

**GIDELMA BRITO DE LEMOS**

**CRESCIMENTO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DO  
NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea  
brasiliensis* Muell. Arg.) CULTIVADAS COM DIFERENTES RELAÇÕES  
DE NITRATO E AMÔNIO**

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**  
**1996**

02 07 19

1 2



074 1911 2111

074 1911

02 07 19

1 2

3

074 1911 2111

40625

GIDELMA BRITO DE LEMOS

**CRESCIMENTO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) CULTIVADAS COM DIFERENTES RELAÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO**

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**

**Dr. LUIZ EDSON MOTA DE OLIVEIRA**

LAVRAS-MINAS

1996

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

Lemos, Gidelma Brito de

Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. / Gidelma Brito de Lemos. Lavras : UFLA, 1996.

56p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Seringueira - Nutrição. 2. Nitrato. 3. Amônio. 4. Enzima-Assimilação - Nitrogênio. 5. Nitrogênio - Assimilação. 6. Crescimento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.895289

**GIDELMA BRITO DE LEMOS**

**CRESCIMENTO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) CULTIVADAS EM DIFERENTES RELAÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO**

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 15 de março de 1996



Prof. Dr. Fabiano Ribeiro do Vale



Prof. Dr. Paulo Roberto Mosquim



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

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo mistério da vida.

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento parcial do projeto.

Ao Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira pela orientação, exemplo de vida e competência com que executa suas atividades.

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

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

Ao Prof. Paulo Roberto Mosquim pelas valiosas contribuições dadas.

Ao Nelson Delú Filho pela amizade, revisão e sugestões apresentadas.

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

Aos estagiários Denis Ubeda de Lima e José Ricardo Lima Costa (bolsistas do CNPq) pelo acompanhamento e ajuda na condução deste trabalho.

Aos mestrandos Rogério Machado e Marcel Botelho pela amizade e ajuda nas diferentes fases de condução do experimento.

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

As amigas de república Lucivane, Cláudia e também ao casal Valter e Moemi pelo alegre convívio, apoio e amor fraterno.

Aos amigos do mestrado Ana, Marcel, Marlos, Vespa, André, Poliana, Josirley, Evaristo, Douglas, Paulino, Vilma, Marli, Soninha, Léo, Patrícia, Giovana, Márcia.

Aos funcionários Dartagnhan, Evaristo, Odorêncio e Joel pela inegável ajuda durante os trabalhos.

Aos funcionários Izonel e Eustáquio pela amizade e alegre convivência.

A todos que de alguma forma se fizeram presentes.

O herói tem uma capa de estrelas e tem um cinto de cometas  
na testa a estrela solitária da irmandade dos planetas  
Voa em seu vôo noturno e nos dedos ele usa os sete anéis de saturno.  
Tem nas mãos uma espada de luz que o anjo astronauta lhe deu  
Quando se encontraram no espaço ao anjo astronauta ele então respondeu:  
Meu caminho eu sei  
Não sei qual é o seu  
No Universo tudo voa, tudo parece balão  
Só que para mim, anjo astronauta só interessam os caminhos que levam ao  
coração

(Jorge Mautner)

## BIOGRAFIA

**GIDELMA BRITO DE LEMOS**, filha de João Celho de Lemos e Miriam Ribeiro de Brito Lemos, nasceu em Areia-Paraíba, no dia 03 de Outubro de 1967.

Em 1987 ingressou na Universidade Federal da Paraíba / Centro de Ciências Agrárias no Curso de Engenharia Agrônômica, tendo concluído o mesmo em 1991. Em Novembro do mesmo ano, iniciou o Curso de especialização em "Solos e Nutrição de Plantas" concluindo em Julho 1993. No mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, conculindo o mesmo em Março de 1996.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Proporções de Nitrato e Amônio Relacionadas à Produção e Distribuição de Massa Seca .....	3
2.2 Proporções de Nitrato e/ou Amônio Sobre as Enzimas de Assimilação do Nitrogênio .....	7
2.3 Nutrição Nitrogenada e Assimilação de Nitrogênio em Espécies Florestais .....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
3.1 Obtenção das plantas e sistema de cultivo .....	14
3.2 Avaliações realizadas .....	15
3.2.1 Determinação do pH .....	15
3.2.2 Avaliações biofísicas .....	17

3.2.3 Avaliações Bioquímicas .....	17
3.2.3.1 Determinação do Nitrogênio Total e Proteína Total .....	17
3.2.3.2 Atividade da Redutase do Nitrato .....	18
3.2.3.3 Obtenção dos Extratos Enzimáticos .....	19
3.2.3.4 Extração e Ensaio da Glutamina Sintetase .....	19
3.2.3.5 Extração e Ensaio da Glutamato Sintase Dependente da Ferredoxina e Dependente do NADH .....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
4.1 Altura, Diâmetro, Produção e Distribuição de Massa Seca .....	22
4.2 pH do Meio de Cultivo, Concentração de Nitrogênio Total e Proteína Total em Plantas Jovens de Seringueira .....	30
4.3 Atividade Radicular da Redutase do Nitrato .....	35
4.4 Atividade da Glutamina Sintetase .....	37
4.5 Atividade da Glutamato Sintase Dependente do NADH e Dependente da Ferredoxina .....	38
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>
<b>7 ANEXO .....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 Massa Seca Total (A), da Parte Aérea (B), do Sistema Radicular (C ) e Razão Parte Aérea/Raiz (D) de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. Cultivadas com diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	23
2 Distribuição de Massa Seca do Sistema Radicular entre Raiz Principal e Raízes Laterais em Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	24
3 Área Foliar de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. Submetidas a Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	26
4 Crescimento em Altura de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	27
5 Crescimento em Diâmetro de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	28
6 Crescimento em Diâmetro e Altura de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. no Final do Período Experimental Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	29

7	pH das Soluções Nutritivas dos Vasos onde foram Cultivadas as Plantas de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo ao Final do Período Experimental .....	30
8	Concentração de Proteína Total em Folha e Raiz de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	32
9	Concentração de Nitrogênio Total em Caule, Raiz e Folha de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. Submetidas a Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	33
10	Atividade Radicular da Redutase do Nitrato em Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	37
11	Atividade da GS e GOGAT em Lâminas Foliaves e Raízes de Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. em Função de Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	39

## LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 Composição das Soluções Nutritivas Utilizadas no Experimento .....	16
2 Acúmulo de Nitrogênio em Plantas Jovens de <i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. em Função de Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo .....	35
3 Resumo da Análise de Variância das Características Avaliadas (ANEXO) .	56

## RESUMO

**LEMOS, Gidelma Brito. Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. Lavras: UFLA, 1996. 56p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia - Área de Concentração em Fisiologia Vegetal).**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do nitrato e/ou amônio sobre o crescimento de plantas jovens de seringueira e a atividade da redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase dependente do NADH (NADH-GOGAT) e dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) em diferentes partes da planta. Foi conduzido um experimento em sala-de-crescimento por um período de 120 dias onde foi fornecido as proporções de 0/0, 8/0, 6/2, 4/4, 2/6 e 0/8 mM de nitrogênio na forma de nitrato e/ou amônio a partir da concentração de 8 mM. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos contendo 4,0 L de areia como suporte de cultivo, a qual foi lavada em água de torneira e posteriormente em água deionizada. As soluções foram trocadas a cada 7 dias. Foram avaliados a altura e o diâmetro do caule a cada 15 dias, e ao final do período de cultivo (120 dias) foram avaliados o acúmulo de fitomassa e a atividades das enzimas de assimilação do nitrogênio. Os resultados obtidos mostram que o fornecimento de nitrogênio ao meio de cultivo, favoreceu mais o crescimento em altura

---

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira. Membros da Banca: Fabiano Ribeiro do Vale e Paulo Roberto Mosquim

e diâmetro do caule, acúmulo e distribuição de fitomassa seca nas plantas que receberam só amônio ou na proporção de 4mM/4mM de nitrato e amônio em comparação com as plantas que receberam só nitrato. A atividade radicular da RN foi maior no tratamento só com nitrato decrescendo no tratamento 6mM/2mM de nitrato e amônio e a partir de 4mM/4mM de nitrato e amônio baixou gradualmente com a diminuição do fornecimento de nitrato ao meio de cultivo. A GS apresentou comportamento muito semelhante a RN sugerindo que nas raízes a GS é altamente dependente do amônio oriundo da via de assimilação da RN. Os altos valores da atividade da GS na folha sugerem que outras fontes de amônio além do fornecido pela corrente transpiratória estão sendo utilizados. A atividade das enzimas GS/GOGAT na folha parece operar conjuntamente, com a GS fornecendo substrato para a Fd-GOGAT enquanto que nas raízes os altos valores de atividade da NADH-GOGAT com baixa atividade da GS, sugerem que a glutamina está sendo transportada de outras partes da planta para manter a alta atividade desta enzima nas raízes .

## SUMMARY

### **GROWTH AND ACTIVITY OF NITROGEN ASSIMILATION ENZYMES IN YOUNG RUBBER TREE PLANTS (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) WITH DIFFERENT NITRATE AND AMMONIUM RATIOS.**

The purpose of this work was to evaluate the effects of nitrate and/or ammonium upon the growth of young rubber tree plants and activity of nitrate reductase (NR), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase dependent on NADH (NADH-GOGAT) and dependent on ferredoxine (Fd-GOGAT) in different parts of the plant. One experiment was conducted in growth chamber for a period of 120 days where varying ratios of nitrate and ammonium 0/0; 8/0; 6/2; 4/4 2/6 e 0/8 from amount of nitrogen 8 mM. The plants were grown in plastic pots containing 4,0 L, sand as growing support, which it was washed in water previously. The solutions were replaced every 7 days. The height and diameter of the stem evaluated every 15 days. At the end of the growing period (120 days), accumulation of mass and activity of the nitrogen assimilation enzymes were assessed. The results obtained showed that the nitrogen furnishing to the culture medium, favored growth rather than height and diameter of the stem, accumulation and sharing of plant mass in the plants which only ammonium was given or at 4mM/4mM ratios of nitrate and ammonium as compared with the plants which only of nitrate was given. The root NR activity was greatest under the treatment only with nitrate decreasing in the 6mM/2mM of nitrate and ammonium and from 4mM/4mM of nitrate and ammonium decreased gradually with decreasing furnishment of nitrate to the culture medium. GS activity showed behavior very similar to NR, suggesting that in the roots, GS activity is highly dependent on assimilation way of NR. The high values of

the GS activity in the leaf suggest that other ammonium sources in addition to the provided by transpiring stream, are being used. The activity of the enzymes GS/GOGAT in the leaf seems to work in conjunction, GS furnishing substrate to Fd-GOGAT while that in the roots, the high values of the activity of NADH-GOGAT with low activity of GS suggest that glutamine is being carried from other parts of the plant in order to keep the high activity of this enzyme in the roots.

## 1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. ) é uma espécie natural da Amazônia brasileira, região de clima quente e úmido e seu cultivo comercial enfrenta sérios problemas para se expandir nesta região, devido a elevadas precipitações pluviométricas associadas com a alta umidade relativa favorecendo severos ataques do fungo *Microcyclus ulei*, causador do mal sul americano das folhas.

No Brasil, as regiões consideradas de escape ao ataque do fungo mais promissoras quase sempre, são aquelas onde predominam solos de cerrado, os quais são altamente intemperizados e com baixa fertilidade natural.

O nitrogênio dentre os nutrientes, é o que se encontra em maiores concentrações nos vegetais superiores e suas principais formas disponíveis às plantas no solo são a nítrica e amoniacal, enquanto que o restante do nitrogênio que está na forma orgânica, não é prontamente disponível para as plantas. Deste modo, a nutrição nitrogenada fica, então na dependência da mineralização do nitrogênio orgânico para formas aproveitáveis. Assim, as plantas adquirem o nitrogênio mineral basicamente nas formas de nitrato ou amônio, e as respostas fisiológicas a esses íons são muito diferentes e a habilidade das mesmas para absorver ou metabolizá-los variam grandemente./O suprimento para as plantas com diferentes proporções de nitrato e amônio pode afetar as enzimas do metabolismo do nitrogênio e como consequência final, o crescimento e produção de massa seca. /

Para a grande maioria das espécies cultivadas, principalmente aquelas de ciclo anual e de clima temperado, o metabolismo do nitrogênio de maneira geral tem sido bem estudado, o mesmo não acontecendo para espécies arbóreas onde estudos nesta área são raros. Particularmente para a *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. não foi

encontrado trabalhos relacionando o uso de proporções de nitrato e amônio sobre a atividade das enzimas de redução e assimilação do nitrogênio.

O conhecimento das formas de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio em plantas de seringueira pode ser importante na avaliação do comportamento fisiológico desta espécie nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas, da germinação e produção de mudas até a produção de látex nas diferentes condições climáticas estacionais e edáficas das regiões potenciais para a heveicultura.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do fornecimento de proporções de nitrato e amônio sobre o crescimento, produção de fitomassa e também avaliar a atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS), glutamato sintase dependente de NADH (NADH-GOGAT) e dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) de diferentes partes de plantas jovens de seringueira.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Proporções de Nitrato e Amônio Relacionadas à Produção e Distribuição de Massa Seca.

O nitrogênio é o nutriente mineral que mais limita o crescimento vegetal (Glasscock, Shavin e Hagin, 1995; Magalhães, Huber e Tsai, 1995) sendo portanto, o principal fator limitante para a produção de biomassa em ecossistemas naturais e agrícolas (Greenwood et al, 1991) e pode ser encontrado no solo na forma orgânica e mineral com a quase totalidade na forma orgânica (Vollbrecht, Klein e Kasemir, 1989), que após a mineralização mediada pelos microrganismos, originam nitrato e amônio sendo estas formas prontamente disponíveis para as plantas.

Segundo Redinbaught e Campbell (1991), em solos cultivados, o nitrato é a principal forma de aquisição de nitrogênio pelas plantas pois o amônio adicionado aos solos não ácidos ou oriundos da decomposição da matéria orgânica é convertido rapidamente a nitrato nestes através da nitrificação. Porém, Huber Warren e Tsai (1977) e Fredeen e Field (1992) afirmam que por ser o nitrato susceptível a lixiviação além de sofrer o processo de denitrificação em condições de baixo suprimento de O<sub>2</sub> e o amônio ficar retido nas partículas da superfície do solo e ainda a mineralização ocorrer sob uma faixa mais ampla de condições do solo do que a nitrificação, já que esta última é dependente de vários fatores ambientais, geralmente ambas as formas de nitrogênio estão disponíveis para as plantas.

Entre os fatores que governam a aquisição de nitrogênio pelas plantas e suas respostas ao crescimento, destaca-se as proporções de nitrato e amônio no meio de cultivo, favorecendo o crescimento quando misturas das duas formas de nitrogênio são fornecidas às plantas, (Raab e Terry, 1994).

Embora o nitrato seja considerado a principal forma de nitrogênio disponível às plantas, estudos têm mostrado que algumas espécies crescem melhor quando supridas com proporções adequadas de nitrato e amônio do que quando supridas só com nitrato ou amônio (Silveira e Sant'anna, 1988; Magalhães, Huber e Tsai, 1995); já outras espécies adaptadas a solos ácidos onde pouca ou nenhuma nitrificação existe na zona radicular, ou ainda aquelas adaptadas a baixo potencial redox do solo como, por exemplo o arroz, mostram uma preferência ou total exigência pela forma amoniacal (Vale, 1982; Aarnes, Eriksen e Southon, 1995; Ryan e Walker, 1994; Chaillou et al , 1991 e Vollbrecht, Klein e Kasemir, 1989).

Guazelli (1988), estudando o efeito do nitrato e do amônio no crescimento, assimilação e eficiência de utilização do nitrogênio por três cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., observou que, com a predominância de amônio na solução nutritiva, houve uma redução no crescimento das raízes. Neste mesmo estudo, o efeito prejudicial do amônio pareceu estar mais ligado às condições de acidificação da rizosfera, em consequência da maior absorção de cátions em relação a ânions. Observou-se também que o aumento na proporção de amônio na solução, até esta forma perfazer 50% do nitrogênio suprido, resultou em apreciável aumento da matéria seca da parte aérea, para todas as cultivares de *P. vulgaris* L. estudadas. Um decréscimo na produção de fitomassa total foi observado quando o suprimento de nitrogênio foi dado exclusivamente na forma nítrica.

