição de massa seca e do conteúdo de nitrogênio, nos estádios de desenvolvimento de emissão de radícula, pata de aranha e palito. Para o estágio de segundo lançamento foliar no tratamento onde se forneceu nitrogênio na forma amoniacal foi encontrado a menor massa seca e o maior conteúdo de nitrogênio. O menor conteúdo de nitrogênio foi observado no tratamento onde não se forneceu nutrientes. A remobilização das reservas da semente

## SUMMARY

**EFFECT OF THE PRESENCE OF EXOGEN NITROGEN (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> AND/OR N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ON THE ACTIVITY AMONIUMM ASSIMILATING ENZYMES AND THE REMOBILIZATION OF RESERVES DURING GERMINATION AND INITIAL DEVELOPMENT OF RUBBER TREE SEEDLINGS (*Hevea Brasiliensis* MUELL ARG.).**

The objective of this work was to evaluate the effects of nitrate and/or ammonium on the remobilization of seed storage nitrogen, dry matter production and activity of ammonium assimilating enzymes (GS, NADH-GOGAT, FD-GOGAT and GDH) during germination and initial development of rubber tree seedlings. This experiment was conducted in greenhouse and growth chamber during a period of 86 days. The plants were provided with nutrient solution with or without 8 mM nitrogen and different ratios of nitrate and ammonium (0/0, 8/0, 0/8, 4/4). Nutrient solutions were changed at seven days intervals. At each developmental phase dry matter, protein and nitrogen content, and the activity of ammonium assimilation enzymes were evaluated. The results showed that the presence of exogenous nitrogen did not affect dry matter production and distribution, nitrogen remobilization and the nitrogen content. The presence of exogenous nitrogen did not affect the activity of GS and FD-GOGAT in all stages of seedling development. Major activity of NADH-GOGAT and GDH was observed (in roots) in the presence of nitrate and ammonium. High activity of GDH was observed in leaves in the presence of ammonium.

# 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o elemento mineral que se encontra em maiores concentrações nos vegetais superiores, sendo encontrado num vasto número de constituintes celulares, principalmente as proteínas. No solo o nitrogênio se encontra disponível principalmente na forma nítrica ( $\text{NO}_3^-$ ) e amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ). A aquisição do nitrogênio mineral do solo pelas plantas e a sua capacidade de absorve-lo e reduzi-lo independente da forma disponível ( $\text{N-NO}_3^-$  e/ou  $\text{N-NH}_4^+$ ) pode afetar a atividade e a expressão das enzimas responsáveis pela sua assimilação, alterando desta forma o crescimento e o desenvolvimento das plantas.

Durante a germinação, os carboidratos, lipídeos, proteínas e minerais constituintes da semente são intensamente hidrolisados e remobilizados afim de atenderem a demanda de crescimento do eixo embrionário, fornecendo energia e material plástico para o posterior desenvolvimento da plântula. Durante este processo as reservas nitrogenadas, constituídas basicamente por proteínas e aminoácidos são de fundamental importância.

Este nitrogênio mobilizado dos órgãos de reserva se deve, na maioria, à atividade de proteases que realizam a hidrólise das proteínas de reserva, já que a quantidade de aminoácidos livres ou mesmo a concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  é normalmente pequena. Estes aminoácidos liberados pela hidrólise das proteínas podem sofrer aminações, desaminações, ou transaminações e serem transportados para atender as exigências das regiões de crescimento.

Na literatura existem informações de que as reservas nitrogenadas das sementes de *Hevea brasiliensis* Muell Arg. são suficientes para atender a demanda da planta durante os seus estádios iniciais de desenvolvimento (Delú-filho, 1994; Lemos, 1996). Entretanto não existem relatos dos efeitos do  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  sobre a remobilização das reservas e o comportamento das enzimas de assimilação do nitrogênio (GS, GOGAT e GDH) durante este período.

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da ausência de nitrogênio e do seu fornecimento nas formas de  $\text{N-NO}_3^-$  e/ou  $\text{N-NH}_4^+$ , sobre a remobilização das reservas da semente, especialmente as nitrogenadas sobre, a produção de fitomassa e sobre a atividade das enzimas Glutamina Sintetase (GS), Glutamato Sintase dependente de NADH (NADH-GOGAT) e dependente de Ferridoxina (Fd-GOGAT); e da Glutamato Desidrogenase (GDH), durante a germinação e estádios iniciais de desenvolvimento de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### *2.1) Efeito de diferentes relações $N-NO_3^-$ e $N-NH_4^+$ , na distribuição e produção de massa seca*

O nitrogênio encontra-se no solo tanto sob a forma orgânica quanto mineral, predominando a forma orgânica, que não é prontamente absorvida pelas plantas. Com o processo de mineralização, mediados por microorganismos, formam-se inicialmente íons amônio que podem ser prontamente absorvidos, ou sofrer o processo de nitrificação, que consiste na oxidação biológica do amônio a nitrito e posteriormente a nitrato. Invariavelmente estas reações são mediadas no solo pela atividade de dois grupos de bactérias, as Nitrossomonas (amônio a nitrito) e as Nitrobacter (nitrito a nitrato).

Na maioria dos solos cultivados, a forma predominante de nitrogênio é o nitrato, sendo esta a forma mais utilizada pelas plantas superiores. Contudo, em solos ácidos, onde a nitrificação é frequentemente inibida, o íon amônio se torna a forma predominante de nitrogênio absorvida pelas plantas.

Delú-filho (1994), estudando o fornecimento de diferentes concentrações de nitrato em plantas de seringueira com 360 dias de idade, observou que o maior acúmulo de massa seca da parte aérea ocorreu nas concentrações 8 e 12 mM, enquanto que para o sistema radicular foram observadas melhores respostas nas concentrações de 1, 2 e 4 mM. Já Lemos (1996) trabalhando plantas aos 120 dias de idade, observou um maior acúmulo e distribuição da massa seca na presença de nitrogênio exclusivamente na forma amoniacal ou ainda na relação 4/4 mM de nitrato e amônio, quando comparadas com plantas que receberam somente nitrato no meio de cultivo. Em espécies arbóreas micorrizadas Pereira et al. (1996a), verificou respostas

significativas ao fornecimento de nitrogênio, sendo que a adição do nitrato aumentou a produção de massa seca em relação a adição do amônio no meio de cultivo.

O efeito da assimilação e eficiência de utilização do nitrogênio no crescimento de culturas anuais variam em função da forma de nitrogênio fornecida. Para o feijoeiro (Guazzelli, 1988; Silva 1994), e milho (Cramer e Lewis, 1993a), o amônio parece ser a forma preferencial, enquanto que para a cevada (Lieferring, Andrews e Mckenzie, 1996), e o trigo (Cramer e Lewis, 1993a), o fornecimento de nitrato promove um aumento adicional de massa seca nas plantas.

O maior desenvolvimento de plantas de milho cultivadas na presença de amônio se deve segundo Cramer e Lewis (1993b), à maior capacidade fotossintética das plantas  $C_4$  devido ao grande suporte de “carbono” fornecido para a assimilação do amônio nas raízes. Por outro lado, para a cultura do trigo, a redução no acúmulo de massa seca das plantas nutridas com amônio se deve a menor assimilação deste elemento e conseqüentemente pelo efeito tóxico do mesmo no sistema radicular das plantas. No entanto, algumas cultivares de milho se mostraram sensíveis à presença de amônio no meio de cultivo, restringindo o seu crescimento (Schortemeyer, Stamp e Feil, 1997), devido a sua alta exigência em esqueletos de carbono para incorporar o nitrogênio via GS/GOGAT. Com o decréscimo da quantidade de carboidratos o nível de amônio nos tecidos aumenta promovendo uma ação tóxica nas plantas.

O amônio geralmente não é armazenado nas células, ou então é encontrado em pequenas quantidades. Geralmente o efeito tóxico do amônio ocorre quando há grande quantidade de amônio livre no tecido, sendo que esta toxidez se deve a uma inibição do transporte de elétrons não permitindo a fosforilação e desta forma diminuindo a taxa de crescimento em algumas espécies como o trigo (Cramer e Lewis, 1993a). Algumas plantas possuem a habilidade de armazenar o amônio em seus vacúolos mostrando taxas de crescimento satisfatórias em altas concentrações externas de amônio (Ravem e Smith, 1976).

Em alguns casos segundo Jakobs e Gülpen (1997), o amônio pode causar um desbalanço nutricional limitando cátions de grande importância como Mg, K e Ca, gerando clorose principalmente pela deficiência de Mg, sendo estes sintomas atenuados na presença de nitrato no meio de cultivo.

## ***2.2) Fontes de nitrogênio ( $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ ), mobilização de reservas e atividade das enzimas de assimilação do amônio***

O amônio pode ser proveniente de várias fontes: absorvido diretamente pelas raízes; derivado da redução do nitrato; da fixação do  $N_2$ ; da fotorrespiração ou mesmo do catabolismo de aminoácidos (Mäck, 1995; Oaks, 1994). Nas plantas este amônio sofre seguidas reduções produzindo glutamina pela ação da enzima Glutamina Sintetase (GS), e posteriormente produzindo glutamato pela ação da Glutamato Sintase (GOGAT). Alternativamente o amônio ainda pode ser reduzido a glutamato pela ação da enzima Glutamato Desidrogenase (GDH). Dentre as enzimas de assimilação do nitrogênio a GS, localiza-se no cloroplastídeo e no citossol de folhas e raízes (Oaks e Hirel, 1985). A GOGAT, localiza-se no cloroplastídeo de folhas (Mifflin e Lea, 1977) e nos plastídeos das raízes (Emes e Fowler, 1979).

McNally e Hirel (1983), relatam que durante a germinação de sementes de amendoim a forma da GS citossólica ( $GS_1$ ) se mostra responsável pela remobilização de nitrogênio das sementes, enquanto a forma cloroplastídica ( $GS_2$ ) aparece durante o processo germinativo. Do mesmo modo, observa-se um aumento gradativo da atividade da GS, durante os quatro primeiros dias da germinação em sementes de cevada (Martilla et al., 1993). A localização subcelular da enzima foi descrita no citoplasma das células epiteliais, parenquimáticas e do escutelo. Por outro lado na presença de estresse hídrico, durante a germinação de ervilha, a atividade da  $GS_1$  cai e a atividade da  $GS_2$  aumenta (Bhullar et al., 1996). Desta forma a remobilização de reservas fica comprometida pois há uma redução da degradação do amido nos cotilédones diminuindo o fornecimento de carbono para o desenvolvimento do epicótilo.

Também são relatadas na literatura, que a GS em sua forma cloroplastídica é altamente responsiva a luz e ao nitrato, o que não acontece com a GS citossólica, que parece responder melhor às concentrações de amônio no meio (Seith et al., 1994). Neste aspecto Dembrinski, Wisniewka e Bojanowska (1996) e Tjaden, Edwards e Coruzzi (1995), descrevem sobre uma flutuação da atividade da GS<sub>2</sub> de acordo com a quantidade de luz e atividade da Redutase do Nitrato (RN), observando-se aumentos da GS<sub>2</sub> na presença de luz juntamente com o aumento da atividade da RN. Na presença de luz vermelha durante a germinação, ocorreu um notado aumento do nível de GS, com sua completa supressão quando as sementes eram tratadas com cicloheximida, sugerindo desta forma sua síntese de novo. Estes autores ainda atentam que na presença de giberelina o nível de GS foi similar ao efeito da luz vermelha, e que em sementes incubadas a 35 °C a GS foi inativada (Sakamoto, Takeba e Tanaka, 1990).

São relatados em alguns casos a presença de diversas isoformas de GS no citoplasma. Segundo Sakakibara et al. (1996), Oaks (1994), Loulakakis e Angelakis (1996), ocorre uma expressão muito grande de diferentes isoformas de GS no citoplasma de acordo com a espécie, à fonte de nitrogênio ou mesmo do estágio de desenvolvimento da própria planta. Carryol et al. (1997), estudando a expressão da GS regulada pela presença do amônio no meio de cultivo, observou que a expressão desta enzima se deve a “múltiplos elementos controladores”, que respondem diferentemente ao mesmo estímulo em diversas partes da planta como anteras, raízes, pecíolos, caules e folhas. Dois genes citossólicos expressam alto nível de GS<sub>1</sub> em sementes durante o processo de germinação, sugerindo segundo Lam et al. (1996), que os mesmos controlam a síntese de glutamina e o transporte de nitrogênio para fora dos órgãos de reserva.

