

ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA CULTIVADAS COM DIFERENTES RELAÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO¹

Gidelma Brito de Lemos², Nelson Delu Filho², Luiz Edson Mota de Oliveira³, Antônio Alvaro Corsetti Purcino⁴

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, C.P. 37, Lavras, MG, 37200-000, Brasil.

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diversas proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (0/0, 8/0, 6/2, 4/4, 2/6 e 0/8 em mM) no teor de N, no teor de proteína solúvel e na atividade da redutase do nitrato (RN, E.C.1.6.6.1), glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2), e glutamato sintase (Fd-GOGAT; E.C. 1.4.1.7 e NADH-GOGAT; E.C.1.4.1.14) em raízes e folhas de plantas jovens de seringueira. O experimento foi conduzido em sala de crescimento por um período de 120 dias em vasos plásticos contendo 4 L de areia lavada como substrato. A solução de Bolle-Jones (1957), pH 6, preparada para fornecer as diversas proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, foi renovada a cada 7 dias. A aplicação de N. independentemente da proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, aumentou significativamente o teor de N nas folhas, caules e raízes. A atividade da GOGAT nas raízes e caules, e da GS nas folhas das plantas tratadas exclusivamente com NO_3^- ou NH_4^+ não diferiram entre si, mas foram significativamente mais altas que nas plantas não tratadas com N. Nas raízes, as atividades da RN e da GS foram mais elevadas nas plantas tratadas exclusivamente com NO_3^- , e diminuíram significativamente quando o NH_4^+ foi adicionado à solução nutritiva. Não foi possível detectar atividade da RN nas folhas das plantas utilizadas neste experimento, o que sugere que em plantas jovens de seringueira, a redução de NO_3^- e a assimilação primária de NH_4^+ acontecem somente nas raízes. Como não existe redução de nitrato nas folhas, sugere-se que o principal papel das altas atividades da GS e GOGAT observadas neste tecido seja o de reassimilar o NH_4^+ liberado no processo fotorespiratório.

Termos adicionais para indexação: glutamato sintase, glutamina sintetase, *Hevea brasiliensis*, redutase do nitrato, relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$.

NITROGEN ASSIMILATING ENZYMES IN YOUNG RUBBER TREES (*HEVEA BRASILIENSIS* MUELL. ARG.) GROWN WITH DIFFERENT RATIOS OF NITRATE AND AMMONIUM

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the effect of different ratios of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (0/0, 8/0, 6/2, 4/4, 2/6 and 0/8 in mM) on the concentration of total N and soluble protein, and on the activities of nitrate reductase (RN, E.C. 1.6.6.1), glutamine synthetase (GS, E.C. 6.3.1.2) and glutamate synthase (Fd-GOGAT, E.C. 1.4.1.7 and NADH-GOGAT, E.C. 1.4.1.14) in roots and leaves of young rubber trees. The experiment was carried out under controlled environmental conditions for 120 days, in plastic pots with 4 L of washed sand. The Bolle-Jones (1957) nutrient solution, pH 6, prepared to give the desired $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratios was renewed every 7 days. N application, independently of the $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio, significantly increased total N concentration in leaves, stems and roots. The activities of GOGAT in

¹Recebido em 05/06/1996 e aceito em 01/09/1999. Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Lavras para obtenção do título de MS em Fisiologia Vegetal.

²Engenheiro Agrônomo, M.Sc em Agronomia - Área de Concentração Fisiologia Vegetal

³Engenheiro Agrônomo, Dr., Prof. Titular do Departamento de Biologia

⁴Pesquisador, Ph.D., Bolsista do CNPq, Embrapa Milho e Sorgo, C. P. 151, Sete Lagoas, MG, 35.701-970

leaves and roots and of GS in leaves did not differ among themselves in plants treated exclusively with either NO_3^- or NH_4^+ , but showed values significantly higher than those plants not treated with N. In the roots, the activities of NR and GS were higher in plants treated exclusively with NO_3^- and significantly decreased when NH_4^+ was added to the nutrient solution. It was not possible to detect NR activity in leaves of the plants used in this experiment, an observation suggesting that, in young rubber trees, NO_3^- reduction and primary NH_4^+ assimilation take place only in the roots. Because NO_3^- reduction was absent in the leaves, we hypothesize that the main role for the high GS and GOGAT activities found in the leaves is to reassimilate NH_4^+ released during photorespiration.