Silva (1994), estudando a correção da acidez e fontes de nitrogênio na nitrificação e crescimento de *P. vulgaris* L., verificou que, em solos com baixa nitrificação, as maiores produções de massa seca foram obtidas com o uso da uréia e do nitrato de amônio, que propiciaram um suprimento mais balanceado de amônio e nitrato. Porém, quando se procedeu a correção da acidez do solo, o sulfato de amônio mostrou-se tão eficiente quanto a uréia e o nitrato de amônio para o crescimento inicial desta espécie.

Algumas espécies quando cultivadas em solução nutritiva sob condições controladas absorvem o nitrato mais rapidamente que o amônio (Scherer e McKown, 1987) enquanto outras absorvem o amônio (Serna, Borrás e Primo-Lillo, 1992). As taxas de absorção relativas de nitrato e amônio são influenciadas por vários fatores como: concentração de nitrogênio no meio, pH, temperatura, concentração de carboidratos nas raízes e luz (Gashow e Mugwira, 1981; Hartman, Mills e Jones, 1986; Criddle, Ward e Huffaker, 1988).

O processo de absorção de nitrato pelas plantas superiores difere de outros nutrientes devido a absorção nítrica ser induzida pelo próprio íon (Breteler e Siegerist, 1984) e ocorrer através de permeases específicas localizadas na plasmalema (Oaks, 1992) e contra um gradiente de potencial eletroquímico, portanto, com demanda energética (Imsande e Touraine, 1994) ao passo que a aquisição de amônio é um processo com um menor gasto de energia metabólica (Salsac et al, 1987) e, muitas vezes benéfica para algumas plantas (Sandoval-Villa, Alcántara-Gonzalez e Tirado-Torres, 1995). No entanto, sabe-se que grandes quantidades deste cátion causam danos ao sistema radicular reduzindo visivelmente o crescimento da parte aérea em espécies cultivadas quando é fornecido mais que 50% de nitrogênio total na forma amoniacal (Heberer e Below, 1989). Assim, a excessiva absorção do amônio em relação ao nitrato pode alterar o metabolismo, aumentando a respiração, a exsudação radicular, a síntese de putrescina, além de promover maior absorção de fosfato e sulfato (Haynes, 1986); por outro lado, pode reduzir a concentração de carboidratos solúveis nas raízes (Blevins, 1989) e absorção de cátions básicos como por exemplo o potássio (Vale, Volk e Jackson, 1988).

Normalmente, o crescimento vegetativo é mais responsivo ao nitrogênio em relação à produção econômica das culturas, porque nestas a resposta ao nitrogênio é dependente do particionamento de matéria seca na planta (Huett e Dettmann, 1988). Em trabalhos realizados com *Triticum aestivum* L. (Sandoval-Villa, Alcántara-Gonzalez e Tirado-Torres, 1995); *Lycopersicon esculentum* L. (Huett, 1986) e *Beta vulgaris* L. (Raab e Terry, 1994) foram encontrados que o aumento na produção econômica estava positivamente correlacionado com o fornecimento adequado de nitrogênio e com altas taxas de produção de matéria seca nos órgãos de interesse econômico em relação a

produção de matéria seca total. Sandovall-Villa, Alcántara-Gonzalez e Tirado-Torres, (1995), trabalhando com várias proporções nitrato e amônio em plantas de *Triticum aestivum* L. verificaram que as plantas supridas com frações de nitrogênio na forma amoniacal tiveram ciclo mais longo e, quando foram fornecidas altas proporções de nitrogênio na forma amoniacal, a produção de matéria seca decresceu em comparação com aquelas que receberam só nitrato. Plantas de *Beta vulgaris* L. supridas com amônio comparadas com aquelas supridas com nitrato como fonte exclusiva de nitrogênio tiveram redução na taxa de crescimento de raiz, folha e pecíolo em consequência do decréscimo da taxa de expansão de folhas individuais e não na queda da taxa fotossintética por unidade de área foliar. Isto foi atribuído segundo Raab e Terry (1994), a um redução na expansão das células das folhas.

Shelp (1987), estudando o efeito do fornecimento de nitrato e amônio em plantas de *Brassica oleracea* L., observou diferenças marcantes nas características de crescimento entre as plantas supridas com nitrato e amônio. Em geral, as plantas supridas com amônio tiveram crescimento vegetativo menor, caules mais finos e folhas estreitas; com as folhas mais novas apresentando necrose marginal. As plantas supridas com amônio apresentavam ainda, ciclo mais longo com as folhas mostrando coloração verde azulado intenso, em contraste com as plantas supridas só com nitrato que apresentavam coloração verde claro.

Silveira e Sant'anna (1988), estudando diferentes proporções de nitrato e amônio em *Panicum maximum*, Jacq., observaram um decréscimo na produção de fitomassa seca e teor de nitrogênio total com o aumento do teor de amônio na solução nutritiva, ocorrendo distúrbio no metabolismo protéico a partir de 50% de amônio no meio de cultivo. Estes resultados para esta espécie foram confirmados por Andrade et al (1995b), que observaram maior acúmulo de massa seca nas plantas supridas com nitrato combinadas ou não com amônio, havendo uma pequena tendência de maior acúmulo de massa seca na presença de ambas as formas de nitrogênio, inferindo que, embora as plantas possam receber ambas as formas de nitrogênio a combinação entre elas parece ser a forma ideal para o crescimento das mesmas.

Pereira (1995) em estudo sobre micorrização e fósforo na resposta de espécie arbóreas ao fornecimento de nitrogênio mineral, observou que estas espécies responderam ao suprimento de nitrogênio ao meio de cultivo e a adição de nitrato aumentou a produção de matéria seca destas espécies em comparação com amônio.

Delú Filho (1994), estudando o fornecimento de diferentes concentrações de nitrato em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. observou que o fornecimento de nitrato nas concentrações 8 e 12 mM favoreceu maior acúmulo de fitomassa da parte aérea, enquanto que para o sistema radicular isto foi observado nas concentrações de 1, 2 e 4 mM.

## 2.2 Proporções de Nitrato e Amônio sobre as Enzimas do Metabolismo do Nitrogênio

Existem algumas espécies vegetais que produzem todo seu nitrogênio orgânico nas raízes (*Lupinus* spp), outras o fazem na parte aérea (*Xanthium* sp) e um terceiro grupo promove a redução e assimilação em ambas as partes (Pate, 1980). Muitos estudos têm sido realizados sobre o papel do sistema aéreo, em particular os cloroplastos, no metabolismo do nitrogênio em plantas superiores (Wallsgrave, Lea e Mifflin, 1983; Oaks, 1992).

Na maioria das espécies estudadas as folhas são os principais sítios de redução do nitrato e das subseqüentes reações de assimilação do amônio e biossíntese de aminoácidos (Lea, Robison e Stewart, 1990). No entanto, quase todas as espécies vegetais nas quais estas generalizações são feitas foram baseadas em espécies herbáceas de ciclo curto. Andrews (1986) tem sugerido que em espécies perenes de clima temperado a assimilação do nitrogênio se dá predominantemente na raiz, enquanto que em espécies perenes de clima tropical isto ocorre principalmente nas folhas. A maioria das espécies cultivadas utilizam o nitrato como fonte de nitrogênio e seu efeito no metabolismo geral da planta tem sido muito estudado. Após sua absorção o nitrato é reduzido para amônio, o qual é depois assimilado a

aminoácidos. Esta redução ocorre em dois estágios, com o nitrito sendo o produto intermediário. As enzimas que catalizam as reações são a redutase do nitrato (RN) e a redutase do nitrito (RN<sub>i</sub>). A RN é uma enzima chave envolvida no primeiro passo da assimilação do nitrato em plantas. A isoforma usual em folhas verdes é dependente de NADH (RN-NADH; E.C. 1.6.6.1.) e nas raízes é dependente de NADPH (RN-NADPH; E.C. 1.6.6.2.), sendo em ambos os casos induzidas pelo próprio substrato (Oaks, 1992; Aslam, e Huffaker, 1984); apresentando rápido "turnover" (Aslam e Oaks, 1976; Beevers e Hageman, 1969) e, é considerada uma enzima citosólica (Dalling, Talbert e Hageman, 1972). Contudo, estudos têm evidenciado a presença de uma isoforma RN associada com a membrana plasmática, atuando como o próprio carregador de nitrato durante a absorção (Jackson, Kwik e Volk, 1976; Meyerhoff et al, 1994). (Mair 39)

O nitrato quando adicionado ao meio de cultivo aumenta a atividade enzimática da RN (Oaks, 1992; Aslam e Oaks, 1976; Beevers e Hageman, 1969) e a quantidade de proteína RN (Somers et al, 1983) em diferentes tecidos de folhas e raízes.

Srivastava (1980), afirma que o efeito do amônio na atividade da RN durante e após a indução depende da espécie, genótipo usado e condições ambientais podendo ter efeito negativo, positivo ou neutro; e, vários trabalhos têm confirmado que diferentes fontes de nitrogênio fornecida à planta altera a atividade enzimática da RN (Samuelson et al, 1995) bem como outros fatores como luz (Schuster et al, 1988a) e concentração externa de amônio no meio (Rajasekhar e Mohr, 1986).

Glutamina e glutamato são considerados os produtos primários da assimilação do amônio, com as enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Glutamato Sintase (GOGAT) atuando como catalizadores do ciclo do glutamato, no qual o glutamato é tanto substrato como produto final. A redução e assimilação podem ocorrer nas raízes ou folhas sendo que as proporções relativas variam entre estes dois sítios com a espécie (Pate, 1980; Mack e Tischner, 1990; Amâncio e Santos, 1992) e condições ambientais (Costa, 1986).

Esta enzima catalisa a conversão do aminoácido glutamato (GLU) para a amida Glutamina (GLN), numa reação que requer além do GLU e do amônio, ATP e um cátion divalente como cofator. A GLN produzida pode ser utilizada em um grande número de eventos metabólicos como doadora de nitrogênio para a formação de outros compostos

folha = GS alto f  
GS clomp

nitrogenados, sendo juntamente com a asparagina e ureídeos, os principais compostos nitrogenados translocados em leguminosas (Joy, 1988; Mifflin, Wallsgrove e Lea, 1981).

A GS pode representar de 1 a 2% do total de proteínas solúveis em órgãos capazes de assimilar amônio e sua atividade aumenta acentuadamente durante o desenvolvimento de nódulos em raízes de espécies leguminosas (Hungria, Eagleshan e Hardy, 1992), em folhas estioladas quando expostas à luz (Hirel e Gadai, 1980) e na presença de nitrato no meio (Santos e Salema, 1992). Todas estas alterações são atribuídas ao aparecimento de diferentes isoenzimas (Lea, Robinson e Stewart, 1990 e Mäck, 1995). Nas folhas podem ser encontradas duas formas de GS; uma citosólica (GS<sub>1</sub>) e outra cloroplastídica (GS<sub>2</sub>) e, também tem sido identificado várias isoformas da GS<sub>1</sub> citosólica, principalmente em leguminosas (Sakakibara et al, 1992), sendo que a GS<sub>1</sub> compreende a maior porção da GS foliar. Recentemente, tem sido demonstrado a existência de duas isoformas de GS também nas raízes, sendo uma plastídica (Vézima, Hope e Joy, 1987)

Múltiplas isoformas de GS, a enzima chave na assimilação do amônio, podem permitir uma melhor adaptabilidade fisiológica a diferentes fontes de nitrogênio. Porém, os efeitos do nitrato e amônio na atividade enzimática da GS são controversos (Mifflin e Lea, 1977). Vários trabalhos evidenciam o nitrato e amônio como indutores da GS em várias espécies. Mäck (1995), trabalhando com *Hordeum vulgare* L. observou maior atividade específica da GS nas folhas quando comparada às raízes de plantas supridas exclusivamente com amônio; porém outros trabalhos mostram resultados contrários sobre o efeito desses íons na atividade enzimática da GS e, em trabalhos realizados por Ratajczak, Ratajczak e Mazurowa (1981), estes autores observaram que o amônio inibiu a atividade da GS.

Existem poucas referências da influência do nitrato e amônio na atividade enzimática da GOGAT. Santos e Salema (1992), em estudos com *Kalanchoe laterifolia* Engl., observaram que a atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio foram afetadas pelos diferentes níveis de nitrogênio no meio de cultivo, onde as atividades enzimáticas da RN, RN<sub>i</sub>, GS e GOGAT dependente da ferredoxina aumentaram enquanto que GOGAT e GDH dependentes do NADH diminuíram.

↑ Fda GOGAT - } fotos. no cloroplasto  
↓ GS-GOGAT - NADPH  
GOGAT - NADPH → NADPH

A GOGAT catalisa a transferência redutiva do nitrogênio amídico da GLN para o 2-oxoglutarato, para formar o GLU podendo ocorrer três formas distintas: em folhas a maior porção da enzima encontra-se localizada nos cloroplastos, sendo a ferredoxina o principal agente redutor da reação, enquanto que a forma dependente do NADPH encontra-se em porções reduzidas (Wallsgrave, Lea e Mifflin, 1982). A terceira forma conhecida da enzima está presente nas células das raízes e utiliza o NADH como poder redutor (Oaks e Hirel, 1985). O papel desempenhado pela GOGAT é de extrema importância, pois ela promove ligação entre a assimilação primária do N e a síntese de aminoácidos. As duas moléculas de GLU formadas resultam na produção líquida de um GLU e a outra molécula formada poderá retornar como substrato para a GS. (Joy, 1988).

A ação conjunta da GS/GOGAT tem sido denominada ciclo do glutamato. Neste ciclo a GS produz grandes quantidades de glutamina, a qual exige igual quantidade de  $\alpha$ -ketoglutarato proveniente da respiração mitocondrial de fotossintatos, como esqueletos de carbono necessários para formar glutamato. Esta exigência por carboidratos pode regular a toxidez de amônio para uma dada espécie determinando com que velocidade o amônio absorvido pode ser assimilado (Goyal, Lorenz e Huffaker, 1982).

A interação entre metabolismo do carbono fotossintético e nitrogênio em plantas superiores tem sido estudado demonstrando que em plantas supridas com amônio, a atividade da Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPcase) é maior comparada com aquelas crescendo em nitrato (Huppe e Turpin, 1994). De acordo com esses autores a PEPcase serve para gerar íons hidrogênios, os quais são necessários para substituir aqueles excluídos pelas células das raízes na troca pela entrada do amônio. A PEPcase serve também como reação anaplerótica fornecendo o oxaloacetato no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), cujos níveis caem devido a remoção de  $\alpha$ -ketoglutarato na assimilação de amônio via GS/GOGAT (Muller et al, 1990). Segundo estes autores, devido as raízes serem dependentes em relação a parte aérea por carboidratos e devido a assimilação do amônio resultar em uma queda na quantidade de carboidratos, pode ser inferido que o crescimento das raízes pode ser diminuído diretamente pela perda de carboidratos para asssimilação do amônio.

As reações que suprem os elétrons e energia para a assimilação de nitrogênio são sistemas associados: a oxidação do 3-fosfogliceraldeído e/ou malato como fonte de NADH e a conversão de energia luminosa pelos fotossistemas I e II para gerar energia química na forma de ATP e ferredoxina reduzida fornecendo poder redutor para os estágios finais da assimilação (Huppe e Turpin, 1994).

### 2.3 Nutrição Nitrogenada e Assimilação de Nitrogênio em Espécies Florestais

Em sistemas florestais a ciclagem de nutrientes é muito rápida, onde as espécies apresentam elevada capacidade de mobilizar e reutilizar os nutrientes objetivando manter o equilíbrio da biomassa na floresta (Nambiar, 1989; Stewart, Joly e Smirnof, 1992) porém, poucos estudos enfocam estes aspectos em sistemas florestais de clima tropical (Bower e Nambiar, 1989; Sanches e Salinas, 1981).