A quase totalidade do nitrogênio transportado em cereais encontra-se na forma de aminoácidos. Na maioria dos casos os aminoácidos mais transportados são glutamina e glutamato, sendo a produção de glutamina realizada via GS que é a enzima chave para a assimilação do amônio e produção de aminoácidos para as plantas (Lea, Robinson e Stewart, 1990).

As plantas segundo Storey (1986), possuem várias enzimas com capacidade hidrolítica que degradam proteínas, estas enzimas são chamadas proteases, e podem ser encontradas em vacúolos, citoplasmas e cloroplastídeos. Davies (1982) e Bitencourt (1991), comentam que o fluxo metabólico que constitui o “turnover” de nitrogênio em sementes, se deve basicamente a quebra de proteínas de reserva liberando aminoácidos, que em seguida podem ser transportados (sofrendo ou não inter-conversões) ou formar novas enzimas e proteínas.

No que diz respeito as reservas protéicas da semente, após a sua hidratação, é notada uma fase característica, composta por um declínio no conteúdo de reservas nitrogenadas e um aumento destas no embrião em desenvolvimento, podendo em alguns casos estas reservas serem maiores no embrião que no próprio tecido de reserva (Borjes e Rena, 1993). Segundo Sakamoto, Takeba e Tanaka (1990), durante a dormência de sementes de alface algumas proteínas armazenadas próximas ao eixo embrionário são degradadas liberando  $\text{NH}_4^+$ , que via GS produz glutamina. Alternativamente, segundo Pearson e Ji (1994) e Avila et al. (1993), o amônio proveniente da fotorrespiração é assimilado via GS/GOGAT no cloroplastídeo, podendo chegar em alguns casos a ser dez vezes superior a assimilação do amônio originada pela redução do nitrato. Já Kamachi et al. (1991), apresentam resultados em folhas senescentes de arroz, onde a quebra da rubisco e de outras proteínas liberam amônio, e devido a isso o nível de  $\text{GS}_1$  se mostra constante e enquanto o de  $\text{GS}_2$ , e Fd-GOGAT diminuem, sugerindo desta forma que a  $\text{GS}_1$  é a enzima chave para a remobilização de aminoácidos para outras partes da planta.

De acordo com Hayakawa et al. (1994), o conteúdo de proteína das sementes decresce rapidamente durante o desenvolvimento dos órgãos, devido a quebra das proteínas de reservas, sendo também observado um aumento da atividade das enzimas Glutamina Sintetase (GS), e Glutamato sintase dependente de NADH (NADH-GOGAT), sendo estas as responsáveis pela produção dos aminoácidos transportados, que são predominante glutamina e glutamato.

De maneira geral, observa-se que a atividade da GS varia em função da forma de nitrogênio fornecido. Por exemplo, Mäck (1995), estudando a indução e atividade da GS na presença de nitrato e amônio em cevada observou alta atividade específica desta enzima na presença de amônio para as folhas, e no sistema radicular a maior atividade da GS ocorreu no tratamento que não recebeu nitrogênio.

Em folhas de seringueira Delú-filho (1994), observou aumentos significativos na atividade da GS a medida em que se aumentou o fornecimento de nitrato no meio de cultivo. Contudo não foram observadas diferenças na atividade radicular da GS em detrimento do aumento de nitrato no meio de cultivo. Já Lemos (1996), sugere que a GS nas raízes de plantas de seringueira é dependente do amônio produzido via RN. Nas folhas foi observado um aumento progressivo da atividade da GS à medida que aumentou-se a concentração de amônio no meio de cultivo. Ainda segundo esta autora, nas raízes a GOGAT aumentou sua atividade a medida em que se aumentou a concentração de amônio no meio de cultivo; para as folhas foi observado um comportamento similar ao da GS.

Em raízes de plantas de milho expostas ao nitrato observa-se um acúmulo de GS<sub>2</sub> e Fd-GOGAT nos plastídeos, porém, na presença do amônio não foram observadas modificações no comportamento destas enzimas sugerindo que o nitrato atua de forma independente na expressão da GS<sub>2</sub> e Fd-GOGAT (Redinbaugh e Campbell, 1993). Da mesma forma, a assimilação do nitrato pela RN ocorre predominantemente nas células do mesofilo, enquanto a GS e a Fd-GOGAT se concentram mais nas células da bainha, onde ocorre a assimilação do amônio fotorrespiratório. No entanto são notados aumentos dos níveis de GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub> pela adição do nitrato, fato não observado quando a fonte de nitrogênio fornecida foi a amoniaca. O nível de GS<sub>2</sub> e Fd-GOGAT também aumentou nas células da bainha, e os níveis de GS<sub>1</sub> aumentaram nas células do mesofilo quando estas foram expostas a luz (Beker et al., 1993; Sakakibara, et al. 1992a; Yamada e Oaks, 1988).

Yamaya et al. (1995), relatam sobre um aumento de atividade da NADH-GOGAT em raízes de arroz na presença de nitrato, sendo o mesmo fato observado quando as raízes foram supridas com amônio, também notando-se um aumento do nível de GS<sub>1</sub> e GS<sub>2</sub> nas raízes e folhas.

Em plantas de batata a maior fonte de reservas nitrogenadas é o tubérculo, no entanto a GS não é encontrada nas folhas para a reassimilação dos aminoácidos. Após vários estudos Miao et al. (1990), localizaram a GS nas células companheiras do floema, onde é realizada a remobilização do nitrogênio para a exportação. Pereira et al. (1996b), fornecem um importante suporte para esta hipótese, devido a identificação de grande quantidade de GS no tecido vascular e nas regiões meristemáticas, explicando desta forma a remobilização de aminoácidos para a parte aérea da planta. Miao et al. (1991), sugere que a GS serve como indicador de fonte e dreno para as plantas devido a sua localização estratégica nas sementes e raízes (fontes) e nos tecidos meristemáticos (drenos).

Uma via alternativa para a assimilação do amônio é a rota GDH. Segundo Lewis, James e Hewitt (1982), geralmente ocorre um aumento na resposta da GS e da GDH em raízes e folhas tratadas com amônio. No entanto, em plantas de cevada a redução do amônio ocorre em sua maioria nas folhas, onde é encontrada uma pequena atividade da RN. Nas folhas a atividade da GS e da GDH aumentam juntamente com o fornecimento de amônio, e nas raízes são notados aumentos significativos da RN a medida que a concentração do nitrato aumenta e da GDH a medida que a quantidade de amônio aumenta no meio de cultivo. Já plantas supridas com concentrações adequadas de nitrogênio e sacarose, processam normalmente a assimilação pela via GS/GOGAT. Entretanto com a diminuição do fornecimento de sacarose é notado um aumento da GDH, (Robinson, Stewart e Phillips 1992; Sakulka e Lisa 1980), sugerindo um aumento na atividade da GDH em tecidos senescentes, devido a baixa fotossíntese. Deste modo a alta atividade da GS nestes tecidos é decorrente da assimilação do glutamato formado via GDH (Robinson, Stewart e Phillips 1992). Robinson et al. (1991), sugerem ainda que a GDH realiza a oxidação do glutamato na mitocôndria em condições de baixa disponibilidade de carbono, realizando desta forma uma importante regulação do metabolismo de nitrogênio. Pahlich (1996), propõe um equilíbrio de reação entre a GDH-MDH (malato desidrogenase)-GOT (glutamato-oxaloacetato transaminase), envolvendo a assimilação do amônio na mitocôndria.

Em condições de estresse atmosférico como a exposição a  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{S}$ , nota-se uma maior sensibilidade da via GS/GOGAT, não sendo encontradas grandes diferenças na atividade da GDH, servindo esta como uma enzima indicadora de estresse (Schlee, Thöringer e Tinemann, 1994). Também foram observadas duas isoformas de GDH com  $K_m$ 's diferentes para o  $\text{NH}_4^+$  onde plantas de pinus cultivadas em regiões industriais apresentam menores  $K_m$ 's e nas regiões não poluídas, maiores  $K_m$ 's. Segundo Robinson et al. (1991) e Oaks (1994), a GDH é encontrada em tecidos onde a concentração do amônio é muito alta, relacionando a atividade desta enzima a condições de estresse.

No estudo da assimilação de nitrogênio por plantas associadas a ectomicorrizas observa-se diferentes respostas de acordo com a quantidade de amônio absorvida, em baixas concentrações este é assimilado via GS/GOGAT, e em concentrações maiores é assimilado pela via GDH (Turnbull, Goodall e Stewart 1996; Pereira et al., 1996a).

Segundo Delú-filho (1994), a atividade da GDH em lâminas foliares possui respostas semelhantes às respostas da GS e da FD-GOGAT, notando-se ainda que o nitrato exerceu um efeito positivo sobre a atividade da enzima na parte aérea, não provocando porém qualquer estímulo na atividade da enzima para o sistema radicular.

Estudando o controle da assimilação do nitrogênio em sementes de milho, Osuji e Madu (1995); Stewart et al. (1995); Oaks (1995) e Fox et al. (1995), encontraram três isoformas de GDH. Ainda segundo Osuji e Madu (1995), estas isoformas apresentaram diferentes comportamentos ao suprimento de amônio no meio de cultivo. Também foi observado que a GDH e a GS são inibidas por  $\alpha$ -cetogluturato e glutamina enquanto a GOGAT não sofre inibição, promovendo desta forma a produção de outros aminoácidos mesmo que em baixa quantidade.

Segundo Turano et al. (1996), resultados de vários experimentos em soja sugerem duas formas distintas de GDH, uma plastídica e outra mitocondrial, possuindo diferentes afinidades a co-fatores e substratos. A expressão desta enzimas segundo este autor é regulada por uma pequena família de multigenes que codificam diferentes isoformas em genes distintos. Em extratos de sementes de soja em processo germinativo foram caracterizados duas isoformas da GDH (GDH<sub>1</sub> e GDH<sub>2</sub>) nos cotilédones e outra no hipocótilo e raízes (GDH<sub>3</sub>). Turano et al. (1997) isolaram diferentes isoformas de GDH em folhas de *Arabidopsis thaliana*, localizadas na mitocôndria e nos cloroplastídeos. Entretanto, Hutson e Shimidt (1995), estudando a transcrição dos genes nucleares que codificam a GDH, sugerem um controle “pós-codificação” entre a expressão da GDH, RN e Rubisco dependendo do meio de cultivo (quantidades de nitrato e amônio). Sakakibara, Fuji e Sugiyama. (1995), sugerem a existência de genes que codificam as subunidades da GDH separadamente.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1) *Obtenção das plantas e meio de cultivo*

Este estudo foi conduzido em germinadores, casa de vegetação e sala de crescimento durante um período de 86 dias, com temperaturas médias de 27,7 °C em casa de vegetação, e 30 °C com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 117,44  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinada no dossel das plantas em sala de crescimento. As plantas permaneceram em germinadores por 17 dias, e na casa de vegetação durante 35 dias. Com o abaixamento da temperatura, o experimento foi transferido para sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados durante 34 dias.

As plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) utilizadas foram obtidas a partir de sementes ilegítimas provenientes de um plantio policlonal com idade aproximada de 40 anos, da Fazenda Água Milagrosa, Tabapoã - São Paulo. As sementes foram coletadas em fevereiro de 1996 e colocadas inicialmente em germinadores contendo areia previamente lavada com água de torneira e depois com água destilada, onde não foi detectada a presença de nitrogênio pelo método de Kjeldah. Os germinadores foram protegidos contra a radiação solar direta por meio de sombrite 50% mantidos a 30 cm de altura.

A semeadura foi realizada nos germinadores que receberam irrigações com os tratamentos: Água (onde não se adicionou nutrientes) e em soluções nutritivas completas contendo as seguintes relações de nitrato amônio: 0/0, 8/0, 0/8, 4/4, mM, sendo fornecidos 8 mM de nitrogênio às plantas baseados em resultados anteriores obtidos por Lemos (1996). Cada germinador foi irrigado com uma solução nutritiva diferente uma vez por semana, sendo realizada três irrigações diárias com água de torneira nos dias posteriores.