Additional index terms: glutamate synthase, glutamine synthetase, *Hevea brasiliensis* nitrate reductase, $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio.

INTRODUÇÃO

Em plantas superiores a assimilação de nitrogênio (N) é o segundo maior processo metabólico, sendo superado apenas pela fixação fotossintética do CO_2 . As plantas absorvem o N do solo principalmente nas formas de nitrato e amônio, disponíveis a partir da mineralização da matéria orgânica ou pela aplicação de fertilizantes químicos. Em cultivos comerciais, após a melhoria das qualidades químicas e microbiológicas do solo obtidas por meio de calagem e de adubações corretivas, o nitrato é a principal forma de N disponível para as plantas. Entretanto, em áreas onde o pH é naturalmente baixo ou não foi devidamente corrigido pela prática da calagem, a atividade microbiana é baixa, impedindo a conversão do amônio em nitrato. Nessas condições, os fertilizantes nitrogenados aplicados na forma de ureia - principal fonte de N nos fertilizantes comerciais brasileiros - não são transformados em nitratos, permanecendo no perfil do solo como amônio (Coelho *et al.*, 1991). Com a notável exceção da cultura do arroz irrigado e outras poucas espécies vegetais, a maioria das plantas preferencialmente absorve o N na forma de nitrato, sendo que a forma amoniacal tem efeito tóxico para as células. Entretanto, apesar de a maioria das espécies vegetais não ser capaz de se desenvolver adequadamente tendo o amônio como única fonte de N, já foi observado inúmeras vezes que o crescimento vegetal pode ser beneficiado quando as plantas são fertilizadas com uma fonte contendo nitrato e amônio.

Uma vez absorvido pela célula, o nitrato é reduzido a nitrito pela redutase do nitrato (RN) e, em seguida, a amônio, pela redutase do nitrito (RNI). Esse amônio é imediatamente assimilado por meio da ação conjunta das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Os processos de redução e assimilação de N podem ocorrer nas folhas e/ou raízes, de maneira simultânea ou não entre esses órgãos, de acordo com a espécie (Pate, 1980) e com as condições ambientais (Costa, 1986). Além disso, a forma como o N é fornecido à planta pode promover alterações nos sítios de redução e assimilação do mesmo. Estudos re-

alizados por Delú Filho *et al.* (1998) mostraram que diferente do observado para a maioria das plantas anuais, a redução do nitrato em plantas jovens de seringueira acontece principalmente nas raízes, enquanto a atividade das enzimas de assimilação de amônio é consideravelmente mais alta nas folhas.

Quando o N na forma de nitrato é adicionado ao meio de cultivo, a atividade da RN (Oaks, 1992; Aslam e Oaks, 1976) e a quantidade da proteína-RN (Somers *et al.*, 1983) são aumentadas em diferentes tecidos das folhas e raízes, embora Srivastava (1980) afirme que o efeito da forma de aplicação do N (nitrato ou amônio) na atividade da RN depende da espécie e do genótipo.

Na folhas, a atividade das isoformas biossintéticas da glutamina sintetase (GS2) e da glutamato sintase (ferredoxina-GOGAT) são fortemente reguladas pela luz (Hirel & Gadal, 1980) e por N (Santos & Salema, 1992), embora o fornecimento diferencial de nitrato e amônio às plantas tenha revelado efeitos controversos, podendo ser negativo, positivo ou nulo (Mifflin & Lea, 1977; Mack, 1995). Nas raízes, vários autores (Sakakibara *et al.*, 1992; Redinbaugh & Campbell, 1993) têm sugerido que o N é o principal fator regulatório da atividade dessas enzimas.