Quando o equilíbrio destes ecossistemas é quebrado, a capacidade de conservação de nutrientes na biomassa é perdida, através da grande quantidade de nutrientes, como nitrato que são mineralizados e lixiviados ou, através da diminuição massa microbiana, a qual desempenha um importante papel na regulação e suprimento de nutrientes (Miller e Allen, 1992). Dentre os diversos nutrientes, o nitrogênio tem merecido considerável destaque uma vez que este se mostra limitante para o crescimento e produção florestal no mundo (Nambiar, 1989; Öhlson e Ögbom, 1993; Seith et al, 1994)

Embora os íons nitrato sejam geralmente a principal fonte de nitrogênio inorgânico disponível para as plantas, íons amônio podem predominar em algumas condições de solos e certos estágios sucessionais (Smirnof e Stewart, 1985). Variações tanto espaciais quanto temporais nas formas de nitrogênio disponíveis, parecem ser refletidas pelas diferenças entre espécies na capacidade para assimilar íons nitrato e amônio. Espécies pioneiras ou colonizadoras utilizam preferencialmente o nitrato em relação ao amônio (Stewart, Hegart e Specht, 1988). Esses mesmos

autores num estudo de assimilação de nitrogênio inorgânico em florestas da Austrália verificaram que folhas de espécies pioneiras geralmente exibiam uma grande capacidade de assimilar nitrato, enquanto folhas de espécies de subbosque, mostravam menor nível de atividade da enzima RN e menor capacidade de reduzir nitrato mesmo com este disponível.

Stewart, Joly e Smirnof (1992), em estudos com espécies lenhosas do cerrado e florestas da região sudeste do Brasil, encontraram baixos níveis de atividade da enzima RN nas folhas dessas espécies sugerindo que os íons nitrato parecem não ser a forma preferencial de aquisição de nitrogênio nessas comunidades e, Bustamante et al (1995) salienta que o sítio de redução do nitrato apresenta implicações ecológicas que podem regular a competição entre espécies vegetais bem com a sua dinâmica populacional.

Recentemente Stewart, Pate e Unkovick (1993) investigaram como espécies florestais utilizavam o nitrogênio inorgânico no solo após uma sequência de queimadas, e verificaram alta atividade da enzima RN para todas as espécies em locais recentemente queimados e baixas atividades em locais não queimados por vários anos, e nos primeiros locais o nitrato era a forma de nitrogênio predominante.

De acordo com Stewart, Hegart e Specht (1988); Stewart, Joly e Smirnof (1992), diferenças são também evidenciadas entre espécies de floresta tropical com respeito a atividade específica de isoformas cloroplastídicas e citosólicas da principal enzima assimilatória do amônio, a GS. Tipicamente, espécies pioneiras têm maior parte da GS total da folha presente nos cloroplastos, enquanto que em espécies de subbosque predomina a forma citosólica. Árvores pioneiras parecem então assemelhar-se com espécies de cultivo anual com respeito a predominância de sistema aéreo na assimilação do nitrogênio inorgânico e espécies climax parecem predominar o sistema radicular para assimilação do nitrogênio inorgânico.

Delú Filho (1994) estudando diferentes níveis de nitrato em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. observou que este íon influenciou positivamente a atividade da GS, GOGAT e GDH tanto para as folhas quanto para as raízes e atividade da RN para raízes. Este autor observou ainda que a redução do nitrato ocorreu exclusivamente no sistema radicular, já que não foi detectada atividade da RN nas

lâminas foliares. Por outro lado este autor verificou que esta espécie apresentou maior capacidade para assimilação do amônio nas lâminas foliares quando comparado com o sistema radicular sugerindo que existe um mecanismo de transporte do nitrogênio nesta espécie das raízes até ao xilema foliar para então ser incorporado a aminoácidos, pois altas concentrações de amônio podem ser tóxicas para as plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das Plantas e Sistema de Cultivo

Este estudo foi conduzido em sala de crescimento no período compreendido entre 08/04/95 a 08/08/95, com temperatura de  $28\pm 3$  °C, umidade relativa do ar de 60-80%, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossinteticamente ativa (R.F.A.) de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinada no dossel das plantas.

As plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) utilizadas foram obtidas a partir de sementes ilegítimas provenientes de um plantio policlonal formado por 37% de pés-franco e o restante formado por uma mistura de clones com idade aproximada de 38 anos, da Fazenda Água Milagrosa, Tabapoã - São Paulo.

As sementes foram coletadas em março de 1995 e germinadas em canteiros de areia previamente lavada com água de torneira e posteriormente com água deionizada e protegidos contra a radiação solar direta com sombrite (50%) mantidos a 30 cm de altura. Foram efetuadas três irrigações diárias. Ao atingirem o estágio de "pata de aranha" as plântulas foram selecionadas de acordo com a uniformidade das raízes e conjuntos de três plântulas foram transferidos para vasos plásticos contendo 4,0 litros de areia como substrato de cultivo, a qual foi previamente lavada com água de torneira em abundância e depois com água deionizada. Foi realizada a quantificação do nitrogênio disponível na areia pelo método de semi-Kjedahl, extraídos com KCl 1N e, não foi detectada presença de nitrogênio disponível.

Os tratamentos utilizados foram seis, com um tratamento sem nitrogênio (0/0) e nos demais foram fornecidos 8 mM de nitrogênio às plantas na forma de nitrato e

amônio nas seguintes proporções (8/0; 6/2; 4/4; 2/6 e 0/8) em mM, baseado em resultados anteriores obtidos por Delú Filho (1994).

Cada vaso recebeu 1400 mL de solução nutritiva, modificada a partir da solução utilizada por Delú Filho (1994), pH 6,0 contendo os diferentes tratamentos (Tabela 1), Deste volume colocado em cada vaso, 1000 mL foram retidos pela areia e o excedente de 400 mL foi coletado em um prato colocado sob cada vaso, esse volume de 400 mL dos pratos foi completado com água deionizada com o pH corrigido para 6,0 diariamente. Ao final de 7 dias, as soluções foram trocadas. Antes de proceder a troca de solução o volume dos pratos foi completado para 400 mL, com água deionizada, pH 6,0 conforme descrito anteriormente. Este volume de 400 mL de solução nutritiva dos pratos foram colocados nos vasos coletando-se o excedente nos pratos o qual foi retornado aos vasos; este procedimento foi repetido três vezes e então a solução foi descartada.

Após isto foram colocados nos vasos 1000 mL da nova solução, coletando-se o excedente nos pratos e voltando este excedente novamente aos vasos, repetindo-se este procedimento três vezes. Após este procedimento, a solução foi descartada completando-se o volume dos vasos com os 400 mL da solução nutritiva restante.

## 3.2 Avaliações Realizadas

### 3.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH da solução foi realizada segundo metodologia de rotina do Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Após a areia ter sido lavada, tomou-se 5 amostras de 10 gramas cada em beckers com capacidade para 40 mL contendo 25 mL de água destilada. Após agitação, os beckers permaneceram em repouso por 30 minutos aproximadamente e em seguida procedeu-se a leitura do pH no sobrenadante.

TABELA 1 Composição das Soluções Nutritivas Utilizadas no Experimento (Adaptado de Delú Filho, 1994)

Sal	Solução Estoque (SE) (M)	Proporção de nitrato e amônio (mM)					
		0/0	8/0	6/2	4/4	2/6	0/8
		Volume da SE (mL L <sup>-1</sup> )					
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,5	--	6,0	4,0	--	--	--
KNO <sub>3</sub>	0,5	--	4,0	4,0	--	4,0	--
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	--	--	2,0	--	4,0	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	2,0
CaSO <sub>4</sub>	0,01	150	--	--	100	50	150
KCl	0,5	2,0	--	--	--	--	4,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5	2,5	5,0	2,0	2,5	2,0	2,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	2,0	2,0	2,5	2,0	--	--
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	2,0	1,0	1,0	3,0	2,0	1,0
CaCl <sub>2</sub>	0,5	--	--	--	1,0	2,0	--
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	--	--	--	--	1,0	1,0
Solução de Micronutrientes	(mM)						
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CuSO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA	20	1,0	1,0	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	1,0	1,0
MnSO <sub>4</sub>	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
ZnSO <sub>4</sub>	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Elemento		Concentração Total (mg L <sup>-1</sup> )					
N		112	112	112	112	112	112
P		31	31	31	31	31	31
K		117	117	117	117	117	117
Ca		60	120	80	60	60	60
Mg		30	60	30	30	24	24
S		120	96	88	120	160	198

O mesmo procedimento foi utilizado no final do experimento onde foram realizadas medições em todos os vasos. O pH da solução nutritiva foi determinado no momento de coleta do experimento e para isto foram coletadas amostras de substrato próximo a região das raízes. Isto foi realizado sem completar o volume de 400 mL dos pratos com água deionizada

### 3.2.2 Avaliações Biofísicas

A cada 15 dias foram avaliados o diâmetro e a altura do caule (medidos em relação à superfície do vaso). Ao final do experimento, as plantas de cada vaso foram divididas em caule, raízes laterais, raiz principal e lâminas foliares, essas partes foram acondicionadas em saco de papel e levados para secar em estufa com circulação de ar a 70 °C até peso constante. Também foi avaliado o número de lançamentos foliares e o número de folhas por lançamentos. De cada vaso foram tomadas amostras representativas constituídas por dez discos foliares com diâmetro conhecido para determinação da área foliar seguindo metodologia descrita por Benicasa (1989).

### 3.2.3 Avaliações Bioquímicas

#### 3.2.3.1 Determinação do Nitrogênio Total e Proteína Total

O nitrogênio total foi determinado pelo método de semi-Kjedahl em tecidos de raiz, caule e folha previamente moídos em moinho tipo Wiley em peneira de 40 mesh.

A determinação de proteína total foi realizada pelo método de Lowry (1951) nos mesmos extratos brutos utilizados para os ensaios enzimáticos. Foi adicionados 250  $\mu$ L

de NaOH 0,2N em tubos de ensaio e, em seguida, 10  $\mu\text{L}$  do extrato bruto de tecido foliar ou 100  $\mu\text{L}$  de extrato bruto de raízes e os volumes completados com água para 500  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, acrescentou-se ao meio 5 mL do reagente de Lowry o qual foi constituído por 100 mL de carbonato de sódio ( $30 \text{ g L}^{-1}$  de água), 1 mL de sulfato de cobre a 2% (m/v) e 1 mL de tartarato de sódio a 4% (m/v). As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente quando então foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução de Fenol 1N, agitando-se em vortex novamente e incubando-se a temperatura ambiente por mais 30 minutos e, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotometro a 660 nm e os valores expressos em mg de Proteína  $\text{g}^{-1}$  de massa fresca.

### 3.2.3.2 Atividade da Redutase do Nitrato

Ao final do experimento, foi realizado um ensaio *in vivo* da Redutase do Nitrato (RN; E.C. 1.6.6.1) nas raízes laterais das plantas de seringueira segundo metodologia e condições de ensaio realizadas anteriormente por Delú Filho (1994). De cada tratamento tomou-se uma amostra de 500 mg de raízes, a qual foi transferida para beakers de 20 mL contendo 5 mL de um meio de incubação constituído por tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5; 100 mM de  $\text{KNO}_3^-$  e 5% de n-propanol (v/v) e foram submetidos a infiltração à vácuo durante um minuto por duas vezes. Após este procedimento, os beakers foram colocados em banho-maria a 30 °C, com agitação no escuro. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas aos 10 e 70 minutos respectivamente, adicionando-as a um meio de reação constituído por 1 mL de sulfanilamida 1% (p/v) em HCl 1,5N; 1 mL de N-2-naftil etilenodiamino di-HCl 0,02% (p/v) e completado o volume final de 4,0 mL com 1,5 mL de água destilada. A quantidade de nitrito formado no meio de reação foi determinada colorimetricamente num espectrofotômetro a 540 nm. A atividade da RN foi expressa em  $\mu\text{mol de NO}_2^- \text{ kg}^{-1} \text{ Massa Fresca h}^{-1}$ .

### 3.2.3.3 Obtenção dos Extratos Enzimáticos

A obtenção dos extratos e os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos por Delú Filho (1994). O material vegetal utilizado era composto de raízes laterais previamente lavadas em água deionizada e lâminas foliares sem a nervura central, coletadas após 5 horas de exposição das plantas à luz, e imediatamente colocados em papel alumínio e congelados em N<sub>2</sub> líquido, o material foi depois transferido para um freezer -80 °C onde ficou armazenado até a execução das análises enzimáticas.

Os extratos brutos foram obtidos pela maceração de 1,0 grama de tecido (raiz ou folha) seguido de uma centrifugação refrigerada a 18.000 g por 15 minutos. A temperatura de todos os equipamentos e soluções utilizadas durante a realização dos ensaios foi mantida a 4°C.

### 3.2.3.4 Extração e Ensaio da Glutamina Sintetase (GS; E.C.6.3.1.2)

O extrato enzimático bruto foi obtido por maceração em graal do tecido vegetal em 4 e 5 mL respectivamente para raiz ou folha, de um meio composto por tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5, 10% de polivilpolipirrolidona (PVPP), 2mM de Ditiotretol (DTT), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 0,1M de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). Após centrifugação, o sobrenadante (extrato bruto) foi acondicionado em tubo de ensaio e mantidos no gelo.

Para o ensaio da GS, a quantidade de 300 µL do extrato bruto foi adicionado a 700 µL de um meio de reação contendo tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5 (200 µL), 0,1M de 2-mercaptoetanol (100 µL), 0,4 M de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (50 µL), 0,1 M de NH<sub>2</sub>OHCl (150 µL), 0,1 M de ATP (100 µL) e 0,5 M de glutamato (100 µL) totalizando um volume final de 1000 µL e incubou-se a mistura durante 30 minutos a 30 °C. A reação foi paralizada pela adição de 1,0 mL de uma solução contendo FeCl<sub>3</sub> 0,37M, 0,67M de HCl e 0,2M de ácido tricloroacético (TCA). Foi centrifugado a 16.000 g por 5 minutos e o quelato Fe-L-

glutamil- $\gamma$ -hidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{mol}$  de GHA  $\text{kg}^{-1}$  Massa Fresca  $\text{min}^{-1}$ .

### 3.2.3.5 Extração e Ensaio da Glutamato Sintase Dependente da Ferredoxina (Fd-GOGAT; E.C.1.4.1.7) e Dependente do NADH (NADH-GOGAT; E.C.1.4.1.14).

A extração enzimática foi realizada através da maceração em graal dos tecidos vegetais em um meio composto de 4 e 5 mL de solução, respectivamente para raiz e folha, de tampão fosfato de potássio 0,1M pH, 7,5; 2 mM de DTT; 1 mM de PMSF; 10% de PVPP e 0,1M de EDTA. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de ensaio mantidos em gelo (Extrato bruto). No ensaio da Fd-GOGAT, a quantidade de 300  $\mu\text{L}$  do Extrato bruto foi adicionado a 1200  $\mu\text{L}$  de um meio contendo tampão fosfato 0,5M, pH 7,5 (400  $\mu\text{L}$ ), glutamina 0,1M (150  $\mu\text{L}$ ), 2-oxoglutarato ( $\alpha$ -Ketoglutarato) 0,1 M ( 150  $\mu\text{L}$  ) e metil viologênio 2mg  $\text{mL}^{-1}$  (200  $\mu\text{L}$ ). A mistura foi incubada por 2 minutos a 30 °C e a reação foi iniciada com a adição de 300  $\mu\text{L}$  da seguinte mistura: 16 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  + 16 mg de  $\text{NaHCO}_3$  por mL de água destilada totalizando um volume de 1,5 mL. A reação foi paralizada por imersão dos tubos em água a 90 °C durante 2 minutos e, imediatamente, agitado em vortex até desaparecimento total da cor azul e posteriormente resfriado em gelo.

Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação a 16.000 g durante 5 minutos, retirando-se uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra que foi aplicada em coluna Dowex 1 X 8 na forma acética. Após a lavagem da coluna com 15 mL de água destilada, foram utilizados 7 mL de ácido acético 300 mM para eluir o glutamato que estava retido na coluna; este volume foi coletado em tubos de vidro dos quais foram retirados uma alíquota de 1,0 mL para reagir com 2,0 mL de uma solução constituída por 0,4 g de 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 incubados por 10 minutos a 80 °C

com agitação, que posteriormente foram resfriados em gelo e a quantidade de glutamato formada foi determinada em espectrofotômetro a 506 nm. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol de GLU kg}^{-1}$  Massa Fresca  $\text{min}^{-1}$

Para o ensaio da NADH-GOGAT, foi adicionado o extrato bruto a um meio de reação constituído por tampão fosfato de potássio 0,5M, pH 7,5.(o volume destes extratos variaram em função dos tratamentos), 0,1M de glutamina (100  $\mu\text{L}$ ), 2-oxoglutarato 0,1M (100  $\mu\text{L}$ ), KCl 0,1M (100  $\mu\text{L}$ ), totalizando um volume final de 1000  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas por três minutos a 25 °C e em seguida foram transferidas para uma cubeta e foi adicionado 2 mM de NADH (100  $\mu\text{L}$ ), 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  $\mu\text{mol de GLU kg}^{-1}$  Massa Fresca  $\text{min}^{-1}$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Altura, Diâmetro, Produção e Distribuição de Massa Seca.

- Não foi feita teste de modo...

Observa-se na Figura 1 que houve diferença significativa na produção e distribuição de massa seca entre os tratamentos estudados. O menor acúmulo de massa seca total e massa seca da parte aérea (Figura 1A e B) ocorreu no tratamento sem nitrogênio. Verifica-se que a produção de fitomassa total e da parte aérea observadas no tratamento que recebeu só amônio foi maior que o tratamento que recebeu só nitrato. Entre os tratamentos que receberam nitrogênio na forma nitrato e amônio maior produção de massa seca total e da parte aérea foi verificada no tratamento 4mM/4mM de nitrato e amônio, não diferindo do tratamento que recebeu só amônio. Tal fato, foi observado também por Guazelli (1988) para três cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., onde se verificou uma diminuição na matéria seca desta espécie, quando o suprimento de nitrogênio se dava exclusivamente na forma de nitrato e o aumento na proporção de amônio, até perfazer 50% do nitrogênio suprido, resultou em aumento em apreciável da matéria seca da parte aérea.

Em relação ao sistema radicular (Figura 1C), verifica-se que não houve diferença no acúmulo de massa seca do sistema radicular entre os tratamentos 0/0, 4/4 e 0/8 mM de nitrato e amônio sendo maiores que os tratamentos 8/0, 6/2, e 2/6 mM de nitrato e amônio e estes foram iguais entre si.

Este mesmo padrão de comportamento para acúmulo de massa seca total e da parte aérea não foi verificado por Shelp (1987) para *Brassica oleracea* L.; Silveira e Sant'anna (1988) e Andrade et al (1995) para *Panicum maximum*, onde estes autores

encontraram maior produção de massa seca total e da parte aérea quando o nitrato foi a única forma de nitrogênio disponível a estas espécies. Resultados contrários também foram encontrados por Pereira (1995) trabalhando com diferentes fontes de nitrogênio em *Senna macranthera*, *Senna multijuga*, *Jacaranda mimosaeifolia* e *Melia azedarach* observando maiores acúmulos de massa seca total, da parte aérea e do do sistema radicular nas plantas que receberam só nitrato.

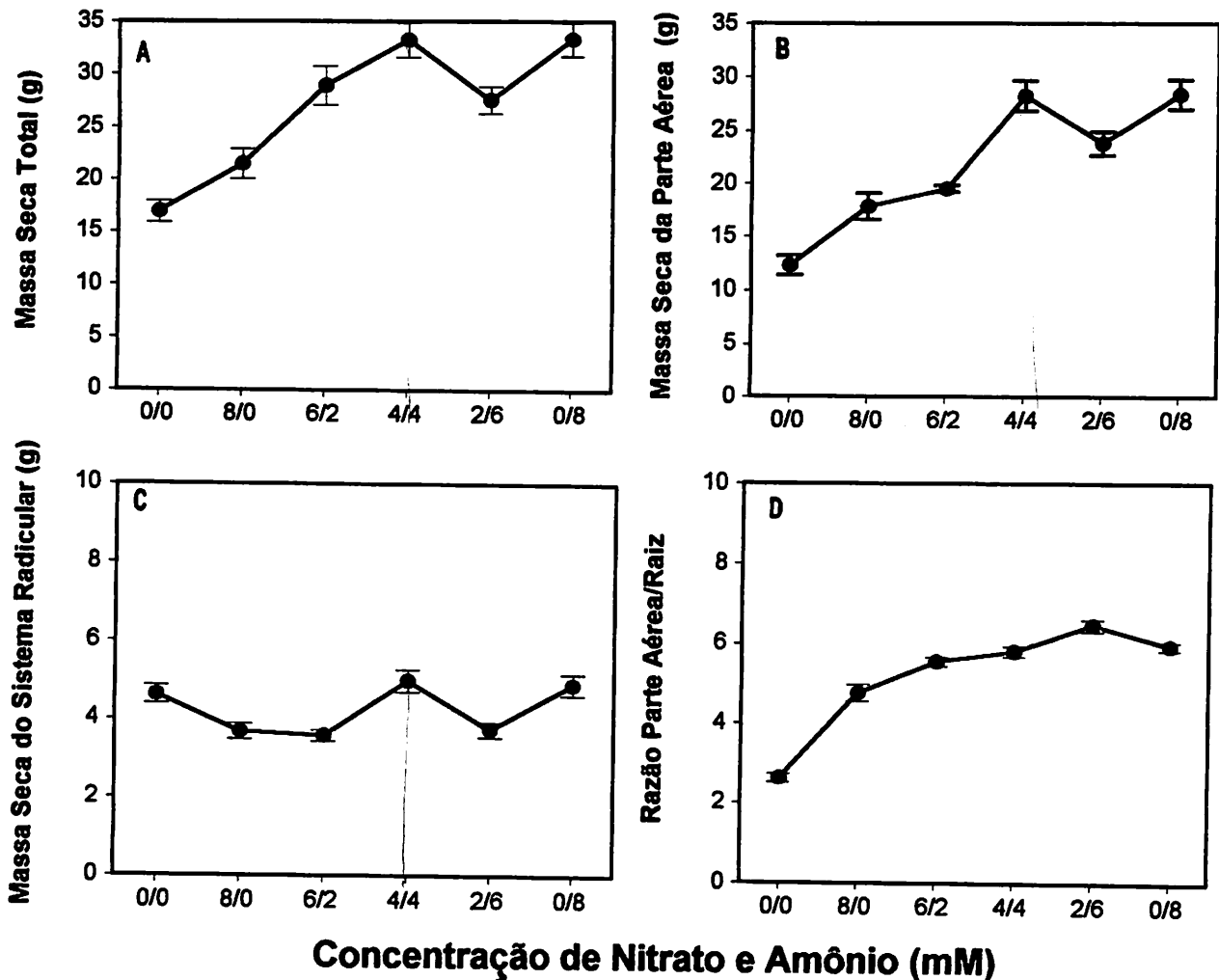


FIGURA 1 Massa Seca Total (A), da Parte Aérea (B), do Sistema Radicular (C) e Razão Parte Aérea/Raiz (D) de Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições)

Quando se separou a massa seca do sistema radicular em raiz principal e raízes laterais (Figura 2) verificou-se que a raiz principal teve uma maior contribuição no acúmulo da massa seca do sistema radicular do que as raízes laterais. Tanto as raízes laterais quanto as raízes principais apresentaram o mesmo comportamento do sistema radicular (Figura 1C) em todos os tratamentos com exceção do tratamento 0mM/0mM de nitrato e amônio que foi menor nas raízes laterais.

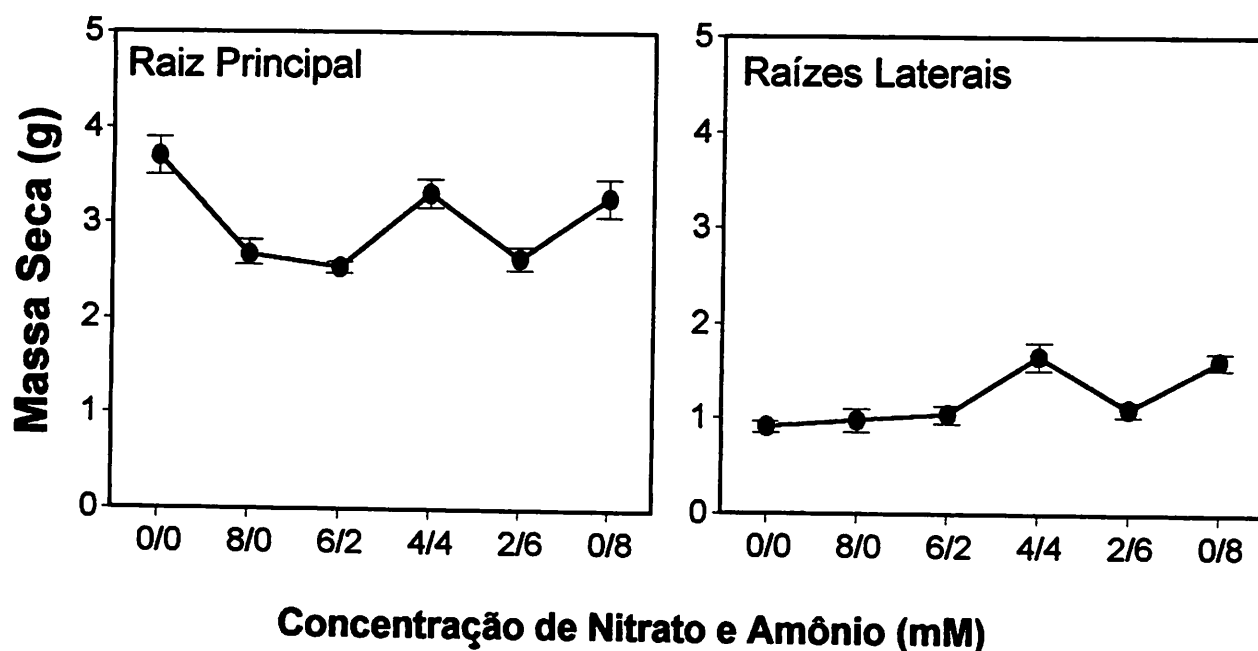


Figura 2 Distribuição de Massa Seca do Sistema Radicular entre Raiz Principal e Raízes Laterais em Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. em Função de Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições).

A adição de amônio como única fonte de nitrogênio e o fornecimento de 4mM/4mM na forma de nitrato e amônio favoreceram mais o crescimento da parte aérea do que o sistema radicular quando comparado com o tratamento só com nitrato (Figura 1D).

O menor acúmulo de massa seca da parte aérea em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo foi observado por Oliveira e Gomide (1985) para *Raphanus sativum* L., Guazelli (1988) para três cultivares de *Phaseolus vulgaris* L.; Delú Filho (1994), para *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. e Pereira (1995) para algumas espécies arbóreas, sugerindo que a limitação no suprimento de nutrientes e água torna as raízes o dreno preferencial por fotoassimilados favorecendo o seu crescimento. Este tipo de comportamento foi verificado também para outros tipos de estresses como mostra Cascardo (1991) para estresse hídrico em *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., Cairo (1992) para estresse hídrico e Pelacani (1993) para estresse gasoso em outras espécies.

Observa-se na Figura 3 que o tratamento sem nitrogênio apresentou drástica redução na área foliar em comparação com os demais tratamentos. À semelhança da massa seca total e massa seca da parte aérea (Figura 1A e 1B) o tratamento constituído exclusivamente com amônio apresentou a maior área foliar em relação ao tratamento que foi fornecido apenas nitrato como forma de nitrogênio. Observa-se ainda na Figura 3 que as plantas se comportaram de maneira semelhante nas outras proporções de nitrato e amônio utilizadas no meio de cultivo.

Comportamento contrário ao da seringueira foi observado por Guazelli (1988) para três cultivares de *P. vulgaris* L.; Adler e Wilcox (1995) para *Cucumis melo* L.; e, Raab e Terry (1994) em estudos com *Beta vulgaris* L. que observaram redução na área foliar quando foi suprido amônio como única forma de nitrogênio.

A altura e o diâmetro das plantas (Figuras 4 e 5 ) aumentaram progressivamente com o decorrer do experimento, com exceção do tratamento sem nitrogênio que teve o crescimento em altura drasticamente afetado a partir do 45º dia de cultivo e o diâmetro a partir do 90º dia. Observa-se, à semelhança da massa seca total, massa seca da parte aérea, sistema radicular e área foliar, maior crescimento em altura e diâmetro ao final do experimento nas plantas do tratamento que receberam só amônio (Figura 6) quando comparado com as plantas do tratamento só com nitrato. O fornecimento de nitrogênio na proporção de 4mM/4mM de nitrato e amônio ao meio de cultivo favoreceu o maior crescimento em diâmetro diferindo das demais proporções

estudadas enquanto que para o crescimento em altura as proporções de nitrato e amônio se comportaram de maneira semelhante.

Na contagem do número de lançamentos foliares e número de folhas por lançamentos realizados ao final do período experimental (resultados não mostrados) verificou-se que o número de lançamentos foliares e o número de folhas por lançamento foi o mesmo nas plantas nos diferentes tratamentos, com exceção para as plantas que não receberam nitrogênio onde o crescimento em altura (Figura 4) paralizou a partir do 45° dia e apresentou 2 lançamentos em média e 3 folhas por lançamentos e para os demais tratamentos 4 lançamentos com 6 folhas em média por lançamento.