Ao atingirem o estágio de “pata de aranha” as plântulas foram selecionadas de acordo com a uniformidade das raízes, e em conjuntos de cinco plantas foram transferidas para vasos plásticos contendo 3,5 litros de areia lavada como suporte de cultivo. Cada vaso recebeu 1500 mL de solução nutritiva com pH 4,0 contendo os diferentes tratamentos (tabela 1). Deste volume colocado em cada vaso, 1000 mL foram retidos pela areia e o excedente de 500 mL ficou depositado em um prato colocado sob cada vaso, completando-se diariamente o volume quando necessário com água destilada.

Para o procedimento de troca semanal da solução nutritiva, os 500 mL dos pratos foram colocados nos vasos coletando-se o excedente, o qual foi retornado três vezes aos vasos realizando em seguida o descarte da solução. Posteriormente a isto foram colocados nos vasos 1000 mL da nova solução, coletando-se o excedente nos pratos. Logo depois voltou-se o excedente novamente aos vasos por três vezes, descartando-se a solução. O volume dos vasos foi completado com os 500 mL da solução nutritiva restante.

Tabela 1 - Composição das soluções nutritivas (Lemos, 1996)

Sal	Solução Estoque (M)	Relação de Nitrato e Amônio (mM)			
		0/0	8/0	4/4	0/8
		Volume da Solução Est. (ml l <sup>-1</sup> )			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,5	-	6,0	-	-
K NO <sub>3</sub>	0,5	-	4,0	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	-	-	-	6,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,5	-	-	8,0	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	-	-	-	2,0
CaSO <sub>4</sub>	0,01	150	-	100	150
KCl	0,5	2,0	-	-	4,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5	2,5	5,0	2,5	2,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	2,0	2,0	2,0	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	2,0	1,0	3,0	1,0
CaCl <sub>2</sub>	0,5	-	-	1,0	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	-	-	-	1,0
Solução de Micronutrientes (mM)					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25	1,0	1,0	1,0	1,0
CuSO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA	20	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
MnSO <sub>4</sub>	2	1,0	1,0	1,0	1,0
ZnSO <sub>4</sub>	2	1,0	1,0	1,0	1,0
Elemento	Concentração Total (mg L <sup>-1</sup> )				
N	112	112	112	112	112
P	31	31	31	31	31
K	117	117	117	117	117
Ca	60	120	60	60	60
Mg	30	60	30	24	24
S	120	96	120	198	198

### ***3.2) Características avaliadas***

#### ***3.2.1) Determinação de massa seca e nitrogênio total***

Em cada estágio de desenvolvimento avaliado foram coletadas cinco plantas por repetição, inclusive para semente quiescente. Nos estádios de desenvolvimento de emissão de radícula, pata de aranha, e palito, a coleta ocorreu nos germinadores respectivamente aos 7, 14, 16, dias após a semeadura. As sementes foram separadas em suas diferentes partes (endosperma, cotilédones e embrião), e as plântulas, no estágio de emissão de radícula foram separadas em endosperma e radícula, no estágio de pata de aranha em endosperma e raiz, no estágio de palito em endosperma, raiz e caule (juntos), e no o estágio de segundo lançamento foliar em raiz, caule, peciolo e limbo, onde as diferentes partes das plantas foram pesadas separadamente. A determinação do nitrogênio foi realizada pelo método de semi-kjedhl nas diferentes partes da planta, após previa lavagem, secagem em estufa de ventilação forçada a 70<sup>o</sup> C até atingirem peso contante e trituradas em moinho tipo Wiley com peneira de 200 mesh.

#### ***3.2.2) Obtenção dos extratos enzimáticos***

Os extratos enzimáticos foram obtidos de acordo com os procedimentos descritos por Delú-filho (1994) e Lemos (1996). O material vegetal utilizado foi previamente lavado com água destilada sendo as nervuras centrais retiradas do limbo. A coleta do material se procedeu após o mínimo de quatro horas de exposição das plantas a luz. O material foi picado, pesado e acondicionado em papel alumínio, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido, e a seguir transferido para freezer a - 80 °C onde ficou armazenado até a execução das análises enzimáticas.

O extrato enzimático da raiz, caule ou limbo foi realizado a 4 °C e obtido da maceração em graal de 1 grama do tecido vegetal em 5 mL do meio de extração contendo tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,5); 10 % de polivinilpolipirrolidona (PVPP); 2 mM de ditioneitol (DTT); 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); 1 mM de ácido etilendiamino tetracético (EDTA) e 10 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).

Após a maceração do tecido, o material foi centrifugado a 18000 g durante 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante (extrato bruto) foi acondicionado em vidros de 5 mL mantidos em gelo para a determinação da atividade da GS e da FD-GOGAT, sendo congelados a seguir. Estes extratos congelados (estádios de pata de aranha e palito, durante a primeira quinzena de Dezembro/96, e mantidos em freezer a - 80 °C) foram transportados em nitrogênio líquido, junto com os demais materiais vegetais para o CNPMS/EMBRAPA, em Sete Lagoas-MG, (primeira quinzena de Junho/97) onde realizaram-se as análises da NADH-GOGAT, da GDH, proteína total, da confecção dos géis de acrilamida e de imunização em Western Blot.

### **3.2.3) Determinação de proteínas solúveis**

A determinação da proteína solúvel total foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina serina bovina como padrão nos mesmos extratos brutos utilizados para os ensaios enzimáticos. Foi adicionado 10 µL de extrato crú em tubos de ensaio e em seguida adicionou-se 740 µL de água destilada e 250 µL de Reagente de Bradford (comassie - G-250). Depois de acrescentar o comassie as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos, e a absorvância determinada a 595 nm.

### **3.2.4) Ensaios enzimáticos da GS, NADH-GOGAT, Fd-GOGAT e GDH.**

Para o ensaio da GS utilizou-se 100 µL do extrato crú em 700 µL do meio de reação composto por: 400 µL Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5); 100 µL de 2-mercaptoetanol 0,1 M; 50 µL de Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,4 M, 150 µL de NH<sub>2</sub>OHCl 0,1 M; 100 µL de ATP 0,1 M e 100 µL de glutamato 0,5 M; totalizando um volume final de 1000 µL. Quando foi necessário reduzir a alíquota o volume foi completado com tampão. A mistura de reação foi incubada durante 30 minutos a 30 °C, e paralisada pela adição de 1,0 mL de uma solução contendo: FeCl<sub>3</sub> 0,37 M; Hcl 0,67 M e 0,2 M de ácido tricloroacético (TCA). Logo após realizou-se centrifugação a 16000 g por 5 minutos e o quelato Fe-L-glutamyl-γ-hidroxamato (GHA) produzido foi quantificado colorimetricamente em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática foi calculada como nmol de GHA. mg prot<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>.

Para o ensaio da NADH-GOGAT utilizou-se 50 a 100  $\mu\text{L}$  do extrato crú em 800 a 850  $\mu\text{L}$  e um meio de reação contendo: tampão fosfato de potássio 0,5M, (pH 7,5), 100  $\mu\text{L}$  de glutamina 0,1 M, 100  $\mu\text{L}$  2-oxoglutarato 0,1 M, 100  $\mu\text{L}$  KCl 0,1 M, totalizando um volume final de 900  $\mu\text{L}$ . As amostras foram pré-incubadas por três minutos a 30 °C e em seguida foram transferidas para uma cubeta onde foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de NADH 2 mM monitorando-se a oxidação do poder redutor da reação de 1 em 1 minuto durante 10 minutos em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de GLU  $\text{mg}\cdot\text{prot}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A atividade da Fd-GOGAT foi determinada adicionando-se 300  $\mu\text{L}$  do extrato crú em 900  $\mu\text{L}$  de um meio de reação composto por: 400  $\mu\text{L}$  tampão fosfato de potássio 0,5 M (pH 7,5), 150  $\mu\text{L}$  glutamina 0,1 M, 150  $\mu\text{L}$  2-oxoglutarato 0,1 M e 200  $\mu\text{L}$  metil viologênio 2mg  $\text{mL}^{-1}$ . A mistura foi incubada por dois minutos a 30 °C e a reação foi iniciada com a adição de 300  $\mu\text{L}$  da mistura de 16 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  + 16 mg de  $\text{NaHCO}_3$  por  $\text{mL}^{-1}$  de água destilada totalizando um volume de 1500  $\mu\text{L}$ . A reação foi paralisada por imersão dos tubos em água a 90 °C durante dois minutos. Após isto os tubos foram imediatamente agitados em vortex até o desaparecimento da cor azul e posteriormente resfriado em gelo. Em seguida retirou-se uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra que foi aplicada em coluna de Dowex 1 X 8 na forma acética. Após lavagem da coluna com 15 mL de água destilada, foram utilizados 7 mL de ácido acético 0,3 M para eluir o glutamato que estava retido na coluna; este volume foi coletado em tubos de ensaio, e posteriormente foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para reagir com 2,0 mL de uma solução constituída por: 0,4 g d ninhidrina, 1 g de  $\text{CdCl}_2$ , 80 ml de etanol, 10 mL de ácido acético e 20 mL de água destilada, homogeneizados em vortex e incubado por 10 minutos a 80 °C com agitação, que posteriormente foram resfriados e a quantificação colorimétrica do glutamato formado foi determinada em espectrofotômetro a 506 nm. A atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de GLU  $\text{mg}\cdot\text{prot}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

No ensaio da GDH foi utilizado: 25 a 50  $\mu\text{L}$  de extrato crú em 900  $\mu\text{L}$  de um meio de reação composto por: tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8 (o volume destes variou de 550 a 575 $\mu\text{L}$ ), 100  $\mu\text{L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,0 M, 100  $\mu\text{L}$  2-oxoglutarato 0,1 M, pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  0,04 M, totalizando um volume final de 1000  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas por três minutos a 30 °C e em seguida foram transferidas para uma cubeta onde foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de NADH 1 mM, monitorando-se a oxidação do poder redutor da reação de 1 em 1 minuto durante 10 minutos em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol de GLU. mg.prot<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>.

### 3.3) Análises eletroforéticas

#### 3.3.1) Confeção dos géis

Os géis foram confeccionados em cuba Bio-Rad. O extrato usado foi o de limbo foliar no estágio de segundo lançamento foliar, para todos os tratamentos, portanto não se extraiu com SDS. O gel usado foi em gradiente com concentração de 7,5 a 18 % consistindo dos reagentes mostrados na tabela 2. Também foi usado marcador de alto peso molecular.

Tabela 2- Composição dos géis e sobre gel

GEL ACRILAMIDA						SOBRE GEL	
Reagente	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	Reagente	6%
H <sub>2</sub> O	10ml	8,3ml	6,6ml	5,0ml	3,3ml	H <sub>2</sub> O	3,9ml
Acrilamida	5,0ml	6,6ml	8,3ml	10ml	11,5ml	Acrilamida	1,4ml
Tris 1,5M	5,0ml	5,0ml	5,0ml	5,0ml	5,0ml	Tris 0,5M	1,7ml
P.Amônio 10%	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	P.Amônio 10%	20 $\mu\text{l}$
TEMED	16 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$	TEMED	15 $\mu\text{l}$

Fonte: Núcleo de biologia aplicada/Laboratório de Bioquímica de Plantas (CNPMS/EMBRAPA)

A solução foi colocada em um separador ligado a uma bomba peristáltica onde eram misturados as soluções de 7,5 e 18 % e despejadas vagarosamente entre as placas de vidro até alcançar 1 cm da base do pente formador das cavidades do gel. A solução foi coberta com água destilada e deixada polimerizando durante 2 a 3 horas. Após este período a água foi retirada e o excesso enxugado. O pente foi inserido e a solução do sobre gel foi adicionada com o auxílio de uma pipeta, tomando-se o cuidado de não aparecerem bolhas. Esta solução foi deixada polimerizando durante uma hora. O gel possuiu as dimensões de 115 X 160 X 1 mm respectivamente.

### ***3.3.2) Separação eletroforética, coloração e descoloração***

Na cuba eletroforética foi usado tampão tris-glicina (50 mM de tris-base e 192 mM de glicina). As separações eletroforéticas foram realizadas em temperatura ambiente, voltagem constante, 50 Volts, durante 10 minutos, e 30 Volts durante uma noite. Quando as amostras alcançavam a base do gel a corrida foi paralizada realizando-se a coloração do gel. A coloração dos géis foi realizada por um período mínimo de 5 horas em agitação com solução "STAIN" que continha 50 % de metanol, 10 % de ácido acético, 0,15 % (p/v) comassie blue brilhant R-250; e descolorados com a solução "DESTAIN" que possui 10 % ácido acético, 5 % de metanol e água, até a remoção do corante retido nos poros da matriz de acrilamida.