O conhecimento das formas de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio em plantas de seringueira é importante na avaliação do comportamento fisiológico dessa espécie nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas, desde a germinação até a produção de látex, nas diferentes condições climáticas estacionais e edáficas das regiões com potencial para o desenvolvimento da heveicultura brasileira. Ao contrário do observado para as espécies anuais comercialmente importantes, relativamente poucos trabalhos tem sido conduzidos visando aumentar os conhecimentos sobre o metabolismo do N em espécies arbóreas tropicais (Stewart *et al.*, 1992), incluindo a seringueira.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar, sob condições controladas, o efeito do fornecimento de diferentes proporções de nitrato e amônio sobre concentração de N, de proteína solúvel e, a atividade da RN, GS e GOGAT nas raízes e folhas de plantas jovens de seringueira.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção das plantas jovens de seringueira e condições de crescimento

Este estudo foi conduzido em sala de crescimento, com temperatura de $28 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 60-80%, fotoperíodo de 12 horas e densidade de fluxo de fótons (DFF) de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, determinada no dossel das plantas, no período compreendido entre 08/04/95 a 08/08/95.

As plantas de seringueira utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir de sementes ilegítimas provenientes de um plantio policlonal com idade aproximada de 38 anos, localizado na Fazenda Água Milagrosa, Tabapoã, São Paulo, formado por 37% de pés-franco e o restante por uma mistura de clones. As sementes foram coletadas

em março de 1995, germinadas em canteiros de areia previamente lavadas com água potável e posteriormente com água deionizada e protegidas com sombrite contra a radiação solar direta (50% de sombra) mantido a 30 cm de altura. Durante o período de germinação os canteiros foram irrigados 3 vezes ao dia até a capacidade de campo. Ao atingirem o estágio de "pata de aranha" (aproximadamente 25 dias após a germinação) as plântulas foram selecionadas de acordo com a uniformidade das raízes e, conjuntos de três plântulas foram transferidos para vasos plásticos contendo 4 L de areia como substrato de cultivo. Essa areia foi previamente lavada com água potável e água deionizada e sua análise química pelo método de semi-Kjeldahl (Bataglia *et al.*, 1983), usando 1 N de KCl como solução extratora, mostrou que não havia nenhum traço de N disponível após a lavagem da mesma.

Após transferência para os vasos, as plantas foram irrigadas com a solução nutritiva de Bolle-Jones (1957), com pH ajustado para 6, e preparada para fornecer 8 mM de N total (Delú Filho *et al.*, 1994) com as seguintes relações $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$: 8/0; 6/2; 4/4; 2/6 e 0/8. Adicionalmente, incluiu-se um tratamento controle sem N (0/0). A irrigação dos vasos com a solução nutritiva foi realizada utilizando-se o seguinte esquema: no primeiro dia, logo após a transferência das plantas para os vasos, cada vaso foi irrigado com 1400 mL da solução, sendo que aproximadamente 1000 mL ficaram retidos no substrato e 400 mL foram coletados em pratos colocados sob cada vaso. Na manhã do dia seguinte, esses 400 mL de solução de cada prato foram retornados para o vaso, sendo o excesso não retido no substrato novamente coletado nos pratos. Na manhã do terceiro dia, esse excesso de solução nutritiva coletado de cada vaso foi completado com água destilada até 400 mL e novamente aplicado ao substrato do vaso. Esse esquema foi repetido até o sexto dia. No sétimo dia, cada vaso foi lavado com 3 volumes de água destilada e o esquema de aplicação da solução nutritiva de Bolle-Jones (1957) repetido até o término do experimento.

Cada tratamento foi repetido 5 vezes e os vasos foram distribuídos ao acaso dentro da sala de crescimento. A análise da variância dos resultados obtidos foi calculada com a utilização do programa MSTAC e as médias foram comparadas pelo teste de LSD para $p < 0,05$.

Determinação da atividade da redutase do nitrato

A atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN; E.C. 1.0.0.1) em folhas e raízes foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Delú-Filho *et al.* (1998).