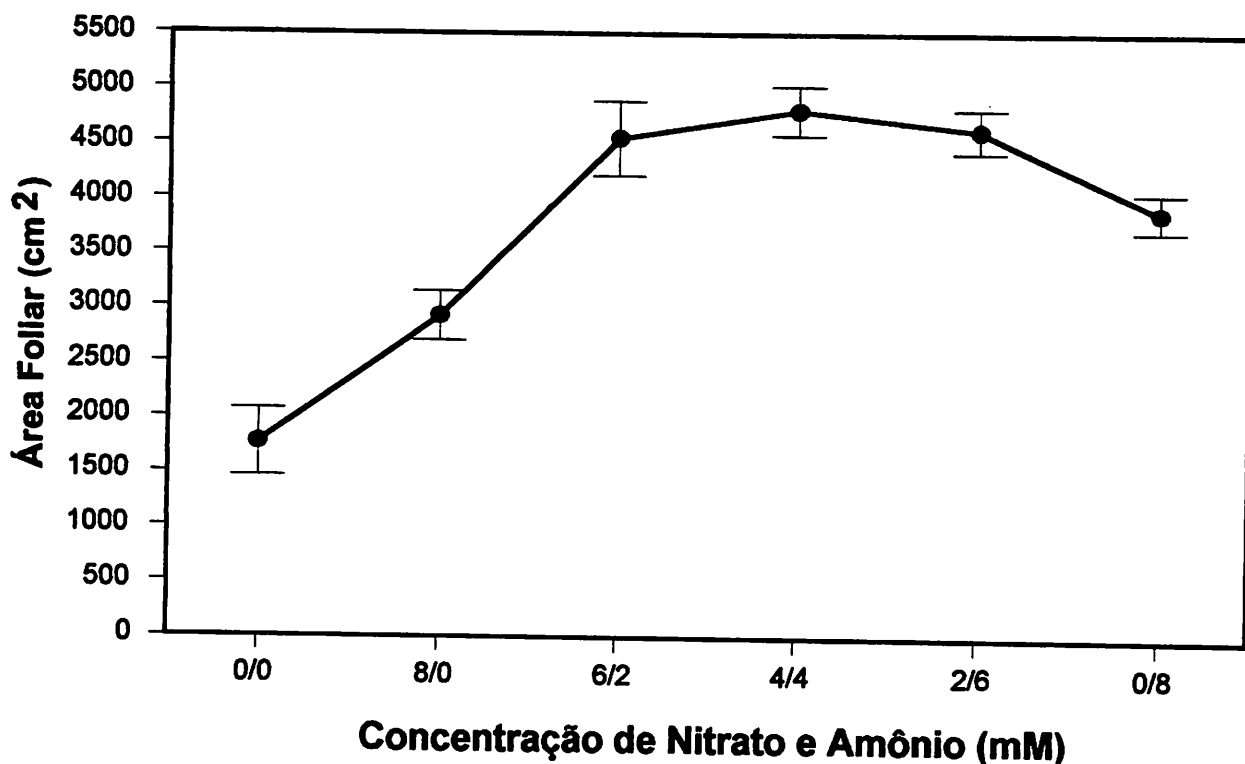
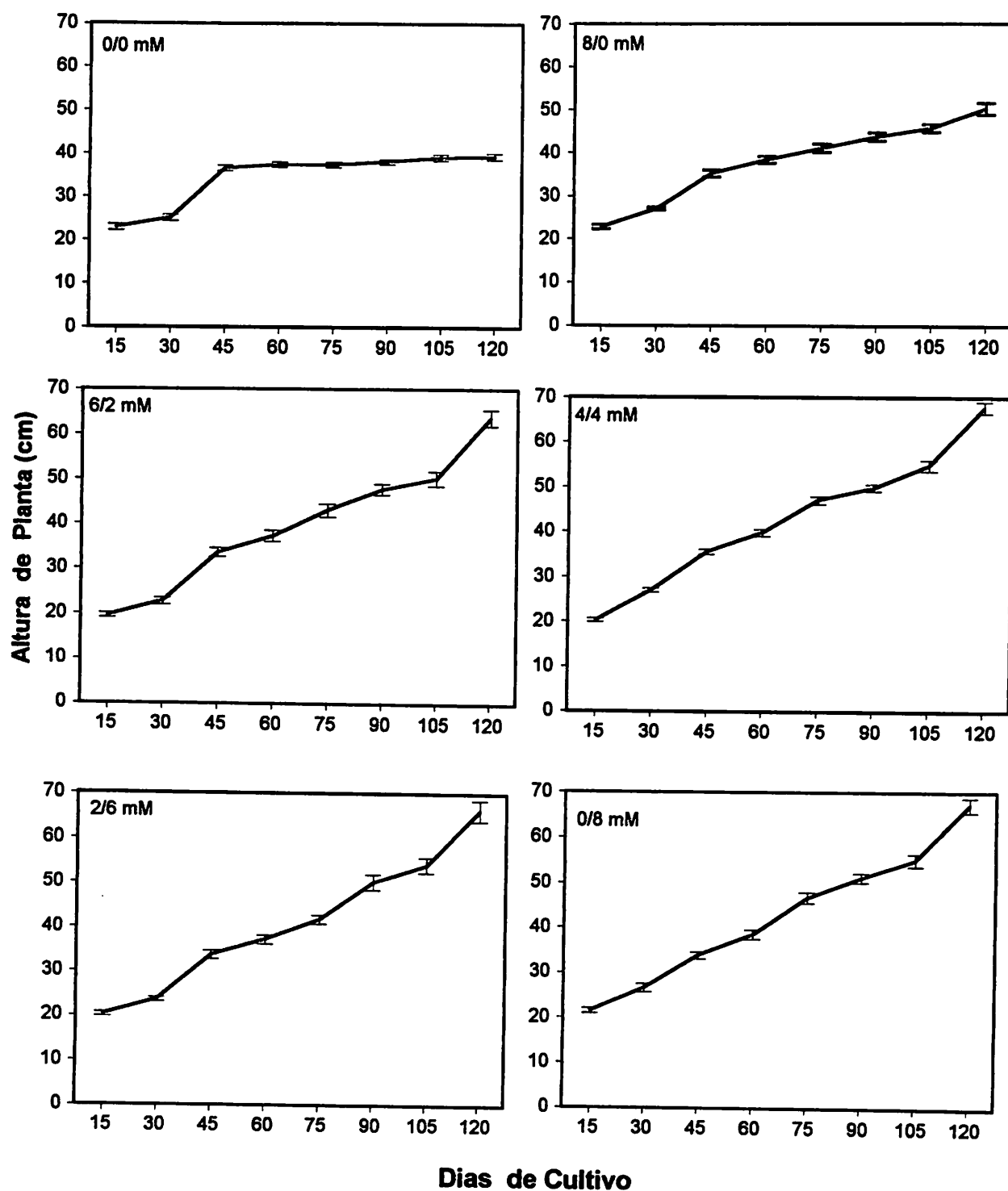


FIGURA 3 Área Foliar de Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Submetidas a Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições)



**FIGURA 4** Crescimento em Altura de Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições).

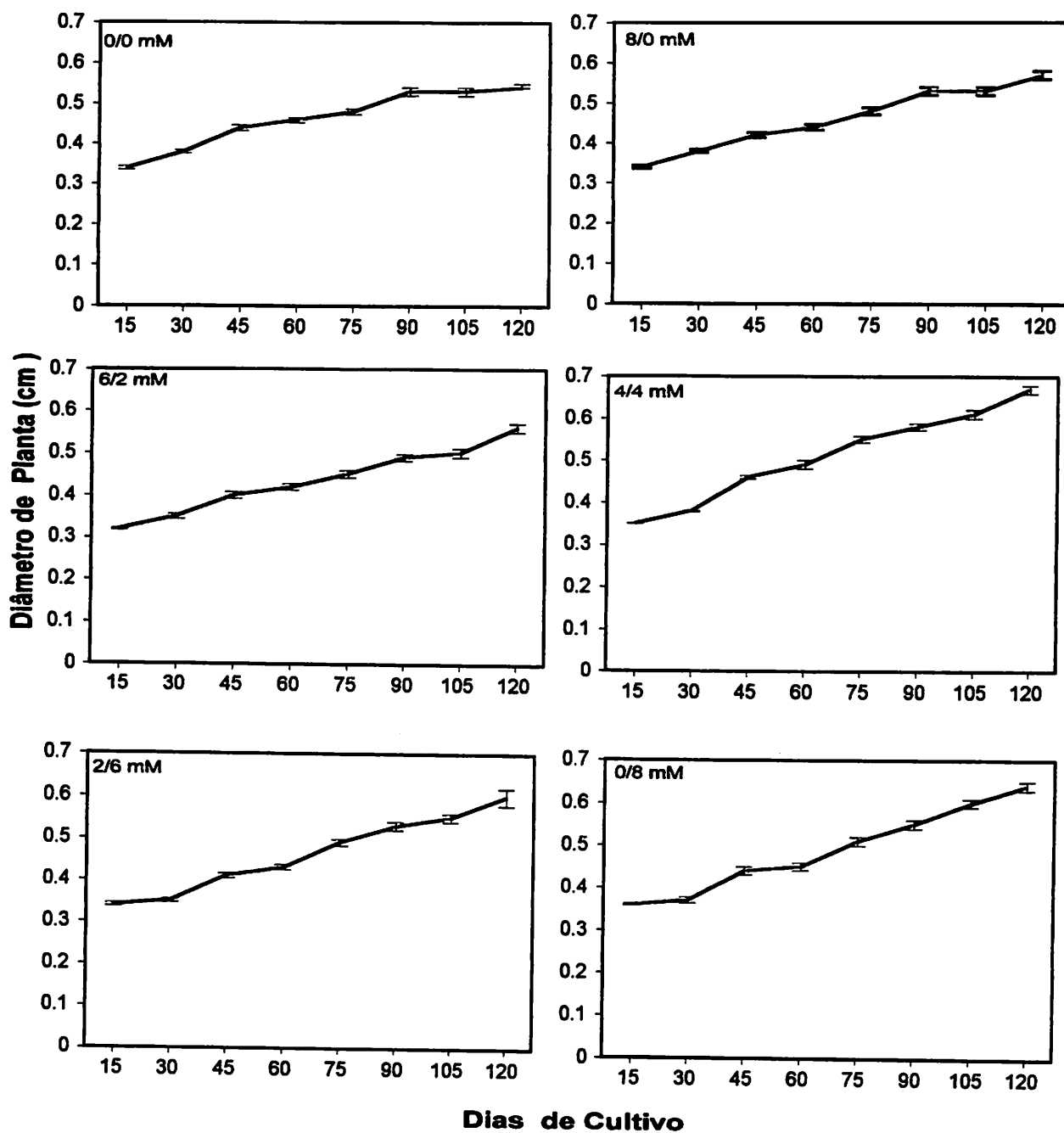
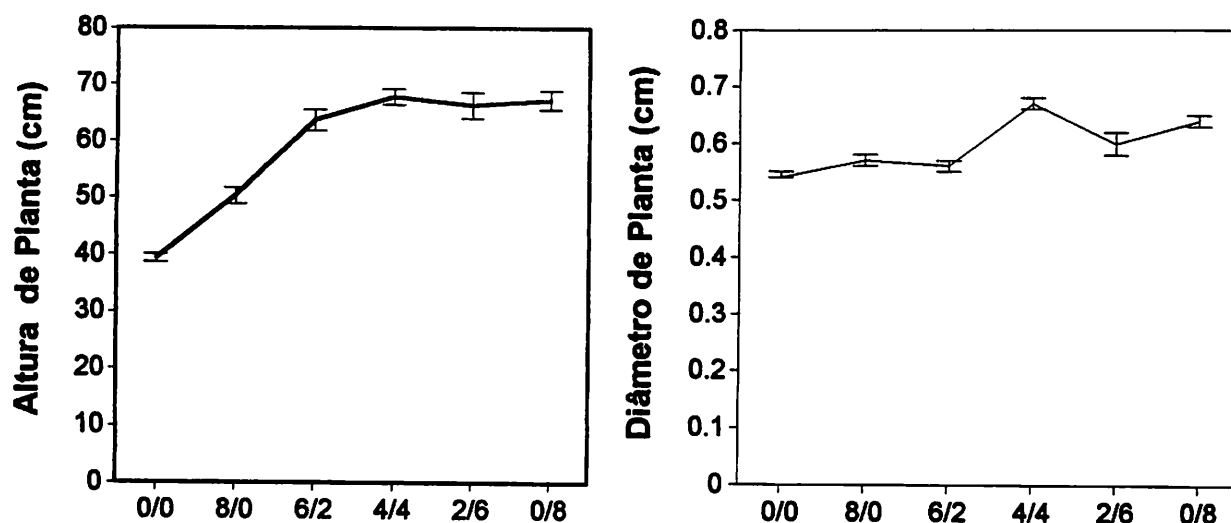


FIGURA 5 Crescimento em Diâmetro de Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média) (Média de cinco repetições)



### Concentração de Nitrato e Amônio (mM)

FIGURA 6 Crescimento em Altura e Diâmetro de Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. no Final do Período Experimental Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média) (Média de cinco repetições)

Verifica-se, assim que, maior crescimento em diâmetro e altura, acúmulo de massa seca total bem como área foliar foi observado nas plantas dos tratamentos que receberam só amônio ou contendo diferentes proporções deste ânion no meio, evidenciando a importância deste no meio de cultivo também para esta espécie. Segundo Blevins (1989) a maioria das espécies arbóreas que estão em ambientes com baixo pH e reduzida nitrificação mostram preferência pelo amônio. Isto parece ocorrer também com a seringueira devido a sua origem, possuindo mecanismos de adaptação a solos ácidos (Haag et al, 1982) e mostra-se tolerante ao alumínio (Souza, 1991). Este mesmo comportamento preferencial por amônio também foi observado por Vale (1982), em *Eucalyptus alba* L., uma espécie também adaptada a solos ácidos.

#### 4.2 pH do Meio de Cultivo, Concentração de Nitrogênio Total e Proteína Total em Plantas de Seringueira.

Analisando a Figura 7, verifica-se uma variação no pH da solução nutritiva nas diferentes proporções de nitrato e amônio estudadas. Em comparação com o pH inicial do meio de cultivo (6,0) não houve alteração no tratamento sem nitrogênio e ocorreu um aumento no pH final (6,5) do meio de cultivo na presença exclusiva de nitrato e decresceu na presença de amônio como única forma de nitrogênio (3,5); permanecendo em torno de 5,0 na presença de ambas as formas de nitrogênio, independente da proporção.

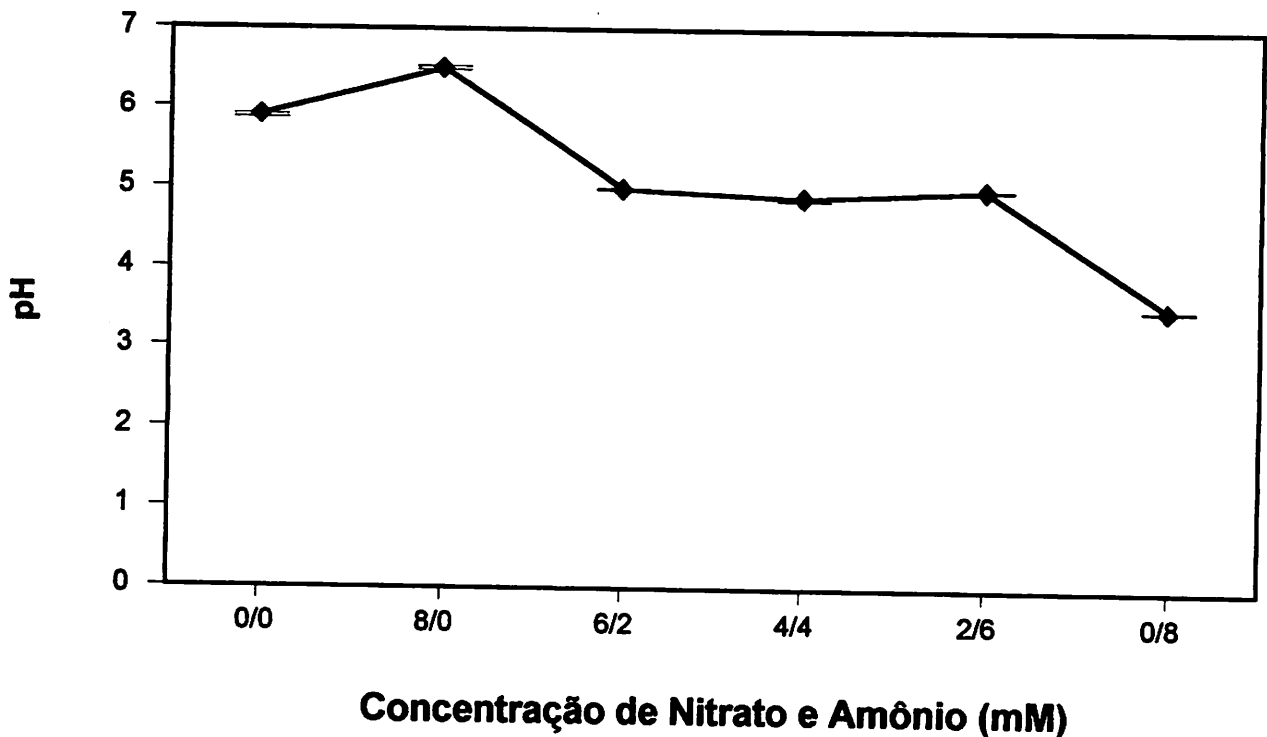


FIGURA 7 pH da Solução Nutritiva dos Vasos Onde Foram Cultivadas as Plantas de *Hevea brasiliensis* Muel. Arg. em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo ao Final do Período Experimental. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições)

Resultados contrários foram encontrados por Delú Filho (1994), trabalhando com seringueira onde encontrou que o fornecimento de nitrato como forma exclusiva de nitrogênio diminuiu o pH do meio de cultivo; este autor atribui este fato a evidências de que o influxo de nitrato está correlacionado com o efluxo de próton na relação  $1 \text{ NO}_3^- : 2\text{H}^+$  e o balanço de cargas sendo mantido pelo  $\text{K}^+$ , parecendo haver neste caso um mecanismo de transporte simporte dos íons. Porém resultados encontrados normalmente na literatura mostram que o fornecimento exclusivo de nitrato aumenta o pH do meio de cultivo (Elsieve e Ulrich, 1977; Andrade et al, 1995a).