### **3.4) Western Blot**

Para a realização do western blot foi necessário a confecção de um mini gel com malha de acrilamida em 12,5 % e o sobre gel com 6 % constituídos por 4,4 mL de água destilada, 4,2 mL de acrilamida 30%, Lower gel 3,0 M 1,25 mL, SDS 20 % 50  $\mu$ L, Persulfato de amônio 10 % 50  $\mu$ L, Temed 10  $\mu$ L, em um volume final de 10 mL que são suficientes para confeccionar dois mini géis. A corrida aconteceu em 1,5 horas a 100 V. Após a corrida do mini gel, este foi colocado em uma solução de transferência (tris-glicina-metanol) em placa de petri com agitação durante 10 minutos, afim de promover a estabilização. Em seguida foi cortada uma membrana do tamanho do gel, juntamente com o papel de transferência fazendo-se então o “sanduíche” no trans-blot a 200 mA (10 V) durante uma hora. Após a transferência o mini gel foi colocado para corar e a membrana foi colocada em solução TTBS (5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7,5, Tween 20) durante cinco minutos em placa de petri com agitação, logo em seguida descartou-se o excesso colocando na placa solução de TTBS + Leite desnatado (3%), para ocorrer o bloqueio dos sítios inespecíficos, durante trinta minutos com agitação, também descartando-se o excesso após este período. Em seguida foi colocado uma mistura contendo 20  $\mu$ L do anticorpo contra Rubisco com 20 ml de TTBS + Leite, sendo agitado por uma noite. A membrana após o descarte do excesso da solução anticorpo e TTBS + Leite, foi lavada com TTBS quatro vezes por 15 minutos, logo após foi colocado a solução corante (peróxido de hidrogênio).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se pela figura 1 que a massa seca das sementes quiescentes sem o tegumento usadas neste trabalho, foi de cerca de 1,8 gramas/semente e, que aproximadamente 90% dessa massa estava acumulada no endosperma (cerca de 1,6 gramas) e os 10% remanescentes estavam nos cotilédones, visto que a massa seca do embrião foi praticamente desprezível.

Os resultados apresentados na figura 2 mostram que a ausência de todos os nutrientes, ausência de nitrogênio e a presença de  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  no meio de cultivo, nos estádios de emissão de radícula, pata de aranha e palito, não interferiram na produção de massa seca da radícula, das raízes e das plântulas, respectivamente. Observa-se também nessa figura, que a massa seca do endosperma decresceu de forma significativa, somente a partir do estágio de palito, em cerca de 35%, no máximo. A produção de massa seca da plântula, neste estágio de desenvolvimento, também não foi diferente entre os tratamentos, e, atingindo aproximadamente 0,3 gramas, o que representa, no máximo 17% das 1,8 gramas da massa seca inicial da semente sem o tegumento. Daí, a análise conjunta dos resultados apresentados nas figuras 1 e 2, permite sugerir que os tratamentos não influenciaram a remobilização dos constituintes da massa seca da semente para a plântula e também que até o estágio de palito, cerca de 83% da massa seca da semente ainda continuavam imobilizado. Como ocorreu uma queda de 35% na massa seca do endosperma, representando cerca de 0,6 gramas, e como a produção de massa seca da plântula foi de cerca de 0,3 gramas, pode-se inferir que, cerca de 50% da massa consumida do endosperma foi utilizada na produção dos constituintes celulares durante o crescimento da plântula e o restante foi perdido metabolicamente durante o evento.

Analisando ainda a figura 2, observa-se, que no estágio de segundo lançamento foliar, as diferenças mais marcantes entre os tratamentos ocorreram nas plantas cultivadas na presença de  $\text{NH}_4^+$ , onde houve uma tendência de menor produção de massa seca em todas as partes da planta. Estes resultados são contrários daqueles encontrados por Lemos, 1996, que obteve uma maior produção de massa seca em plantas cultivadas na presença de  $\text{NH}_4^+$ .

Com base nos resultados apresentados na figura 2 pode-se determinar que a produção de massa seca total da planta, no estágio de segundo lançamento foliar, no tratamento onde se forneceu somente  $\text{NH}_4^+$ , foi de 1,1 grama. Estes resultados e aqueles da figura 1 permitem inferir, que, desconsiderando todos os ganhos de massa decorrente da assimilação de carbono, no máximo cerca de 60% dos constituintes da massa seca da semente sem tegumento podem ter sido remobilizados para o crescimento da planta, sendo o restante perdidos metabolicamente ou permaneceram imobilizados na semente, após a sua queda da planta que ocorreu durante o estágio do segundo lançamento foliar.

Sabe-se que as plantas em seus estádios iniciais de desenvolvimento obtém os nutrientes para o crescimento diretamente das reservas da semente, e que no caso da seringueira, o endosperma representa a quase totalidade da massa seca da semente, seguido pelos cotilédones e pelo embrião (Figura 2). Quanto ao nitrogênio armazenado nas sementes, observa-se pela figura 3, que o endosperma, à semelhança da massa seca, contém cerca de 88% deste elemento e os cotilédones e embrião cerca de 10 e 2%, respectivamente, apesar do maior teor de nitrogênio se encontrar no embrião, seguido pelos cotilédones e endosperma que apresentaram teores similares.

Observa-se na figura 5 que as maiores diferenças nos teores de proteína durante o desenvolvimento das plantas ocorreram nas raízes. As plantas cultivadas em água, para o estágio de pata de aranha e em nitrato e amônio, para o estágio de segundo lançamento foliar, apresentaram, respectivamente, o maior e o menor teor de proteína no sistema radicular, sendo que os demais meios de cultivo não tiveram influência nestes estádios. Entretanto, no estágio de palito, as plantas não apresentaram diferença no teor de proteína entre os meios de cultivo.

Analisando ainda a figura 5, nota-se que, no estágio de segundo lançamento foliar, as plantas apresentaram menores teores de proteína no caule e no limbo, respectivamente nos meios de cultivo sem nitrogênio e onde se forneceu somente  $\text{NH}_4^+$ . Entretanto, observa-se também, que os teores dessa macromolécula nessas mesmas partes e estágio de desenvolvimento da planta não foram influenciados pelos demais meios de cultivo; e que no estágio de palito, o teor de proteína na plântula, à semelhança do ocorrido nas raízes, também não foi influenciado pelos diferentes meios de cultivo. Estes resultados corroboram com as observações anteriores de que o fornecimento exógeno de nitrato e/ou amônio nas concentrações estudadas, não influenciou de forma significativa o crescimento da planta e a assimilação de nitrogênio em proteínas.

Quanto as enzimas de assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , pode-se observar pela figura 6, que, de maneira geral, não houve diferenças significativas na atividade da GS entre os diferentes meios de cultivo, nos diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento estudados. Estes resultados mostram que a atividade desta enzima não foi influenciada pelo fornecimento exógeno de nitrogênio, indicando realmente que as reservas da semente são suficientes para atender a demanda de nitrogênio durante o desenvolvimento das plantas. Os resultados apresentados pela atividade da GS nas raízes, ainda sugere que o transporte de nitrogênio pode ocorrer também na forma de glutamina. Este aminoácido, em diversas espécies, apresenta-se como uma das principais formas de nitrogênio orgânico encontrado no xilema (Lea, Robinson e Stewart. 1990) e transportado para a parte aérea.

O suprimento endógeno de  $\text{NH}_4^+$  poderia ter origem na assimilação do  $\text{NO}_3^-$ , no próprio  $\text{NH}_4^+$  armazenado na semente e mobilizado para as diferentes partes da planta, ou ainda pela desaminação de aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Em relação a redução do  $\text{NO}_3^-$ , Delú-filho (1994) mostrou que a redutase do nitrato em seringueira é ativa apenas no sistema radicular. Deste modo é possível que a ação desta enzima, conjuntamente, com a redutase do nitrito aumente a disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes. Observou-se também neste trabalho, a exemplo do que foi verificado por Delú-filho (1994) e por Lemos (1996), uma maior capacidade de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  via GS nas lâminas foliares, quando comparada com o caule e a raiz. Porém, ao contrário de Delú-filho (1994), que não detectou atividade da GS radicular em plantas de seringueira com 12 meses de idade, neste experimento foram observados níveis semelhantes de atividade para todos os estádios de desenvolvimento, apesar de não ter sido avaliada a atividade da redutase do nitrato neste trabalho. A maior assimilação de  $\text{NH}_4^+$  nos limbos foliares que nas demais partes da planta, apesar da ausência da redutase do nitrato neste órgão, sugere que o amônio radicular é transportado diretamente das raízes, seja resultante da redução do nitrato ou da absorção radicular. Não deve ser ignorado, que no limbo foliar, a fonte adicional de  $\text{NH}_4^+$  pode ser originada também pela fotorrespiração ( Sakakibara, 1992b; Yamada e Oaks, 1988), ou pelo metabolismo da asparagina (Lea, Robinson e Stewart, 1990), o que poderia também explicar a expressiva atividade da enzima na folha.

Quanto aos efeitos dos diferentes meios de cultivo sobre a atividade NADH-GOGAT, observa-se, na figura 7, que o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  proporcionou uma maior atividade desta enzima nas raízes de seringueira, no estádio de segundo lançamento foliar. Nas plantas cultivadas na ausência de nitrogênio, no estádio de pata de aranha, observou-se uma menor atividade da enzima, enquanto nos demais tratamentos, independentemente do estádio de desenvolvimento da planta, não foram notadas alterações significativas em sua atividade. A maior atividade desta enzima nas raízes das plantas cultivadas na presença de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , pode ser consequência também da maior atividade da GS (Figura 6) no mesmo tratamento em relação aos demais. Entretanto, observando-se os valores de atividade de ambas as enzimas, nota-se que uma grande proporção da glutamina produzida via GS pode não

ter sido convertida a glutamato pela NADH-GOGAT, pois a atividade desta enzima foi cerca de um terço da GS, neste mesmo órgão. Estes resultados corroboram com a sugestão de que a glutamina não convertida poderia ser transportada para a parte aérea.

Em relação a FD-GOGAT, nota-se pela figura 8, que em todos os estádios de desenvolvimento estudados não foram detectadas alterações significativas na atividade da enzima em função dos diferentes meios de cultivo. A ausência de resposta desta enzima ao fornecimento exógeno de nitrogênio, mais uma vez sugere a suficiência do nível endógeno deste elemento para atender a demanda de crescimento da planta. A exemplo do que ocorreu com a NADH-GOGAT, a atividade da FD-GOGAT também foi cerca de 50% da atividade da GS, indicando com isso que a glutamina pode permanecer disponível para outros processos metabólicos, ou ainda para transporte.

Observa-se pela figura 9 que a atividade da GDH radicular seguiu o mesmo comportamento da GS radicular em todos os estádios estudados (Figura 7), isto é, apresentou uma maior atividade quando as plantas foram cultivadas na presença de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Comparando a atividade de ambas enzimas, verifica-se que o  $\text{NH}_4^+$  é assimilado preferencialmente pela via GS/GOGAT, na plântula de maneira similar ao que ocorre em plantas de seringueira em estádios mais avançados de desenvolvimento como foi encontrado também por Delú-filho (1994). A atividade da GDH em caules e limbos foliares de plantas no estágio de segundo lançamento foliar, variou entre os tratamentos onde o tratamento que forneceu exclusivamente nitrogênio na forma amoniacal proporcionou a menor atividade nos tecidos de caule e, também, a maior atividade na lâmina foliar (Figura 9). À semelhança do que foi encontrado para a GS, a maior atividade da GDH também foi encontrada no limbo, reforçando que o principal sítio de assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , para plantas de seringueira se encontra neste órgão. Tem sido sugerido que a atividade GDH em tecidos foliares esta relacionada com a assimilação do amônio fotorrespirado, o que precisa ser investigado em seringueira.