Extração e determinação da atividade da GS e da GOGAT

Para extração da glutamina sintetase (GS; E.C. 6.3.1.2) e da glutamato sintase (GOGAT; E.C. 1.4.1.7) das folhas e raízes das plantas de seringueira, utilizou-se tampão fosfato de potássio, pH 7,5, contendo 2 mM de ditiotreitól (DTT), 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético bi sódico (Na_2EDTA) e 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). A extração foi realizada macerando-se em pre-

sença de areia lavada em um almofariz com pistilo, 1 grama de folhas em 5 volumes do tampão ou 1 grama de raiz em 4 volumes do tampão. Os homogenatos foram imediatamente centrifugados a 16.000 x g por 20 minutos sendo os sobrenadantes utilizados para a determinação das atividades enzimáticas. Todos os procedimentos foram realizados entre 0-4°C.

A atividade biossintética da GS nas folhas e raízes foi determinada na presença de NH_2OH como descrito anteriormente (Purcino *et al.*, 1996) e, a atividade foliar da GOGAT dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) foi determinada pelo protocolo de Matoh *et al.* (1979). Nas raízes, a atividade da NADH-GOGAT foi determinada em um meio de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,5, 10 mM de glutamina, 10 mM de 2-oxoglutarato (pH ajustado para 7,0), 10 mM de KCl, 0,2 mM de NADH e entre 50 e 200 μL de extrato, conforme o tratamento, perfazendo um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição do NADH e decréscimo na absorbância devido a oxidação do NADH foi monitorado em 340 nm. Tanto a atividade da GS quanto das duas isoformas da GOGAT foram determinadas a 30°C.

Determinação do N total e da proteína solúvel

O nitrogênio total foi determinado na matéria seca pelo método de semi-Kjedahl (Bataglia *et al.*, 1983) em tecidos de raiz, caule e folha previamente moídos em moinho tipo Wiley, com peneira de 40 mesh. A determinação de proteína solúvel foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951) nos mesmos extratos brutos utilizados para os ensaios enzimáticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às plantas controle não tratadas com N, verificou-se que a adição de 8 mM de NO_3^- na solução nutritiva teve um efeito significativo e positivo em todas as variáveis medidas nas folhas e raízes da seringueira. Entretanto, o efeito da substituição parcial ou total do NO_3^- pelo NH_4^+ foi diferente entre as variáveis estudadas neste trabalho.

Houve aumento significativo no teor de N total nas folhas, caules e raízes (Figura 1) quando as plantas receberam N, sendo este aumento independente da proporção de NO_3^- e NH_4^+ na solução nutritiva. Esse teor de N total, independente dos tratamentos, foi maior nas folhas que nas raízes e caule. Esses resultados são, portanto, similares aos encontrados por Delú Filho (1994) em experimento no qual as plantas foram cultivadas apenas com NO_3^- como fonte de N no meio de cultivo.

De maneira semelhante, o teor de proteína solúvel foi significativamente maior nas folhas e raízes de plantas tratadas com N (Figura 2). Nas folhas, os teores de proteína solúvel nas plantas tratadas exclusivamente com NO_3^- ou NH_4^+ não diferiram entre si, mas o teor de proteína nas plantas que receberam somente NH_4^+ foi significativamente maior que naquelas tratadas com partes iguais de NO_3^- e NH_4^+ . Nas raízes, não se observou diferenças entre as plantas tratadas exclusivamente com NO_3^- ou NH_4^+ , mas verificou-se que aquelas trata-