Geralmente, a absorção amoniacal requer a extrusão líquida de prótons como mecanismo para regular o pH interno das células reduzindo com isso o pH do meio de cultivo, em geral, a alcalinização do meio de cultivo está associada com a absorção e do nitrato nas plantas (Thibaud e Grignon, 1981) e a aparente estequiometria de 1:1 entre influxo de  $\text{NO}_3^-$  e efluxo de  $\text{OH}^-$  tem sido mencionado como evidência para a alcalinização do meio em relação ao fornecimento exclusivo de nitrato ao meio (Imsande e Touraine 1994).

Observa-se, que a concentração de proteína total (Figura 8) mostrou o mesmo comportamento da concentração de nitrogênio total (Figura 9) apresentando maiores valores nos tratamentos onde ocorreram maiores acúmulos de nitrogênio total tanto para folhas quanto para raízes.

Houve um aumento significativo na concentração de nitrogênio na folha, caule e raiz (Figura 9) quando as plantas receberam nitrogênio e este aumento foi independente da proporção de nitrato e amônio na solução nutritiva. Observa-se no tratamento sem nitrogênio que a redução na concentração de nitrogênio total foi menor nas folhas seguido por raiz e caule indicando que a planta distribui mais nitrogênio inicialmente para folha quando a mesma está em condições de limitação deste nutriente no meio. Verifica-se que a concentração de nitrogênio total da folha apesar de não significativo, apresentou um aumento discreto quando foi fornecido amônio como única fonte de nitrogênio em relação às plantas que receberam só nitrato; no entanto, para o caule e raízes este mesmo comportamento não foi observado. A concentração de nitrogênio total nas folhas das plantas que receberam diferentes

proporções de nitrato e amônio no meio de cultivo foi significativamente maior na proporção 4mM/4mM de nitrato e amônio porém, não diferindo do tratamento que recebeu só amônio no meio de cultivo. Para as raízes a concentração de nitrogênio total foi maior significativamente na proporção de 6mM/2mM de nitrato e amônio diferindo dos demais tratamentos, enquanto que, para o caule não houve diferença significativa para a concentração de nitrogênio total entre as proporções de nitrato e amônio estudadas.

A concentração de nitrogênio total, independente dos tratamentos, foi maior nas folhas seguido pelas raízes e caule. Resultados semelhantes também foram encontrados por Delú Filho (1994), estudando o fornecimento apenas nitrato no meio de cultivo.

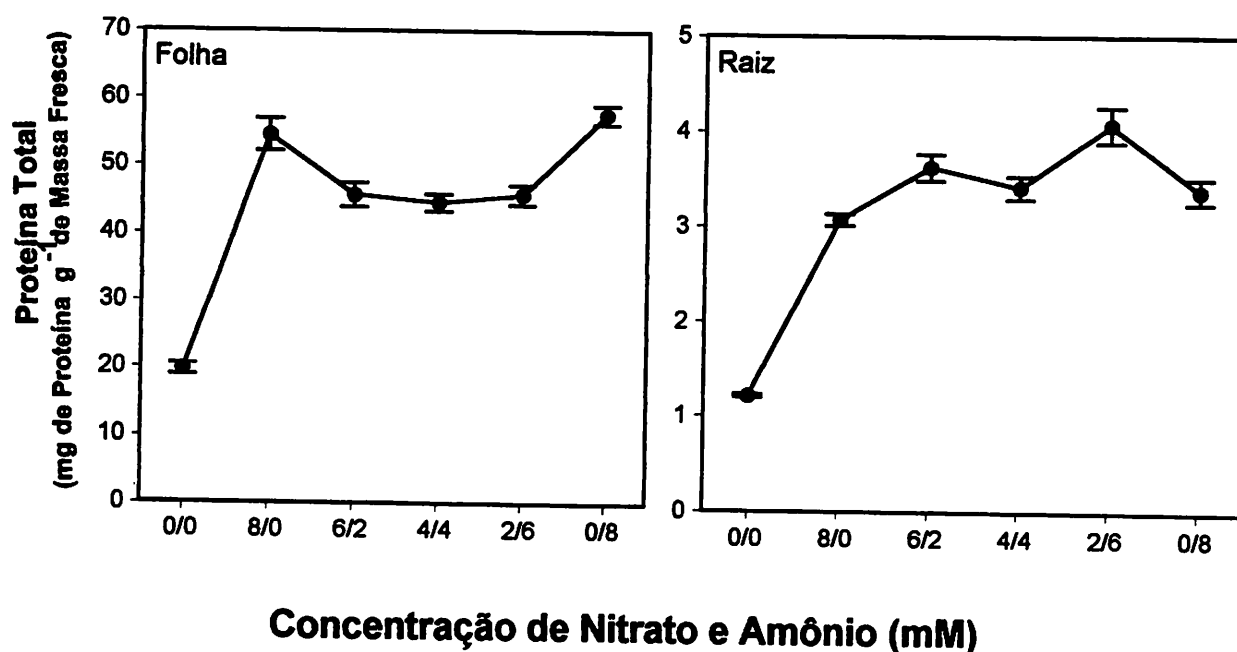


FIGURA 8 Concentração de Proteína Total em Folhas e Raízes em Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. de Cultivadas em Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições)

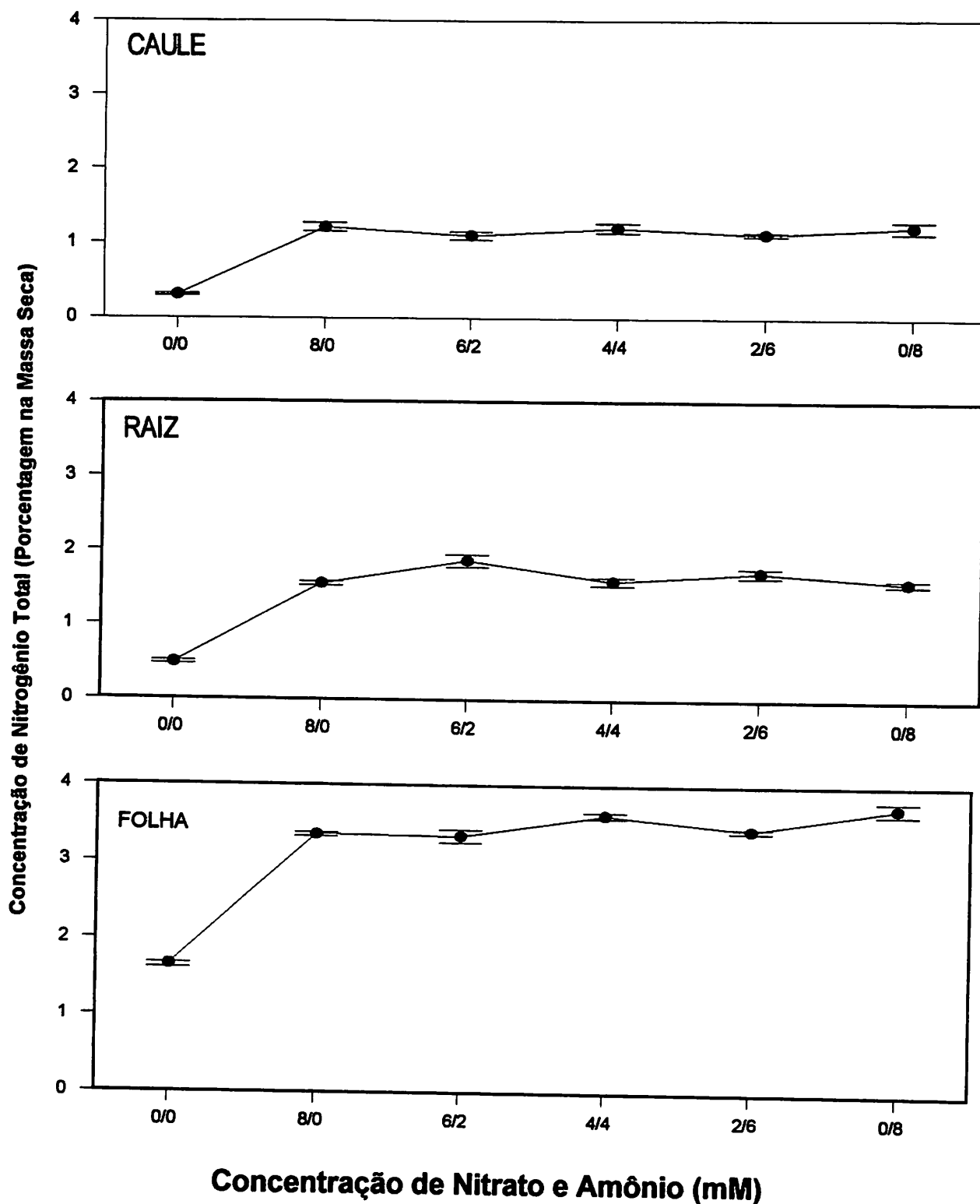


FIGURA 9 Concentração de Nitrogênio Total em Caule, Raiz e Folha de Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Submetidas a Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média) (Média de cinco repetições)

Observando a quantidade de nitrogênio total nas plantas (Tabela 2) nota-se que praticamente todo o nitrogênio contido na semente foi remobilizado para as plantas de seringueira, isto porque a quantidade de nitrogênio acumulado na planta no tratamento 0mM/0mM de nitrato e amônio no meio de cultivo durante o período experimental foi semelhante a quantidade de nitrogênio contida na semente inicialmente. Estes valores foram menores do que aqueles encontrados por Delú Filho (1994), em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., isto pode ser atribuído a diferença de idade das plantas utilizadas neste experimento (120 dias) comparada àquele (210 dias) ou também devido a contaminação por bactérias diazotróficas naquele experimento, o que aparentemente não ocorreu neste.

Observações visuais mostram que as plantas que não receberam nitrogênio ou que receberam exclusivamente na forma nítrica apresentaram folhas estreitas e coloração verde-clara, enquanto que as plantas que receberam nitrogênio nas proporções de 2mM/6mM, 4mM/4mM, 2mM/6mM e 0mM/8mM de nitrato e amônio apresentaram as folhas maiores e de um verde mais escuro. No entanto, as concentrações de nitrogênio total encontradas nas folhas das plantas que receberam nitrogênio estão dentro do nível ideal para cultura da seringueira de acordo com Shorrocks (1965); Haag et al (1982) e Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), indicando que este amarelecimento das folhas não foi devido a sintoma de deficiência

**TABELA 2** Acúmulo de Nitrogênio em Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. em Função de Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo.

Proporção de Nitrato e Amônio (mM)	Fontes de Nitrogênio*		Total (mg)	Nitrogênio Acumulado nas Plantas (mg/planta)**
	Semente (g/semente)	Solução Nutritiva (mg de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )		
0/0	106	—	106	105 b
8/0	106	1680/0	1786	408 a
6/2	106	1260/420	1786	525 a
4/4	106	840/840	1786	660 a
2/6	106	420/1260	1786	537 a
0/8	106	0/1680	1786	642 a

\* Quantidade de nitrato e amônio fornecida durante todo o período experimental.

\*\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

#### 4.3 Atividade Radicular da Redutase do Nitrato (RN; E.C. 1.6.6.2)

Observa-se na Figura 10 que a atividade radicular da redutase do nitrato (RN) foi significativa nas plantas que receberam nitrato como única forma de nitrogênio, decrescendo abruptamente no tratamento 6mM/2mM de nitrato e amônio e progressivamente nas plantas com a redução no fornecimento de nitrato e/ou aumento no fornecimento de amônio no meio de cultivo. Essa redução na atividade da RN pode ser devido ao acúmulo de amônio nas raízes ou de outros compostos nitrogenados (Redinbaugh e Campbell, 1991) como, por exemplo a glutamina que pode inibir a síntese ou atividade desta enzima (Lewis, James e Hewitt, 1982). Ohlson e Högbom

(1993), Caba, Liuch e Ligeró (1995) entre outros, afirmam que a síntese e atividade da RN são induzidas pela presença de nitrato no meio e por sua concentração no citossol.

Analisando conjuntamente os resultados da Figura 1A e Figura 10, observa-se que não existe uma relação definida entre acúmulo da massa seca total e atividade da RN. Segundo Magalhães e Huber (1974); Crawford e Arst (1993), a assimilação do nitrato via RN em plantas superiores nem sempre está direta e positivamente relacionada com o crescimento e acúmulo de massa seca pois, a partir da absorção do amônio todas as formas orgânicas de nitrogênio podem ser elaboradas.

Comparando as atividades da RN desta espécie obtidas neste trabalho e por Delú Filho (1994), com outras lenhosas (Meguro e Magalhães, 1982; Pelacani, 1993; Cairo, 1994), verifica-se que a seringueira apresenta atividade enzimática da RN muito baixa. Stewart, Pate e Unkovich (1993), afirmam que as espécies herbáceas geralmente tem maior atividade da enzima RN que as lenhosas. Isto devido ao lento crescimento das espécies arbóreas em relação as espécies herbáceas onde estas últimas apresentam uma maior exigência por nutrientes e fotoassimilados para o seu crescimento e acúmulo de massa seca.

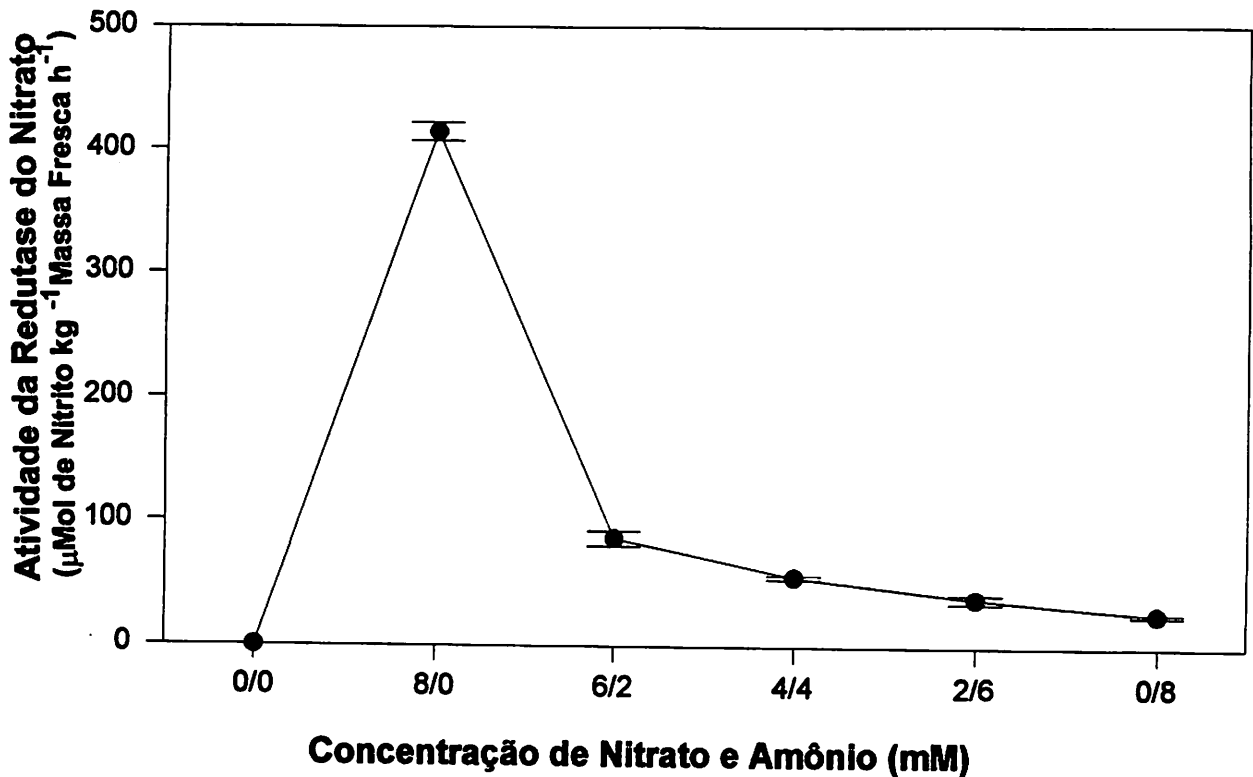


FIGURA 10 Atividade Radicular da Redutase do Nitrato em Plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Cultivadas em Diferentes Proporções Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média) (Média de cinco repetições)

#### 4.4 Atividade da Glutamina Sintetase (GS; E.C. 6.3.1.2)

Analisando-se a Figura 11 observa-se que a atividade da GS foi maior nas lâminas foliares do que nas raízes. Observa-se que no tratamento sem nitrogênio a atividade da GS foi muito baixa nas lâminas foliares e não foi detectada nas raízes em relação aos demais tratamentos. No entanto, quando foi adicionado somente nitrato ao meio de cultivo ocorreu um aumento expressivo na atividade tanto nas folhas quanto nas raízes, decrescendo drasticamente nas raízes à medida que se acrescentou amônio ao meio de cultivo, enquanto que nas lâminas foliares esse decréscimo ocorreu no tratamento 6mM/2mM de nitrato e amônio no meio de cultivo em relação ao

tratamento só com nitrato porém a partir daí aumentou progressivamente a atividade da GS com a adição de amônio ao meio. Essa queda na atividade da GS pode ser devido ao aparecimento diferencial de isoformas, sendo que aquela responsável pela assimilação do amônio produzido via RN é altamente inibida sua síntese e/ou sua atividade quando o amônio mineral é fornecido. Porém, na proporção 6mM/2mM de nitrato e amônio, a quantidade de amônio não é suficiente para uma forte indução da isoforma responsável pela assimilação do amônio mineral, o que se verifica nas demais proporções onde se tem maior concentração de amônio.