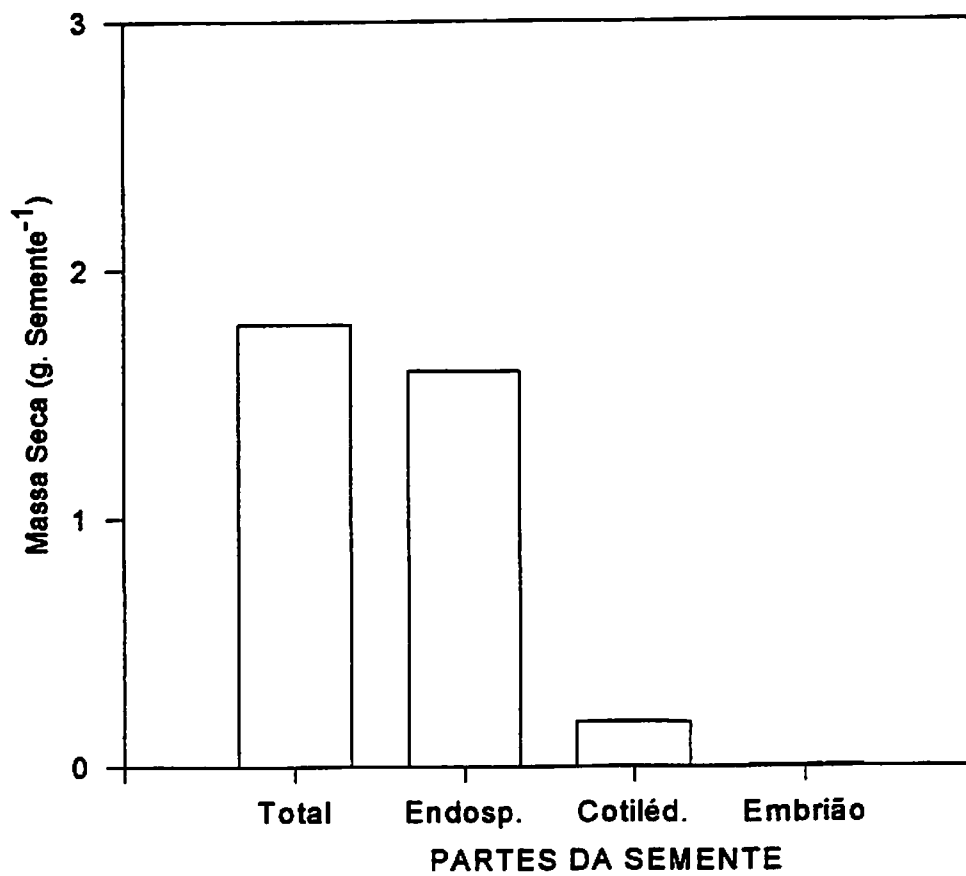


Figura 1 - Massa Seca nas diferentes partes da semente.

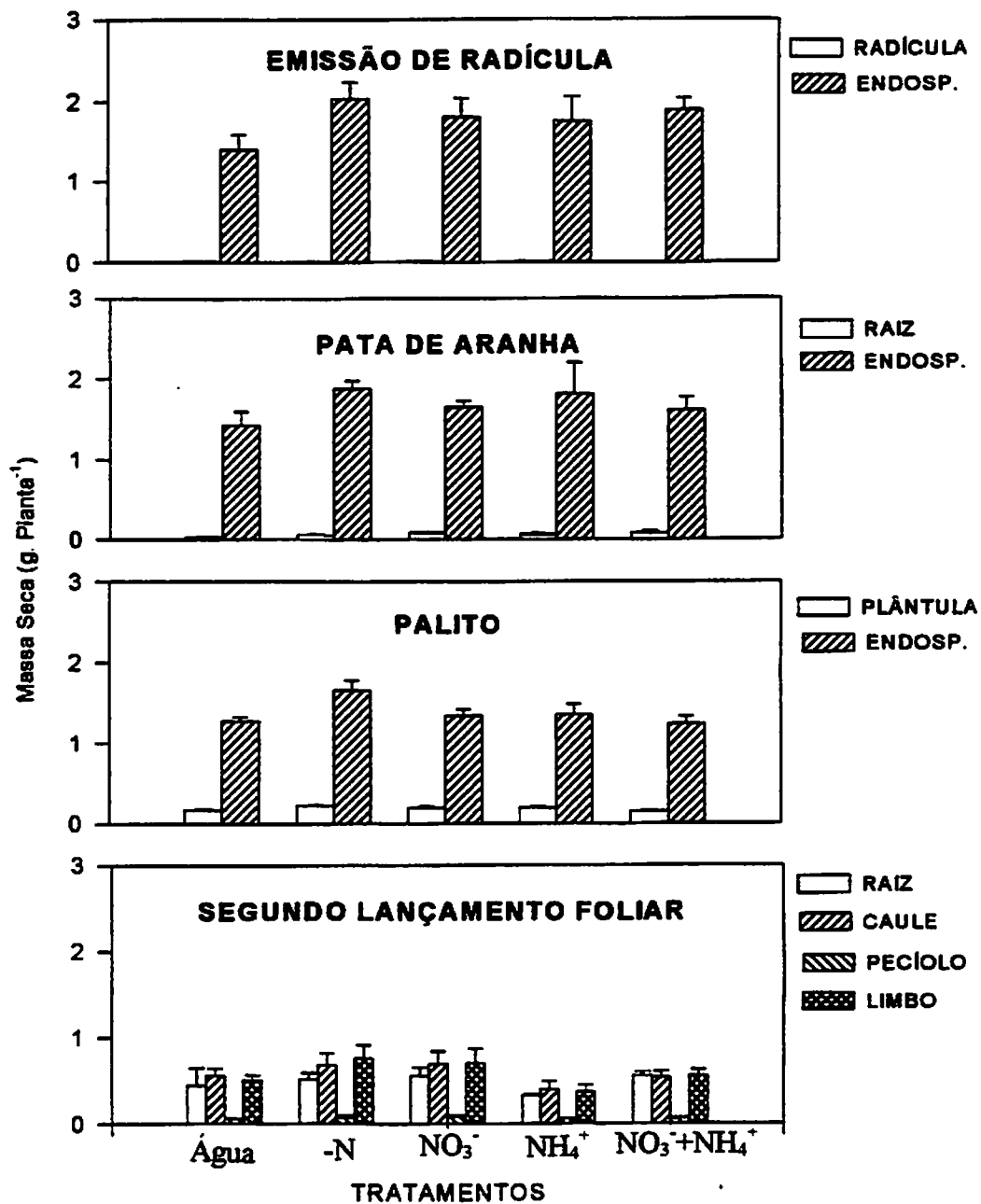


Figura 2 - Massa Seca nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

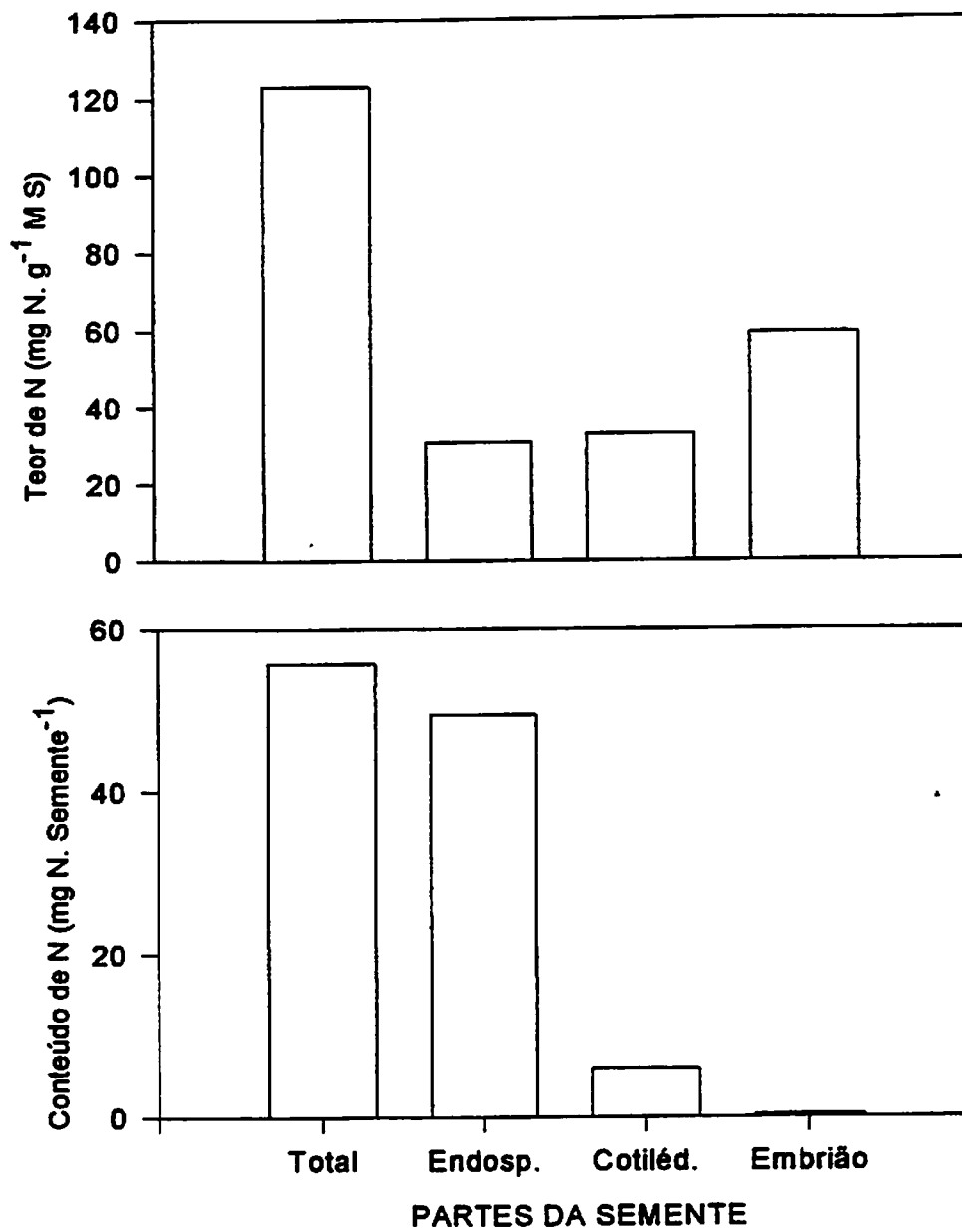


Figura 3 - Teor de nitrogênio e conteúdo de nitrogênio nas diferentes partes da semente e por semente.