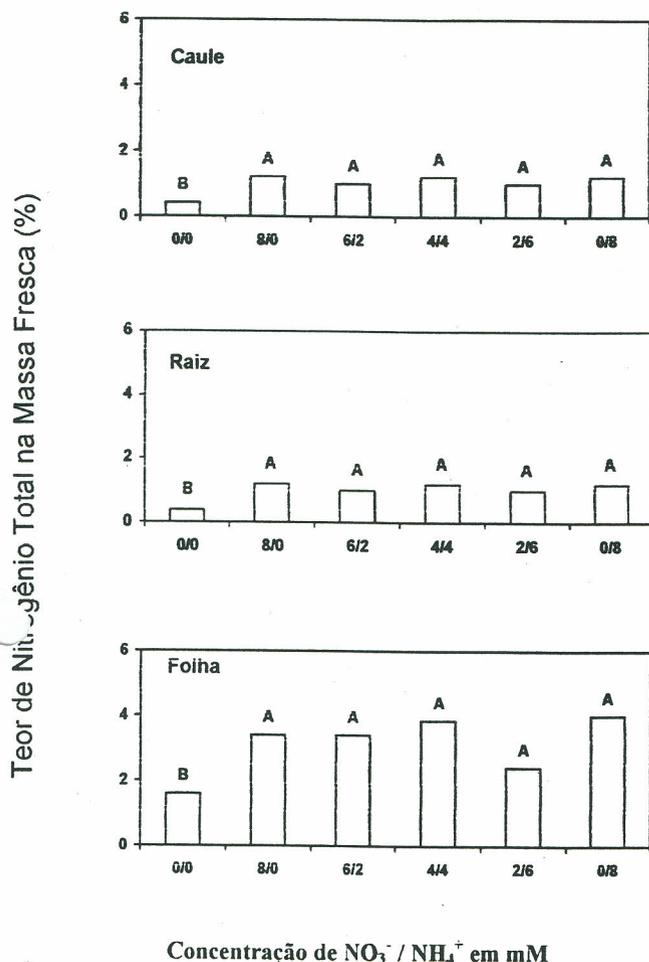


FIGURA 1. Teor de N total no caule, raiz e folha de plantas jovens de seringueira submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+ no meio de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de LSD para $p < 0,05$.

As plantas com 2 mM NO_3^- e 6 mM NH_4^+ tinham maiores teores de proteínas que plantas cultivadas exclusivamente com NO_3^- . Verificou-se também que o teor de proteínas solúveis nas folhas da seringueira é várias vezes maior que nas raízes.

Nesse experimento não se detectou atividade da RN nas folhas da seringueira, o que corrobora observações anteriores indicando que a redução do NO_3^- nessa espécie ocorre exclusivamente nas raízes (Delú-Filho, 1998). A atividade radicular da RN foi significativamente maior nas plantas que receberam exclusivamente NO_3^- como fonte de N (Figura 3). Essa observação já era esperada porque a RN é uma enzima induzida pelo seu substrato (Beever *et al.*, 1965). A novidade desses dados advém da verificação de que o NH_4^+ aparentemente teve forte efeito repressor na atividade da RN nas raízes da seringueira, mesmo em plantas que foram cultivadas em níveis de NO_3^- próximo do ótimo, e.g. o tratamento que recebeu 6 mM de NO_3^- e 2 mM de NH_4^+ . Essa repressão da atividade da RN nas raízes pode ter sido

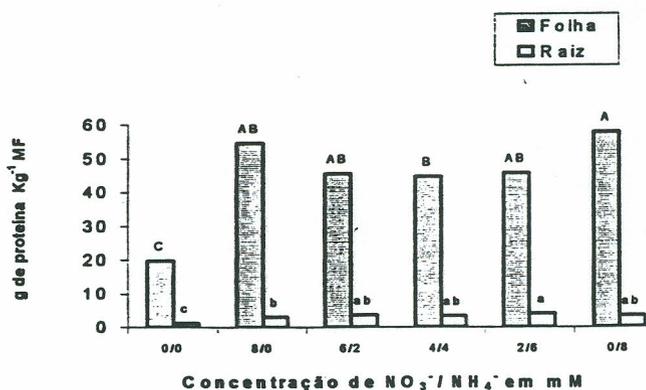


FIGURA 2. Teor de proteína solúvel em raízes e folhas de plantas jovens de seringueira submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+ no meio de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (raízes) ou maiúscula (folhas) não são significativamente diferentes pelo teste de LSD para $p < 0,05$.

devida ao acúmulo de NH_4^+ ou de outros compostos nitrogenados (Redinbaugh & Campbell, 1993) que estariam inibindo a síntese ou a atividade dessa enzima (Lewis *et al.*, 1982).