Analisando-se a atividade da GS nas lâminas foliares e raízes (Figura 11) com a atividade da RN (Figura 10) verifica-se comportamento muito semelhante, apesar de uma discreta e gradativa ativação da GS a partir do tratamento 4mM/4mM de nitrato e amônio embora não significativa. Isto sugere que a GS radicular parece ser altamente dependente do amônio produzido nas raízes após a assimilação pela RN, o mesmo não ocorrendo nas lâminas foliares, pois neste sítio os altos valores de atividade da GS sugerem que outras fontes de amônio, além daquele transportado via corrente transpiratória estão sendo utilizados como, por exemplo, o amônio liberado durante a fotorespiração (Wallsgrave et al, 1983) e outras reações que liberam amônio como o metabolismo da asparagina através da ação da asparaginase (Lea, Robinson e Stewart, 1990).

#### 4.2.3 Atividade Glutamato Sintase Dependente do NADH (NADH-GOGAT; E.C.1.4.1.14) e Dependente da Ferredoxina (Fd-GOGAT; E.C. 1.4.1.7)

A Figura 11 mostra que a adição de nitrogênio no meio de cultivo elevou acentuadamente a atividade da GOGAT tanto nas lâminas foliares como nas raízes.

Nas raízes, a adição gradativa de amônio com a concomitante redução do nitrato aumentou progressivamente a atividade da NADH-GOGAT até as concentrações de 2mM/6mM de nitrato e amônio estabilizando-se no tratamento só com amônio, enquanto que a Fd-GOGAT apresentou uma tendência de mesmo comportamento da GS na folha (Figura 11).

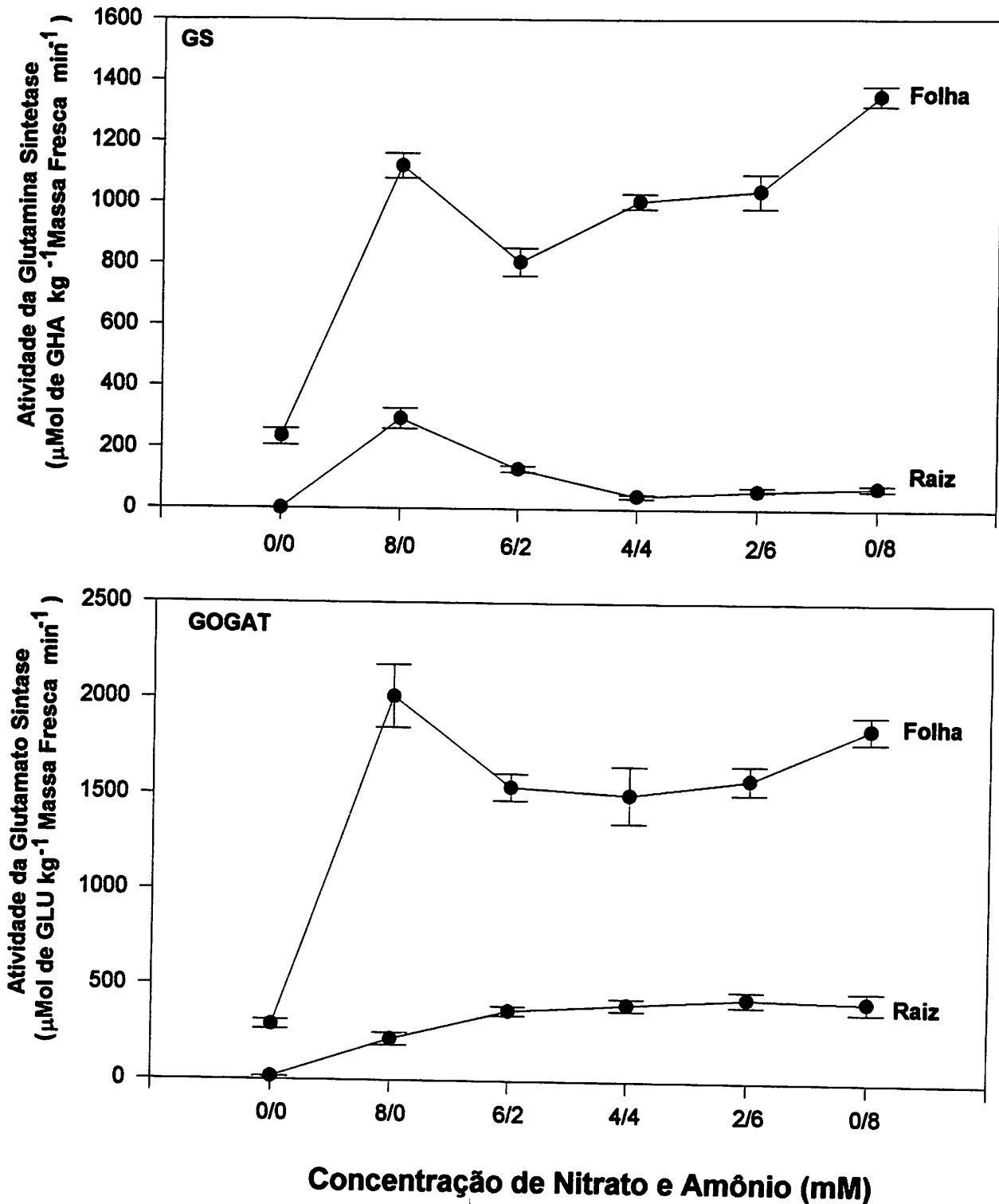


FIGURA 11 Atividade da GS e GOGAT nas Lâminas Foliaves e Raízes de plantas Jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. em Função de Diferentes Proporções de Nitrato e Amônio no Meio de Cultivo. (As barras representam o erro padrão da média). (Média de cinco repetições)

Analisando-se o comportamento das enzimas GS/GOGAT nas folhas nota-se que esta via está operando conjuntamente, com a GS fornecendo substrato para a Fd-GOGAT. Entretanto, parece que o mesmo não ocorre nas raízes pois a atividade da GS decresce à medida que a atividade da NADH-GOGAT aumenta, ambas acentuadamente. Estes resultados sugerem que as raízes devem receber, de alguma forma, glutamina da parte aérea para justificar a atividade da NADH-GOGAT nas raízes com baixas atividades da GS.

Apesar da não quantificação da atividade da enzima Glutamato Desidrogenase (GDH) neste experimento, pode-se inferir que possivelmente houve uma ativação desta enzima nas raízes, pois em altas concentrações de amônio a GDH pode funcionar preferencialmente em relação a GS evitando o acúmulo de amônio naquele tecido produzindo glutamato que, poderia ser translocado para outras partes da planta.

Por outro lado, os resultados da Figura 11 mostram ainda que as atividades das enzimas GS/GOGAT foram maiores nas lâminas foliares do que nas raízes. Estes resultados confirmam os obtidos em um trabalho anterior por Delú Filho (1994), estudando o efeito do fornecimento só de nitrato em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. sobre as enzimas de assimilação do nitrogênio. Este autor observou que a redução do nitrato ocorreu exclusivamente no sistema radicular, já que não se conseguiu detectar atividade da RN na parte aérea e, por outro lado, a atividade das enzimas de assimilação do amônio mostraram atividade significativamente maiores nos tecidos foliares, inclusive não sendo detectada presença de GS nas raízes, indicando que as folhas foram os principais sítios de incorporação do amônio em aminoácidos. Este mesmo autor sugeriu que esta espécie possui mecanismos para transportar o nitrogênio reduzido nas raízes até o xilema foliar antes de sua incorporação em aminoácidos. Trabalhos posteriores se tornam necessários com o objetivo de esclarecer estes mecanismos.

O fato de plantas jovens de seringueira apresentarem maior capacidade de assimilação de amônio nas folhas pode representar uma vantagem, pois o amônio produzido durante o processo fotorespiratório pode ser reassimilado, reduzindo com isso as perdas por volatilização para o meio (Faquhar et al 1980), isto parece justificar

o maior acúmulo de massa seca (Figura 1) em resposta a adição de amônio no meio, pois observa-se que apesar da seringueira responder positivamente ao fornecimento de nitrato no acúmulo de massa seca, estas respostas foram mais significativas quando se adicionou amônio ao meio de cultivo.

## 5 CONCLUSÕES

O fornecimento de nitrogênio ao meio de cultivo, favoreceu mais o crescimento em altura e diâmetro do caule, acúmulo e distribuição de fitomassa nas plantas que receberam apenas amônio ou na proporção de 4mM/4mM de nitrato e amônio em comparação com as plantas que receberam só nitrato no meio de cultivo. A atividade radicular da RN foi maior no tratamento só com ~~nitrato~~, decrescendo abruptamente no tratamento 6mM/2mM de nitrato e amônio e gradualmente com a diminuição do fornecimento de nitrato ao meio de cultivo. A GS nas raízes apresentou comportamento muito semelhante a RN, sugerindo que nas raízes a GS é altamente dependente do amônio produzido via assimilação da RN. Na folha a atividade da GS decresceu no tratamento 6mM/2mM de nitrato e amônio, aumentando progressivamente com a adição de amônio no meio de cultivo. Os altos valores da atividade da GS na folha sugerem que outras fontes de amônio, além do fornecido pela corrente transpiratória estão sendo utilizados. A atividade da GOGAT nas raízes aumentou com a adição gradativa de amônio no meio de cultivo, sendo que nas folhas apresentou o mesmo comportamento da GS. As atividades das enzimas GS/GOGAT na folha parece operar conjuntamente, com a GS fornecendo substrato para a Fd-GOGAT, enquanto que nas raízes os altos valores de atividade da NADH-GOGAT com baixa atividade da GS, sugerem que a glutamina está sendo transportada de outras partes da planta para manter a alta atividade desta enzima nas raízes.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNES, H.; ERIKSEN, A.B.; SOUTHON, T.E. Metabolism of nitrate and ammonium in seedlings of norway spruce (*Picea abies*) measured by in vivo  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.94, n.3, p.384-390, July, 1995
- ADAMS, M.A.; ATTIWILL, P.M. Nitrate reductase activity and growth response of forest species to ammonium and nitrate sources of nitrogen. *Plant and Soil*, Netherlands, v.66, n.3, p.373-381, Dec., 1982
- ADLER, P.R.; WILCOX, G.E. Ammonium increases the net rate of sodium influx and partitioning to the leaf of muskmelon. *Journal of Plant Nutrition*, New York, v.18, n.9, p.1951-1962, Sept., 1995
- AMANCIO, S.; SANTOS, H. Nitrate and ammonium assimilation by roots of maize (*Zea mays* L) seedlings as investigated by in vivo  $^{15}\text{N}$ -NMR. *Journal of Experimental Botany*, London, v.43, n.250, p.633-639, May, 1992
- ANDRADE, S.R.M.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; CAMBRAIA, J. Adaptações das plantas da capim colônia às proporções de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ . I- Variações no pH das soluções nutritivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, Lavras, 1995. *Resumos...* Lavras, Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1995a, p.238
- ANDRADE, S.R.M.; SANT'ANNA, R.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; Adaptações das plantas da capim colônia às proporções de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ . II- Efeito sobre a concentração de N-Total, nitrogênio solúvel total e de suas frações nitrogenadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, Lavras, 1995. *Resumos...* Lavras, Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1995b, p.239

- ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant and Cell Environment**, Oxford, v.9, n.5, p.511-519, May, 1986
- ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C. Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. **Plant Physiology**, Washington, v.75, n.3, p.623-628, July, 1984
- ASLAM, M.; OAKS, A. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. **Plant Physiology**, Washington, v.57, n.4, p.572-576, April, 1976
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.20, p.495-522, 1969
- BENICASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas (Noções Básicas)**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BLEVINS, D.G. An overview of nitrogen metabolism in higher plants. In: POULTON, J.E.; ROMEO, J.T.; CONN, E.E. eds. **Plant Nitrogen Metabolism**. New York, Plenum Press: 1989. 234-256p.
- BOWEN G.D.; NAMBIAR, E.K.S. Future directions in plantation nutrition research. In: BOWEN, G.D.; NAMBIAR, E..K.S. (eds.) **Nutrition of plant forest**. London: Academic Press, 1989. p.489-504
- BRETELER, H.; SIEGERIST, M. Effect of ammonium on nitrate utilization by roots of dwarf bean. **Plant Physiology**, Washington, v.75, n.4, p.1099-1103, Aug., 1984
- BUSTAMANTE, M.M.C.; SILVA, L.F.; CORNELIO, I.N.; KOZOVITS, A.R.; CALDAS, L.S. Atividade da redutase do nitrato em plântulas de *Pterodon polygalaeflorus* Benth. e *Dalbergia miscolobium* Benth. crescendo in vitro com diferentes concentrações de nitrato e amônio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5, Lavras, 1995. **Resumos...** Lavras, Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 1995, p.214
- CABA, J.M.; LIUCH, C.; LIGERO, F. Distribution of nitrate reductase activity in *Vicia faba*: Effects of nitrate and plant genotype. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, n.4, p.667-672, April, 1995

- CAIRO, P.A.R. **Aspectos biofísicos e metabólicos de plantas jovens de espécies florestais associados à disponibilidade de água no solo.** Lavras: ESAL, 1992. 124p. (Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- CASCARDO, J.C.M. **Comportamento biofísico, nutricional e metabólico de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) em função da aplicação de gesso e da disponibilidade de água no solo.** Lavras: ESAL, 1991. 135p. (Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- CHAILLOU, S.; VESSEY, J.K.; MOROT-GAUDRY, J.F.; RAPER Jr, C.D.; HENRY, L.T.; BOUTIN, J.P. Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. **Journal of Experimental Botany**, London, v.42, n.235, p.189-196, Feb., 1991
- COSTA, E.M. **Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a nutrição nitrogenada em *Eucalyptus grandis* Hill (Maiden).** Viçosa: UFV, 1986, 50p.
- CRAWFORD, N.M.; ARST Jr., H.N. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.115-146, 1993
- CRIDDLE, R.S.; WARD, M.R.; HUFFAKER, R.C. Nitrogen uptake by wheat seedlings, interactive effects of four nitrogen sources:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and urea. **Plant Physiology**, Washington, v.86, n.1, p.166-175, Jan., 1988
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E.; HAGEMAN, R.H.. Intracellular location of nitrate reductase. II Wheat roots. **Biochemical Biophysical Acta**, New York, v.283, p.513-519, 1972
- 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: UFLA, 1994. 87p. (Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- ELSIEVE, R.; ULRICH, W.R.; Effect of glucose and  $\text{CO}_2$  on nitrate and coupled  $\text{OH}^-$  influx in *Ankiostrodesmus braunii*. **Plant Physiology**, Washington, v.59, n.1, p.18-21, Jan., 1977