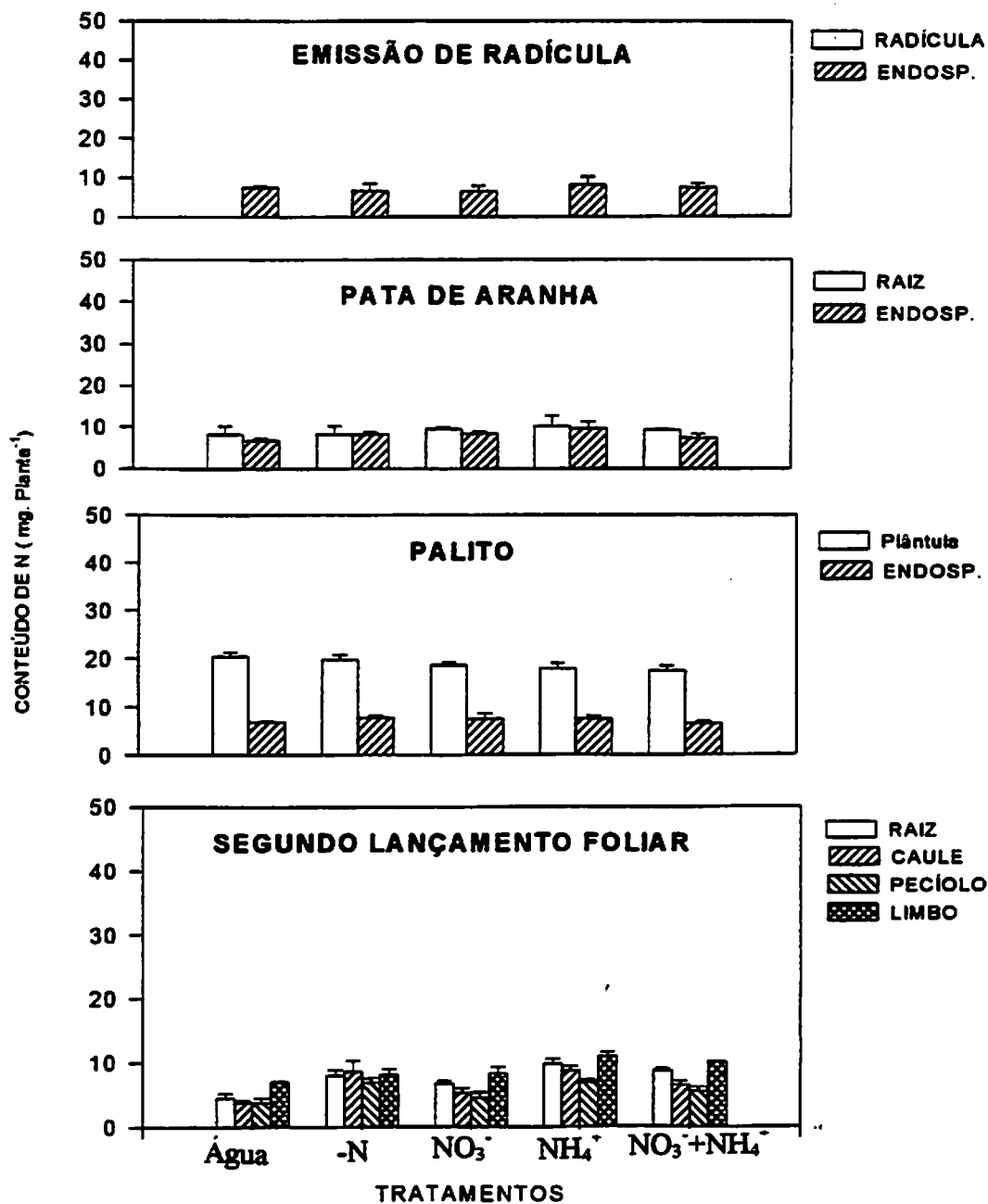


Figura 4 - Conteúdo de nitrogênio nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

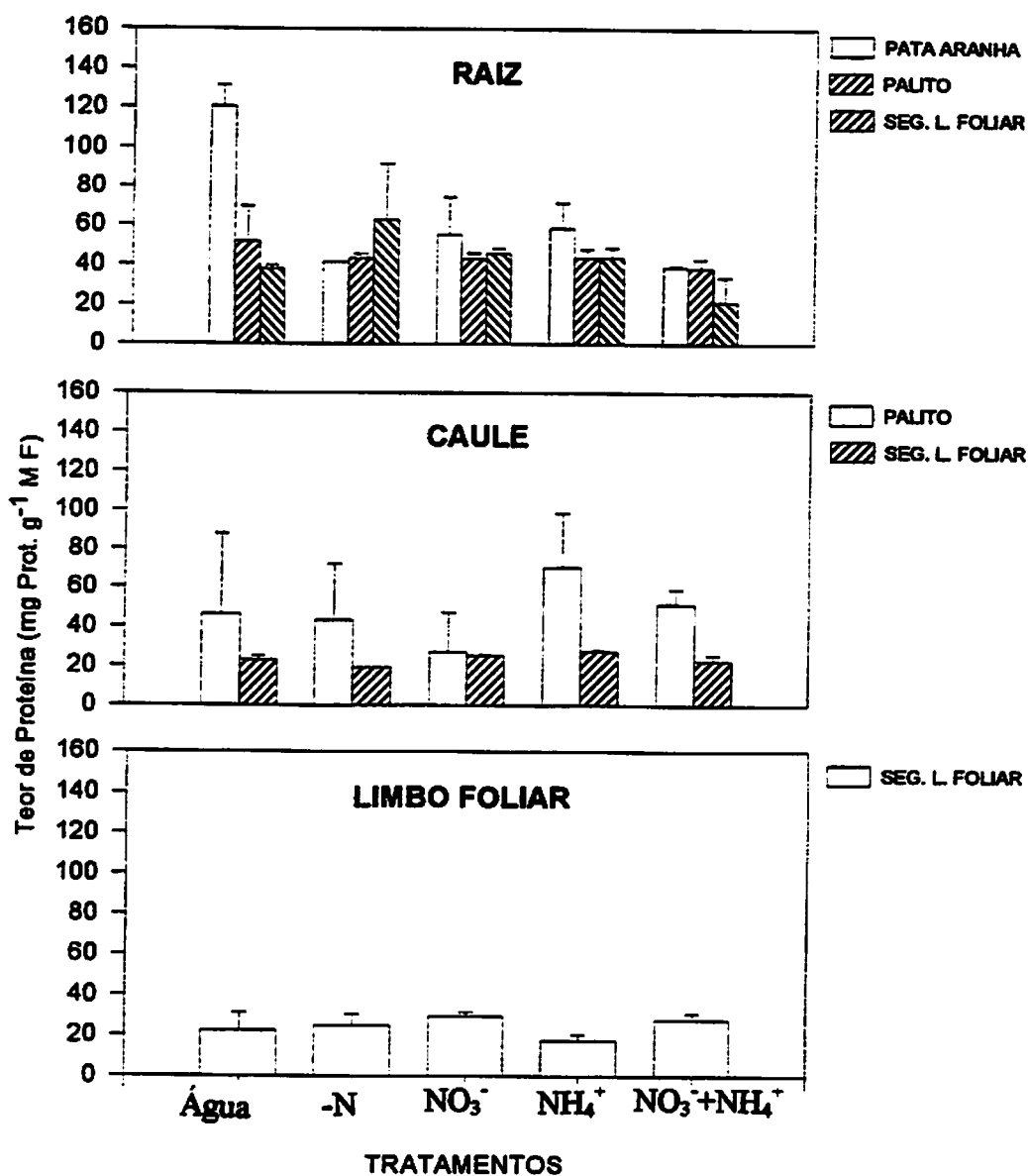


Figura 5 - Proteínas solúveis totais nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

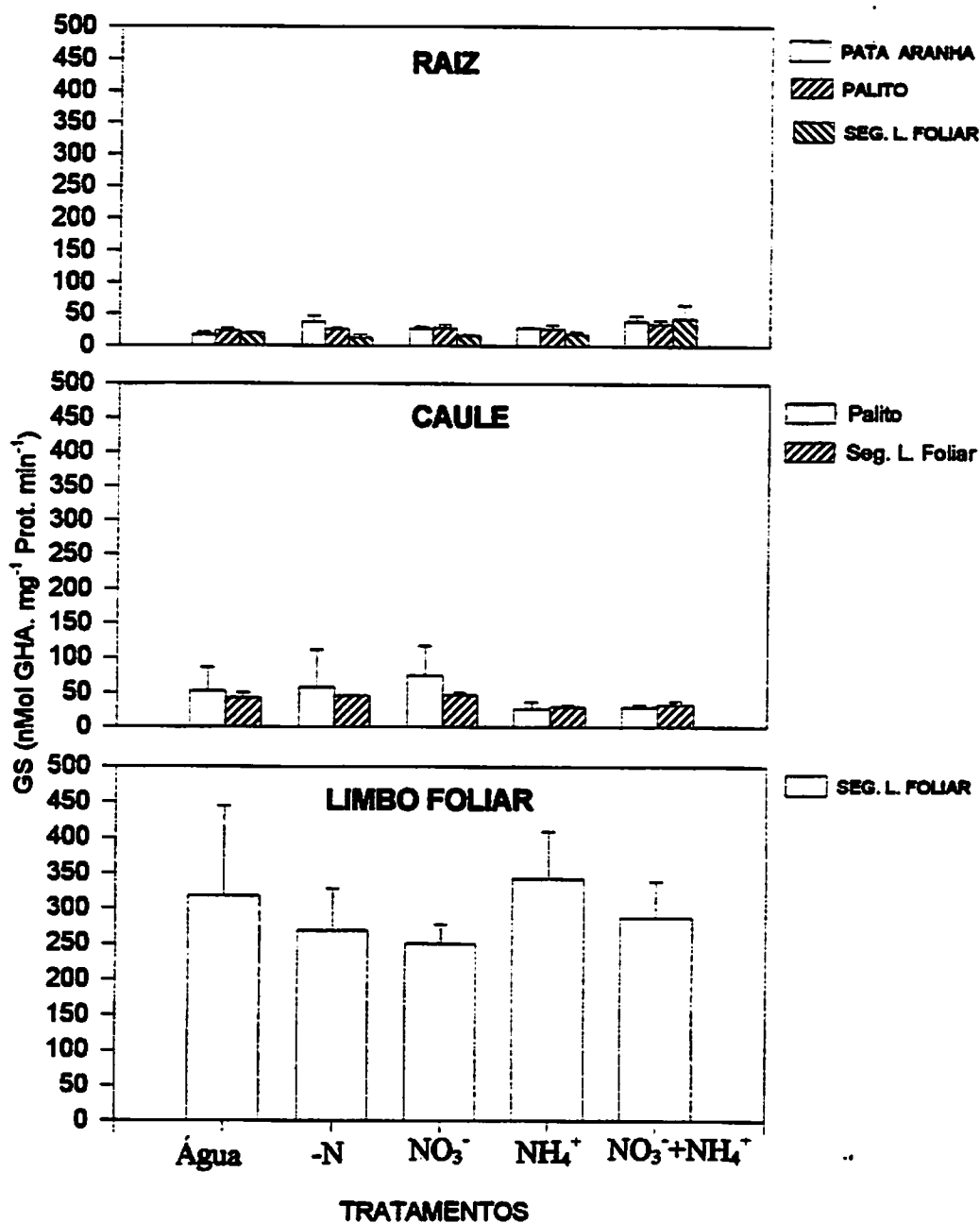


Figura 6 - Atividade específica da GS nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

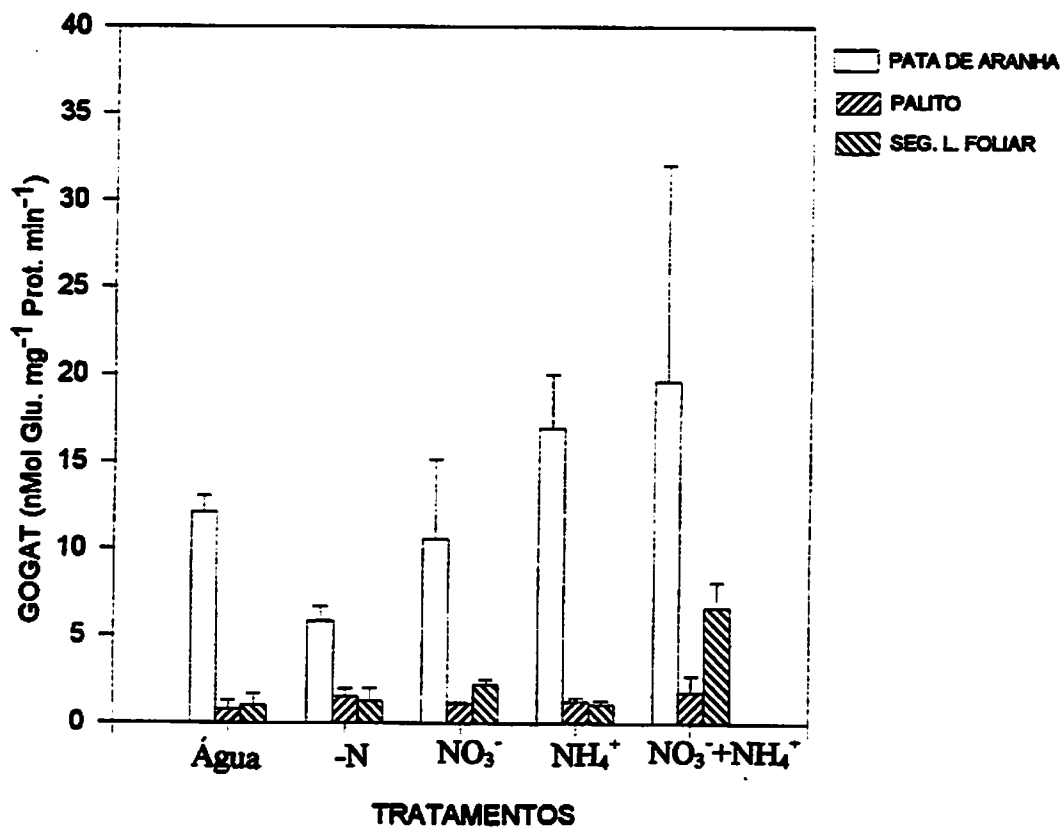


Figura 7 - Atividade específica da NADH-GOGAT para o sistema radicular nos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