A atividade da GS foi maior nas lâminas foliares do que nas raízes (Figura 4). Nas plantas que não receberam nitrogênio, a atividade dessa enzima foi muito baixa nas lâminas foliares, não sendo detectada nas raízes. Entretanto, quando se adicionou NO_3^- ao meio de cultivo, a atividade da GS aumentou significativamente tanto nas folhas quanto nas raízes. Observou-se, porém, que o aumento da concentração de NH_4^+ na solução nutritiva contribuiu para reprimir a atividade da GS nas raízes. Nas folhas, as plantas que receberam 6 mM de NO_3^- e 2 mM de NH_4^+ mostram redução significativa na atividade da GS em relação àquelas que receberam exclusivamente NO_3^- . Verificou-se, porém, que houve uma recuperação dessa atividade com o aumento progressivo da proporção de NH_4^+ na solução nutritiva e, a atividade da GS em plantas que receberam exclusivamente NH_4^+ não foi diferente das plantas tratadas apenas com NO_3^- .

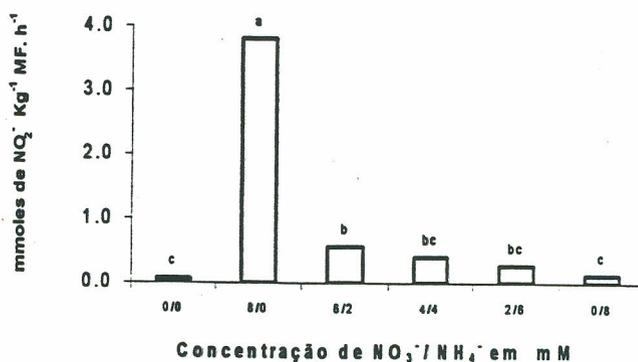


FIGURA 3. Atividade da redutase do nitrato, mmoles de $\text{NO}_2^- \text{kg}^{-1}$ massa fresca h^{-1} de raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+ no meio de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de LSD para $p < 0,05$.

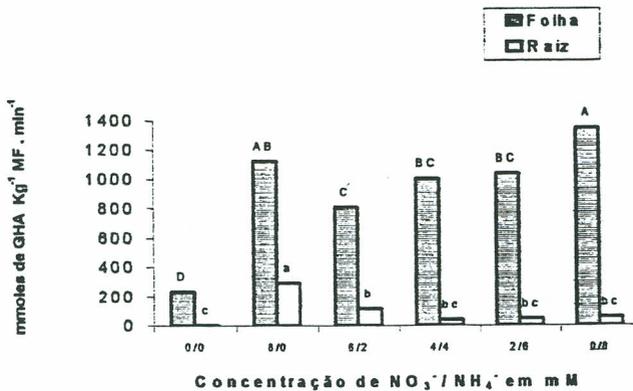


FIGURA 4. Atividade da glutamina sintetase, em mmoles de glutamilhdroxamato (GHA) kg⁻¹ massa fresca h⁻¹, de raízes e folhas de plantas jovens de seringueira submetidas a diferentes concentrações de NO₃⁻ e NH₄⁺ no meio de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (raízes) ou maiúscula (folhas) não são significativamente diferentes pelo teste de LSD para p < 0,05.

Comparando-se a atividade da GS encontrada nas raízes (Figura 4) com a atividade radicular da RN (Figura 3) verifica-se um comportamento muito semelhante entre essas enzimas com relação aos tratamentos de N utilizados. Isto sugere que a atividade da GS radicular parece ser dependente do NH₄⁺ produzido nas raízes pela ação da RN. Aparentemente, o mesmo não ocorre nas lâminas foliares, pois os altos valores da atividade da GS e a ausência da atividade da RN nesse tecido indicam que o papel principal da GS não é a assimilação primária do NH₄⁺ derivada da redução do NO₃⁻; como já estabelecido para as culturas anuais (Lea *et al.*, 1990).

A adição de N no meio de cultivo elevou significativamente a atividade da GOGAT tanto nas lâminas foliares como nas raízes, não se observando, entretanto, diferenças entre plantas que receberam exclusivamente NO₃⁻ ou NH₄⁺ ou diferentes proporções dessas fontes de N (Figura 5).