- FARQUHAR, G.D.; FIRTH, P.M.; WEELAAR, R.; WEIR, B. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment - determination on the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, Washington, v.66, n.4, p.710-714, Oct., 1980
- FREDEEN, A.L.; FIELD, C.B.; Ammonium and nitrate uptake in gap, generalist and understory species of the genus *Piper*. **Oecologia**, New York, v.92, n.1, p.207-214, Jan., 1992
- GASHAW, L.; MUGWIRA, L.M. Ammonium-N and nitrate-N effects on the growth and mineral compositions of triticale, wheat and rye. **Agronomy Journal**, Madison, v.73, n.1, p.47-51, Jan., 1981
- GLASSCOCK, J.; SHAVIN, A.; HAGIN, J. Nitrification inhibitors - Interactions with applied ammonium concentration. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, n.1, p.105-116, Jan., 1995.
- GOYAL, S.S.; LORENZ, O.A.; HUFFAKER, R.C. Inhibitory effects of ammoniacal nitrogen on growth of radish plants. I. Characterization of toxic effects of  $\text{NH}_4^+$  on growth and its alleviation by  $\text{NO}_3^-$ . **Journal of the American Society for Agricultural Science**, Mount, v.107, n.1, p.125-129, Jan., 1982
- GREWOOD, D.J.; GASTAL, F.; LEMAIRE, G.; DRAYCOTT, A.; MILLARD, P.; NEETESON, J.J. Growth rate and % N of field grown crops: theory and experiments. **Annals of Botany**, New York, v.67, n.2, p.181-190, Feb., 1991
- GUAZELLI, 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: ESAI, 1988, 112p. (Tese de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)
- HAAG, H.P.; DECHEN, A.R.; SARRUGE, J.R.; GUERRINI, I.A.; WEBER, H.; TENÓRIO, Z. **Nutrição Mineral da Seringueira - Marcha de absorção de nutrientes**. Fundação Cargill, 1982. 86p.: il.
- HARTMAN, P.L.; MILLS, H.A.; JONES, J.B. Jr. The influence of nitrate:ammonium ratios on growth, fruit development, and element concentration in "Floradel" tomato plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount, v.111, n.10, p.487-490, 1986

- HAYNES, R.J. Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In: HAYNES, R.J., ed. **Mineral nitrogen in the plant-soil**. Madison: Academic Press, 1986. p.303-378
- HEBERER, J.A.; BELOW, F.E. Mixed nitrogen nutrition and productivity of wheat grown in hydroponics. **Annals of Botany**, Ottawa, v.63, n.6, p.643-649, June, 1989
- HECHT, U.; OELMÜLLER, S.; SCHIMDT, S.; MOHR, H. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin- dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. **Planta**, New York, v.175, n.1, p.130-138, Jan., 1988
- HIREL, B.; GADAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. **Plant Physiology**, Washington, v.66, n.4, p.619-623, Oct., 1980
- HOEZLE, I.; FINER, J.J.; McMULLEN, M.D.; STREETER, J.G. Induction of glutamine synthetase activity in non nodulated roots of *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, New York, v.100, n.1, p.525-528, Sept., 1992
- HUBER, D.M.; WARREN, H.L.; TSAI, C.Y. Nitrification inhibitors, new tools for food production. **Bioscience**, Washington, v.27, n.1, p. 87-93, Jan., 1977
- HUETT, D.O.; DETTMANN, E.B. Effect of nitrogen on growth, fruit quality and nutrient uptake of tomatoes grown in sand culture. **Australian Journal Experimental Agriculture**, Sydney, v.28, p.391-399, 1988
- HUETT, D.O. Response to nitrogen and potassium of tomatoes grown in sand culture. **Australian Journal Experimental Agriculture**, Sydney, v.26, p.133-138, 1986
- HUNGRIA, M.; EASGLESHAM, A.R.J.; HARDY, R.W.F. Physiological comparisons of root and stem nodules of *Aeschynomene scabra* and *Sesbania rostrata*. **Plant and Soil**, Netherlands, v.139, n.1, p.7-13, Jan., 1992
- 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**. Palo Alto, v.45, p.577-507, 1994

- IMSANDE, J.; TOURAINE, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Plant Physiology**, Washington, v.105, n.1, p.3-7, Jan., 1994
- JACKSON, W.A.; KWIK, K.D.; VOLK, R.J. Nitrate uptake during recovery from nitrogen deficiency. **Plant Physiology**, Washington, v.36, n.1., p.174-181, Jan., 1976
- JOY, K.W. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, n.10, p.2103-2109, Oct., 1988
- 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, Jan., 1990
- LEWIS, O.A.M.; JAMES, D.M.; HEWITT, E.J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurca) in response to nitrate and ammonium nutrition. **Annals of Botany**, New York, v.49, n.1, p.39-49, Jan., 1982
- LOWRY, O.N.; NIRA, J.; ROSEMBROUGH, A.; EARL, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.267-275, 1951
- 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**, New York, v.196, n.2, Feb., 1995
- MÄCK, G.; TISCHNER, R. Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Planta**, New York, v.181, n.1, p.10-17, Jan., 1990
- MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M. Nitrite assimilation and amino nitrogen synthesis in isolated spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, Washington, v.53, n.3, p.411-415, Mar., 1974
- MAGALHÃES, J.R.; HUBER, D.M.; TSAI, C.Y. Influence of the form of nitrogen on ammonium, amino acids and N-assimilating enzyme activity in maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, n.4, p.747-763, April, 1995

- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de **Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípios e Aplicações**. São Paulo: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.
- MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C.N. Atividade da redutase do nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.12, p.1725-1731, Dez., 1982
- MEYEHOFF, P.A.; FOX, T.C.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. Characterization of the association of nitrate reductase with barley (*Hordeum vulgare* L.) root membranes. **Plant Physiology**, Washington, v.104, n.3, p.925-936, Mar., 1994
- MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.299-329, 1977
- MIFLIN, B.J.; WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J. Glutamine metabolism in higher plants **Current Topics Cellular Regulation**, v.20, n.1, p.1-43, Jan., 1981
- MILLER, S.L.; ALLEN, E.B. Mycorrhizae, nutrient translocation, and interations between plants. In: ALLEN, M.J., ed. **Mycorrhizal functioning: an integrative plant fungal process**, New York: Chapman and Hall, 1992. 515p.
- MÜLLER, R.; STEIGNER, W.; GIMMLER, H.; KAISER, W.M. Effect of ammonium on dark-CO<sub>2</sub> fixation and on cytosolic and vacuolar pH values in *Eremosphaera viridis* de Bary (Chlorococcales). **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.225, p.441-448, April, 1990
- NAMBIAR, E.K.S. Plantation forests: their scope and perspective on plantation nutrition. In: BOWER, G.D.; NAMBIAR, E.K.S. (ed.) **Nutrition of plantation forest**. London: Academic Press, 1989, p.1-15.
- OAKS, A. Nitrogen assimilation in roots: a re-evaluation. **Bioscience**, Washigton, v.142, n.1, p.103-111, Jan., 1992
- OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.345-365, 1985

- ÖHLSON, M.; HÖGBOM, L. Species-specific dynamics in nitrate reductase activity in coexisting swamp forest plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v.81, n.4 p.739-744, April, 1993
- OLIVEIRA, L.E.M.; GOMIDE, M.B. Efeito do nitrogênio no particionamento de matéria seca em plantas de rabanete (*Raphanus sativus* L.). In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2, Piracicaba: Editora Pedagógica e Universitária, 1989. **Anais...** Piracicaba, 1989. p.263
- PATE, T.S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant of Physiology**, Palo Alto, v.31, p.313-340, 1980
- PELACANI, C.R. **Estratégia de sobrevivência de espécies herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à condições de inundação do sistema radicular**. Lavras: ESAL, 1993. 110p. (Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- PEREIRA, E.G. **Micorrização e fósforo no solo na resposta de espécies arbóreas a nitrogênio mineral**. Lavras: UFLA, 1995. 65p. (Dissertação de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- RAAB, T.K.; TERRY, N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. **Plant Physiology**, Washington, v.105, n.4, p.1159-1166, Aug., 1994
- RAJASEKHAR, V.K.; MOHR, H. Effects of ammonium and nitrate on growth and appearance of nitrate reductase in dark-and light-grown mustard seedlings. **Planta**, New York, v.169, n.4, p.594-599, Dec., 1986
- RATAJACZAK, L.; RATAJACZAK, W.; MAZUROWA, H. The effects of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.51, n.1, p.277-280, May, 1981
- REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W.H. Higher plant response to environmental nitrate.. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, n.4, p.640-650, Aug., 1991

- RUFTY, T.W.; MacKOWMN, C.T.; VOLK, R.J. Effects of altered carbohydrate availability on whole-plant assimilation of  $^{15}\text{N}$ . **Plant Physiology**, Washington, v.89, n.3, p.457-463, Mar., 1989
- RYAN, P.R.; WALKER, N.A. The regulation of ammonia uptake in *Chara australis*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 45, n.277, p.1057-1087, Aug., 1994
- 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 glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissue. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.33, n.1, p.49-58, Jan., 1992
- SALSAC, L.; CHAILLOU, S.; MOROT-GAUDRY, J-F.; LESAIN, C.; JOLIVET, E. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology Biochemistry**, London, v.25, n.4, p.805-812, April, 1987
- SAMUELSON, M.E.; ÖHLÉN, E.; LIND, M.; LARSSON, C.-M. Nitrate regulation of nitrate uptake and nitrate reductase expression in barley grown at different nitrate:ammonium ratios at constant relative nitrogen addition rate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.94, n.2, p.254-260, June, 1995
- SANCHES, P.A. SALINAS, J.G. Low input technology for managing oxisol and ultisols in tropical America. **Advances in Agronomy**, New York, v.34, p.279-406, 1981
- SANDOVAL-VILLA, M.; ALCANTARA-GONZALEZ, G.; TIRADO-TORRES, J.L. Use of ammonium in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, n.7, p.1449-1457, July, 1995
- SANTOS, I.; SALEMA, R. Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. **Plant Science**, Limerick, v.84, n.2, p.145-152, Feb., 1992
- SCHERER, H.W.; MacKOWN, T. Dry matter accumulation, uptake and chemical composition of tobacco grown with different N source at two levels of K. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.10, n.1, p.10-14, Jan., 1987

- SCHIMDT, S.; MOHR, H. Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. **Planta**, New York, v.177, n.2, p.526-534, Feb., 1989
- SCHUSTER, C.; OELMÜLLER, R.; BERGFELD, R.; MOHR, H. Recovery of plastids from photooxidative damage: Significance of a plastidic factor. **Planta**, New York, v.174, n.3, p.289-297, June, 1988
- SCHUSTER, C.; SCHIMDT, S.; MOHR, H. Effect of nitrate, ammonium, light and a plastidic factor on the appearance of multiple forms of nitrate reductase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. **Planta**, New York, v.177, n.1, p.74-83, Jan., 1989
- SEITH, B.; SETZEZ, B.; FLAIG, H.; MOHR, H. Appearance of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamine synthetase in different organs of the scots pine (*Pinus sylvestris*) seedling as affected by light, nitrate and ammonium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, n.3, p.419-426, July, 1994
- SERNA, M.D.; BORRAS, L.F.; PRIMO-MILLO, E. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of citrus. **Plant and Soil**, Netherlands, v.147, n.1, p.13-23, Jan., 1992
- SHELP, B.J. Plant characteristics and nitrogen composition and mobility of brocoli (*Brassica oleracea* var *italica*) supplied with  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$ . **Journal of Experimental Botany**, London, v.38, n.195, p.1603-1987, Oct., 1987
- SHORROCKS, V.M. Mineral Nutrition, growth and nutrient cycle of Heve brasiliensis. I. Growth and nutrient content. **Journal of Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v.19, n.1, p.1-8, Jan., 1965
- SILVA, C.A. **Efeitos da correção da acidez e de fontes do nitrogênio na nitrificação do solo e no crescimento do feijoeiro.** (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: ESAL, 1994. 104p. (Dissertação de Mestrado em Solo e Nutrição de Plantas)
- SILVEIRA, J.S.M.; SANT'ANNA, R. Efeitos de nitrato e do amônio no crescimento e fracionamento do N em capim-colonião. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.135-143, Fev., 1988

- SMIRNOFF, N.; STEWART, G.R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.64, n.2, p.133-140, June, 1985
- SMITH, F.W.; THOMPSON, J.F. Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. **Plant Physiology**, Washington, v.48, n.1, p.219-223, Jan., 1971
- SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINOF, A.; WARNER, R.L.; OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. **Plant Physiology**, Washington, v.72, n.4, p.949-952, Aug., 1983
- SOUZA, C.A.F. **Influência do Alumínio na Mobilização de Reservas, Nutrição Mineral e Crescimento de Plantas de Seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. Lavras: ESAL, 1991, 120p. (Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. **Phytochemistry**, Elmsford, v.19, n.5, p.725-733, May, 1980
- STEWART, G.R.; HEGART, E.E.; SPECHT, R.L. Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.74, n.1, p.26-33, Sept., 1988
- STEWART, G.R.; JOLY, C.A.; SMIRNOFF, N. Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between the roots and shoots of cerrado and forest trees of contrasting plant communities of South East Brasil. **Oecologia**, New York, v.91, n.4, p.511-517, Dec., 1992
- STEWART, G.R.; PATE, J.S.; UNKOVICH, M. Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean-type vegetation. **Plant and Cell Environment**, Oxford, v.16, n.4, p.351-363, May, 1993
- THIBAUD, J.B.; GRIGNON, C. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. **Plant Science Letters**, Limerick, v.22, n.1, p.279-289, Jan., 1981
- VALE, F..R. **Efeito do alumínio sobre a cinética de absorção de nitrato, amônio e fosfato em milho (*Zea mays* L.) e em clone de eucalipto (*Eucalyptus alba*)**. Viçosa: UFV, 1982. 71p. (Tese de Mestrado - Solos e Nutrição de Plantas)

- VALE, F.R. ; VOLK, R.J.; JACKSON, W.A. Simultaneous influx of ammonium and potassium into maize root systems: kinetics and interations. **Planta**, New York, v.173, n.3, p.424-431, Mar., 1988
- VÉZIMA, L.P.; HOPE, H.P.; JOY, K.W. Izoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum* L.) and alfafa (*Medicago sativa* Pers.) **Plant Physiology**, Washington, v.83, n.1, p.58-62, Jan., 1987
- VOLLBRECHT, P.; KLEIN, E.; KASEMIR, H. Different effects of suplied ammonium on glutamine synthetase activity in mustard (*Sinaspis alba*) and pine (*Pinus sylvestris*) sedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.77, n.1, p.129-135, Sept., 1989
- WALLSGROVE, R.M.; KEYS, A.J.; LEA, P.J.; MIFLIN, B..J. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. **Plant and Cell Enviroment**, Oxford, v.6, n. 5, p.301-309, May, 1983
- WALLSGROVE, R.M.; LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. **Planta**, New York, v.154, n.2, p.473-476, April, 1982

**ANEXO**

TABELA 3. Resumo da Análise de Variância das Características Avaliadas

Características	Quadrado Médio *	CV(%)	D.M.S.(5%)
MS Total	49,79**	3,156	26,23
MS Parte Aérea	26,76**	23,85	2,313
MS Raiz	0,95*	22,98	0,44
MS Raiz Lateral	0,27*	22,00	0,23
Razão PA/R	0,597**	14,87	0,345
Área Foliar	2174604*	26,3	659,5
Diâmetro	0,325**	9,57	0,25
pH	0,013*	2,19	0,05
N-Folha	0,08*	8,94	0,127
N-Caule	0,09*	29,38	0,135
N-Raiz	0,085*	19,82	0,13
N acumulado na planta	16191,58**	27,17	56,91
Proteína Total-Folha	82,35**	20,33	4,058
Proteína Total-Raiz	0,147**	20,55	0,288
GS-Folha	54340**	25,17	104,3
GS-Raiz	8697**	30,00	41,71
GOGAT-Folha	2246176**	15,68	221,9
GOGAT-Raiz	39910*	25,75	89,35
NR	0,378*	26,97	0,014

\*, \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F respectivamente..