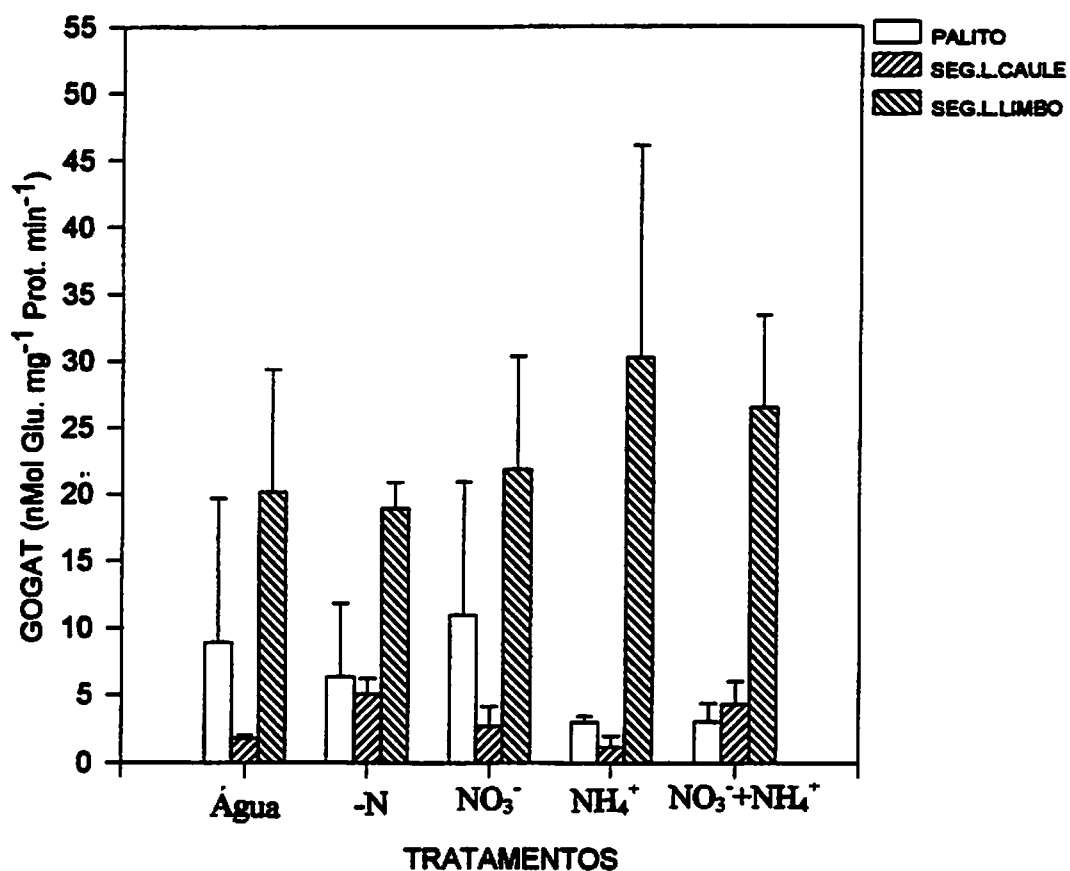


Figura 8 - Atividade específica da FD-GOGAT para parte aérea nos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e/ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

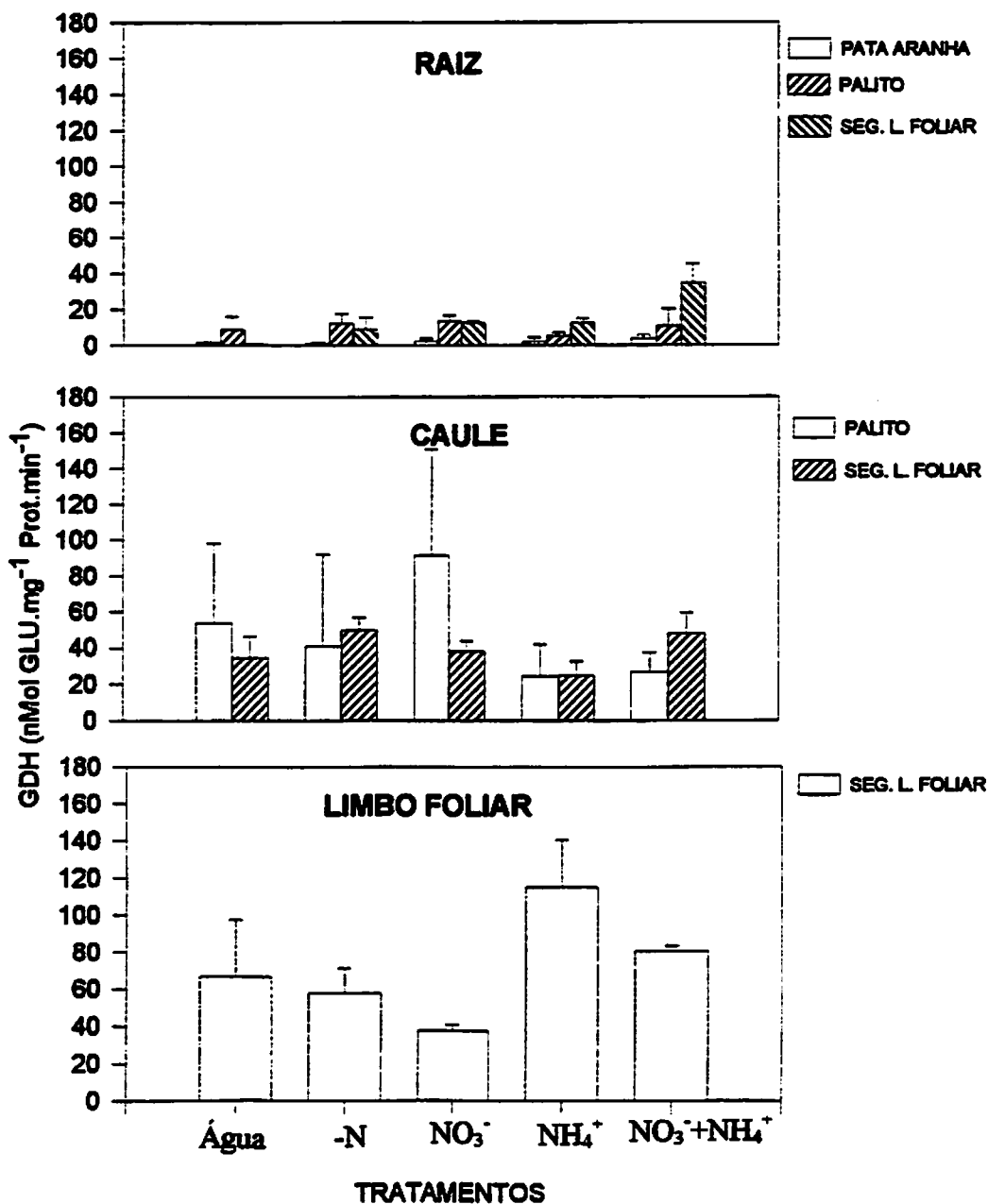


Figura 9 - Atividade específica da GDH nas diferentes partes e estádios de desenvolvimento de plantas de serigueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas na ausência de nutrientes, ausência de nitrogênio e na presença de  $\text{N-NO}_3^-$  e/ou  $\text{N-NH}_4^+$ .

#### 4.1) Análises eletroforéticas:

Com o objetivo de verificar possíveis polimorfismos à nível de proteína com a variação da fonte de nitrogênio, fez-se um gel em poliacrilamida em gradiente entre 7,5 a 18 %.

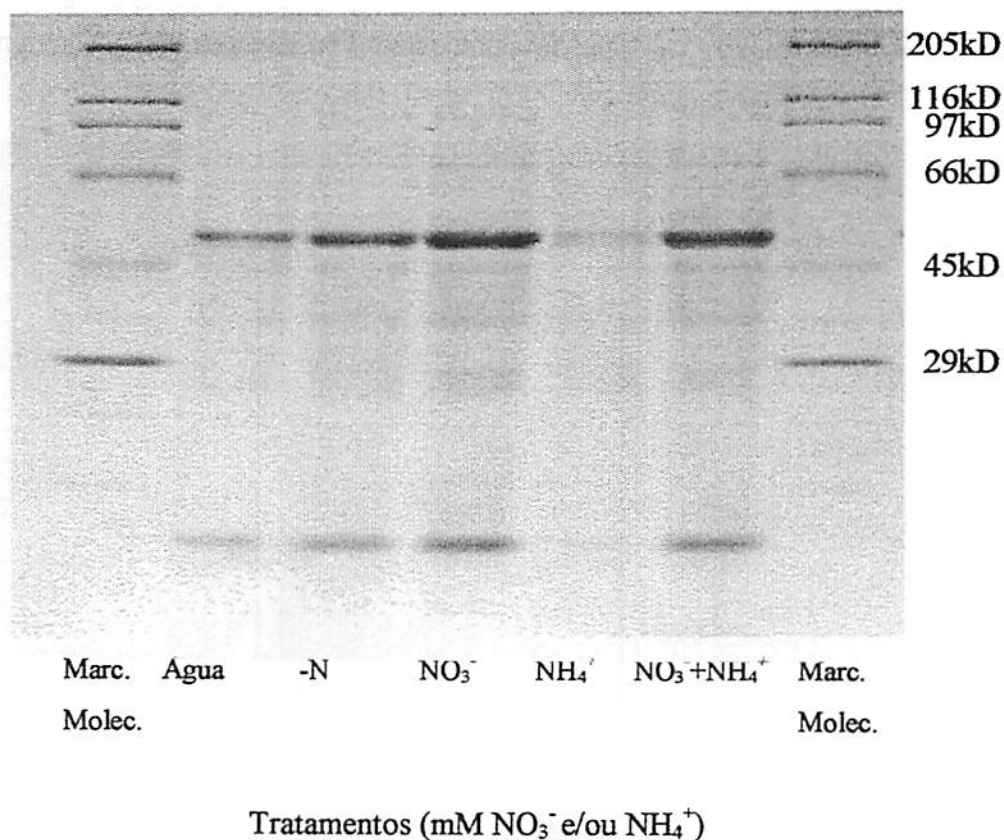


Figura 10 - Padrão eletroforético de proteínas obtidos em gel de poliacrilamida em gradiente de 7,5 a 18%

Não foram observadas diferenças nos padrões qualitativo de proteína entre os tratamentos. Indica-se desta maneira a ausência de expressão diferenciada de polipeptídeos no limbo. Tais resultados confirmam àqueles encontrados para atividade enzimática, onde não foram verificadas variações entre os tratamentos.

Afim de verificar a identidade de alguns polipeptídeos foi então realizada uma análise de "Western" (Figura 12) utilizando-se um anticorpo contra a enzima Ribulose 1,5 bis-fosfato Carboxilase Oxigenase (RUBISCO).

## **5 CONCLUSÕES**

O fornecimento de nitrogênio no meio de cultivo, não favoreceu o acúmulo e a distribuição de massa seca e do conteúdo de nitrogênio, nos estádios de desenvolvimento de emissão de radícula, pata de aranha e palito. Para o estágio de segundo lançamento foliar no tratamento onde se forneceu nitrogênio na forma amoniacal foi encontrado a menor massa seca e o maior conteúdo de nitrogênio. O menor conteúdo de nitrogênio foi observado no tratamento onde não se forneceu nutrientes. A remobilização das reservas da semente não foi afetada pelos tratamentos, indicando que o endosperma possui reservas suficientes para atender a demanda de crescimento das plantas até o estágio de segundo lançamento foliar. As atividades da GS e da FD-GOGAT não foram influenciadas pelos tratamentos nos diferentes órgãos da planta em todos os estádios de desenvolvimento estudados. As maiores atividades da NADH-GOGAT e da GDH, ocorreram no estágio de segundo lançamento foliar, no tratamento onde se forneceu nitrato e amônio no meio de cultivo. Ficou também demonstrado que a síntese da Rubisco foi afetada negativamente nas plantas que receberam nitrogênio somente na forma amoniacal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA, C.; MARQUEZ, A.J.; PAJUELO, P.; CANNELL, M.E.; WALLSGROVE, R.M.; FORDE, B.G. Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferridoxin-dependent Glutamate Synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. *Planta*, Berlin, v.189, n.4, p.475-483, Apr. 1993.
- BECKER, T.; PERROT-RECHENMANN, C.; SUZUKI, A.; HIREL, B. Subcellular and immuno-cytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. *Planta*, Berlin, v.191, n.1, p.129-136, July 1993.
- BHULLAR, S.S.; DESAMSETTY, N.K.; BEHURA, S.K.; SINGH, P. Differential Changes in Glutamine Synthetase Isoforms in the Cotyledons of Germinating Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seeds in Response to Osmotic Stress. *Journal Plant Physiology*, New York, v.149, p.201-204, 1996.
- BITENCOURT, A.L. **Mobilização das reservas da semente, particionamento de matéria seca e desenvolvimento inicial de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. c.v. Pintado) sob influência do Nitrogênio.** Lavras: Esal, 1991.63p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- BORJES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.; FIGLIOLIA, M.B. (eds) **Sementes florestais tropicais.** Brasília: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1993. p.83-137.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, p.248-254, 1976.
- CARRYOL, E.; TERC-LAFORGUE, T.; DESBROSSES, G.; PRUVOT-MASCHIO, G.; POIRER, S.; RATET, P.; HIREL, B. Ammonia regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic Glutamine Synthetase is not conserved in two heterologous plant systems. *Plant Science*, Limerick, v.125, n.1, p.75-85, June 1997.
- CRAMER, M.D.; LEWIS, A.M. The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea Mays*) plants. *Annals of Botany*, Londres, v.72, n.4, p.359-365, Oct. 1993a.

- CRAMER, M.D.; LEWIS, O.A.M. The influence of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  nutrition the carbon and nitrogen partitioning characteristics of Wheat (*triticum aestivum* L.) and Maize (*Zea mays* L.) plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.154, n.2, p.289-300, July 1993b.
- DAVIES, D.D. Physiological aspects of protein turnover. In: \_\_\_\_\_. **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: [s.n.], 1982, v.14a, 189-228
- DELÚ-FILHO, N. Efeito do  $\text{N-NO}_3^-$  sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) Lavras: ESAL, 1994. 87p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- DEMBRINSKI, E.; WISNIEWSKA, I.; BOJANOWSKA, K.R. The efficiency of protein synthesis in maize depends on the light regulation of the activities of the enzymes of nitrogen metabolism. **Journal Plant Physiology**, New York, v.149, p.466-468, 1996.
- EMES, M.J.; FOWLER, M.W. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. **Planta**, Berlin, v. 144, p.249-253, 1979.
- FOX, G.G.; RATCLIFFE, R.G.; ROBINSON, S.A. ; STEWART, G.R. Evidence for deamination by Glutamate Dehydrogenase in higher plants: Commentary. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, n.7, p.1112-1115, July 1995.
- GUAZZELLI, E.M.F.M. Efeito de nitrato e amônio no crescimento, assimilação e eficiência de utilização do nitrogênio por cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na fase inicial de crescimento. Lavras:ESAL, 1988. 112p. (Dissertação - Mestrado em Fertilidade do Solo)
- HAYAKAWA, T.; NAKAMURA, T.; HATTORI, F.; MAE, T.; OJIMA, K.; YAMAYA, T. Cellular localization of NADH-dependent glutamate-synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf badles and young grains of rice plants. **Planta**, Berlin, v.193, n.3, p.455-460, Apr. 1994.
- HUTSON, R.G.; SCHIMIDT, R.R. Cell cycle timing of replication of the nuclear gene encoding chloroplastic NADP-specific glutamate dehydrogenase isoenzyme in chorella sorokiniana. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.36, n. 3, p.397-407, Apr. 1995.
- JAKOBS, B.M.; GÜLPEN, M. Influences of different nitrate to ammonium ratios on chlorosis, cation concentrations and biding forms of Mg and Ca in needles of Mg-deficient Norway spruce. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.188, p.267-277, 1997.

- KAMACHI, K.; YAMADA, T.; MAE, T.; OJIMA, K. A role for Glutamine Synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiology*, Washington, v.96, n.2, p.411-417, June 1991.
- LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. The Molecular-Genetics of Nitrogen Assimilation Into Amino Acids in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.47, p.569-593, 1996.
- LEWIS, O.A.M.; JAMES, D.M.; HEWITT, E.J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L.) in response to nitrate and ammonium nutrition. *Annals of Botany*, Wellesbourn, v. 49, n.1, p.39-49, Jan. 1982.
- LEA, P.J.; ROBINSON, S.A.; STEWART, G.R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. *The Biochemistry of Plants*, v.16, n. 1, p.121-159, 1990.
- LEMOS, G.B. Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) cultivadas sob diferentes relações de nitrato amônio. Lavras: UFLA, 1996. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- LIEFFERING, M.; ANDREWS, M.; MACKENZIE, B.A. Nitrate stimulation of mobilization of seed reserves in the temperate cereals: importance of water uptake. *Annals of Botany*, Wellesbourn, v.78, n.6, p.695-701, Dec. 1996.
- LOULAKAKIS, K.A.; ANGELAKIS, K.A.R. Characterization of *Vitis vinifera* L. glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for cytosolic enzyme. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.31, p.983-992, 1996.
- MÄCK, G. Organ-specific changes in the activity and subunit composition of Glutamine Synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of  $\text{NH}_4^+$ . *Planta*, Berlin, v.196, n.2, p.231-238, May 1995.
- MACNALLY, S.; HIREL, B. Glutamine Synthetase Isoforms in Higher Plants. *Physiologie Vegetale*, Paris, v.21, 1983.
- MARTINS-LOUÇÃO; M.A.; DUARTE, P. Effect of ammonium and nitrate nutrition on the growth of carob (*Ceratonia siliqua* L.) plants. In: ULLRICH, W.R.; APARICIO, P.J.; SYRETT, P.J.; CASTILLO, F. (eds) *Inorganic Nitrogen Metabolism*. Berlin: Springer-Verlog, 1987. Cap. 51, p.250-253.
- MARTTILA, S.; SAARELAINEN, R.; PORALI, I.; MIKKONEN, A. Glutamine synthetase isozymes in germinating barley seeds. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.88, n.4, p.612-618, Aug. 1993.

- MIAO, G.H.; HIREL, B.; MARSOLIER, M.C.; RIDGE, R.W.; VERMA, D.P.S. Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic lotus corniculatus. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, n.1, p.11-22, Jan. 1991.
- MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.299-329, 1977.
- OAKS, A. Primary Nitrogen Assimilation in Higher Plants and its Regulation. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.72, n.6, p.739-750, June 1994.
- OAKS, A. Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.73, n.7, p.1116-1117, July 1995.
- OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.345-365, 1985.
- OSUJI, G.O.; MADU, W.C. Ammonium ion-dependent isomerization of glutamate dehydrogenase in relation to glutamate synthesis in maize. **Phytochemistry**, Elmsford, v.39, n.3, p.495-503, June 1995.
- PAHLICH, E. Remarks concerning the dispute related to the function of plant glutamate dehydrogenase: commentary. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.74, n.4, p.512-515, Apr. 1996.
- PEARSON, J.; JI, Y.M. Seasonal variation of leaf glutamine synthetase isoforms in temperate deciduous trees strongly suggests different functions for the enzymes. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.17, n.12, p.1331-1337, Dec. 1994.
- PEREIRA, E.G.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; MOREIRA, F.M.S.; PURCINO, A.A.C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.8, n. 1, p.59-65, 1996a.
- PEREIRA, S.; PISSARRA, J.; SUNKEL, C.; SALEMA, R. Tissue-specific distribution of glutamine synthetase in potato tubers. **Annals of Botany**, Londres, v.77, n.5, p.429-432, May 1996b.
- RAVEN, J.A.; SMITH, F.A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, Cambridge, v.76, p.415-431, 1976.
- REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W.H. Glutamine synthetase and ferridoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (zea mays) root primary response to nitrate. **Plant Physiology**, Washington, v.101, n.4, p.1249-1255, Apr. 1993.

- ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G.; PHILLIPS, R.; RATCLIFFE, R.G.; STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Physiology**, Washington, v.95, n.2, p.509-516, Feb. 1991.
- ROBINSON, S.R.; STEWART, G.R.; PHILLIPS, R. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. **Plant Physiology**, Washington, v.98, n.3, p.1190-1195, Mar. 1992.
- SAKAKIBARA, H.; FUJI, K.; SUGIYAMA, T. Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.36, n.5, p. 789-797, July 1995
- SAKAKIBARA, H.; KAWABATA, S.; HASE, T.; SUGIYAMA, T. Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetases and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.33, n.8, p.1193-1198, Dec. 1992a.
- SAKAKIBARA, H.; KAWABATA, S.; TAKAHASHI, H.; HASE, T.; SUGIYAMA, T. Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamine synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.33, n. 1, p.49-58, Jan. 1992b.
- SAKAKIBARA, H.; SHIMISU, H.; HASE, T.; YAMAZAKI, Y.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y.; SUGIYAMA, T. Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, n.47, p.29561-29568, 1996.
- SAKAMOTO, A.; TAKEBA, G.; TANAKA, K. Synthesis de novo of glutamine synthetase in the embryonic axis, closely related to the germination of *Lettuce* seeds. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.31, n.5, p.677-682, July 1990.
- SAKULKA, J.; LISA, L. Effects of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine synthetase, and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. **Plant Physiology**, Washington, v.50, p.32-36, 1980.
- SCHLEE, D.; THÖRINGER, C.; TINTEMANN, H. Purification and properties of glutamate dehydrogenase in scots pine (*Pinus silvestris*) needles. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.92, n.3, p.467-472, Nov. 1994.
- SCHORTEMAYER, M.; STAMP, P.; FEIL, B. Ammonium tolerance and carbohydrate status in maize cultivars. **Annals of Botany**, Londres, v.79, n.1, p.25-30, Jan. 1997.

- SEITH, B.; SETZER, B.; FLAIG, H.; MOHR, H. Appearance of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase in different organs of the scots pine (*Pinus silvestris*) seedling as affected by light, nitrate and ammonium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.3, p.419-426, July 1994.
- SILVA, C.A. Efeitos da correção da acidez e de fontes de nitrogênio na nitrificação do solo e no crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: ESAL, 1994. 104p. (Dissertação - Mestrado em Fertilidade do Solo)
- STEWART, G.R.; SHATILOV, V.R.; TURNBULL, M.H.; ROBINSON, S.A.; GOODALL, R. Evidence that Glutamate Dehydrogenase Plays a Role in the Oxidative Deamination of Glutamate in Seedlings of *Zea Mays*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.22, p.805-809, 1995.
- STOREY, R.D. Plant endopeptidases. In: \_\_\_\_\_. **Plant proteolytic enzymes**. Boca Raton, 1986, v.1, p.119-140
- TJADEN, G.; EDWARDS, J.W.; CORUZZI, G.M. Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. **Plant Physiology**, Washington, v.108, n.3, p.1109-1117, July 1995.
- TURANO, F.J.; DASHNER, R.; UPADHYAYA, A.; CALDWELL, C.R. Purification of mitochondrial Glutamate Dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. **Plant Physiology**, Washington, v.112, n.3, p.1357-1364, Nov. 1996.
- TURANO, F.J.; THAKKAR, S.S.; FANG, T.; WEISEMANN, J.M. Characterization and expression of NAD(H)-dependent Glutamate Dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v.113, n.4, p.1329-1341, Apr. 1997.
- TURNBULL, M.H.; GOODALL, R.; STEWART, G.R. Evaluating the contribution of glutamate dehydrogenase and the glutamate synthase cycle to ammonia assimilation by four ectomycorrhizal fungal isolates. **Australian Journal Plant Physiology**, Melbourne, v.23, p.151-159, 1996.
- YAMADA, T.; OAKS, A. Distribution of two isoforms of glutamine synthetase in bundle sheath and mesophyll cells of corn leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.72, n.1, p.23-28, Jan. 1988.
- YAMAYA, T.; TANNO, H.; HIROSE, N.; WATANABE, S.; HAYAKAWA, T. A Supply of Nitrogen Causes Increase in the Level of NADH-Dependent Glutamate Synthase Protein and in the Activity of the Enzyme in the Roots of Rice Seedlings. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.36, n.7, p.1197-1204, Oct. 1995.