Fato relevante advindo desses dados que confirmam observações anteriores (Delu Filho, 1994; Delu Filho *et al.*, 1998), é a constatação de que na seringueira a redução do nitrato e a assimilação primária do NH₄⁺ acontecem exclusivamente nas raízes e não nas folhas. Os níveis de atividade da RN, GS e GOGAT observados nas raízes das plantas tratadas com NO₃⁻ são comparáveis aos verificados em folhas de milho cultivado sob condições adequadas (Purcino *et al.*, 1996; 1998) e, portanto, são capazes de sustentar o crescimento da seringueira. Conseqüentemente, os resultados obtidos nesse experimento parecem indicar que as altas atividades da GS e GOGAT observadas nas folhas da seringueira estão relacionadas apenas com a reassimilação do NH₄⁺ derivado do processo fotorespiratório típico das plantas tipo C-3 (Wallsgrave *et al.*, 1983), já que a quantidade de NH₄⁺ produzido durante a descarboxilação da glicina para produção de serina sob condições fotorespiratórias chega a ser até dez vezes maior que a quantidade produzida durante a

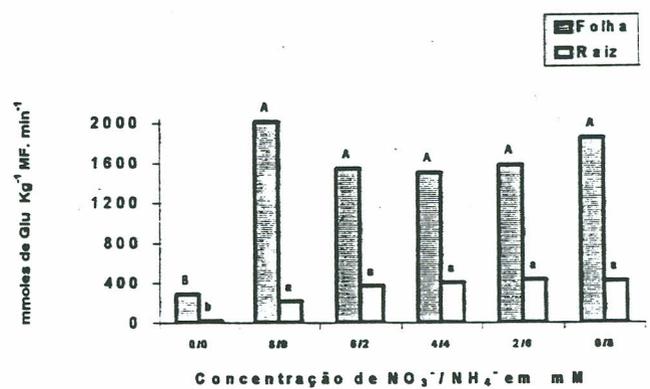


FIGURA 5. Atividade da glutamato sintase, mmoles de Glu kg⁻¹ de massa fresca h⁻¹, de raízes e folhas de plantas jovens de seringueira submetidas a diferentes concentrações de NO₃⁻ e NH₄⁺ no meio de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula (raízes) ou maiúscula (folhas) não são significativamente diferentes pelo teste de LSD para p < 0,05.

redução do NO₃⁻ (Lea & Blackwell, 1992). Esses resultados mostram, portanto, a necessidade da realização de novos trabalhos para que se tenha um melhor entendimento sobre quais isoformas dessas enzimas estariam envolvidas na assimilação do NH₄⁺ derivado da redução do NO₃⁻ nas raízes e da foto respiração nas folhas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Edna P. P. de Pinho pela assistência com as análises laboratoriais e confecção das figuras, ao Dr. Antônio Carlos de Oliveira pela orientação nas análises estatísticas e a Dra. Vera M. C. Alves pela leitura crítica do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- ASLAM, M. & OAKS, A. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. *Plant Physiology*, 57:572-576, 1976.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R. & GALLO, J.R. *Métodos de análise química de plantas*. Campinas. Instituto Agrônomo de Campinas, 1983. Boletim Técnico n° 78.
- BEEVERS, L.; SCHRADER, L.E.; FLESHER, D. & HAGEMAN, R.H. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiology*, 40: 691-698, 1965.
- BOLLE-JONES, E.W. Copper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). *Plant and Soil*, 10:168-178, 1957.
- COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E.; BAHIA, A.F.C. & GUEDES, G.A.A. Balanço de nitrogênio (¹⁵N) em um latossolo vermelho-escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 15:187-193, 1991.
- COSTA, E. M. Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a nutrição nitrogenada em *Eucalyptus grandis* Hill (Maiden). Viçosa: UFV, 1986, 50p.
- DELÚ FILHO, N. Efeito do N-NO₃⁻ sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Lavras: UFLA, 1994. 87p. Tese de Mestrado.
- DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M.; ALVES, J.D. & PURCINO, A.A.C.

- Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 10:185-190, 1998.
- HIREL, B. & GADAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. **Plant Physiology**, 66:619-623, 1980.
- LEA, P.J.; ROBINSON, S.A. & STEWART, G.R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. **The Biochemistry of Plants**, 16: 121-159, 1990.
- LEA, P.J. & BLACKWELL, R.D. The role of amino acid metabolism in photosynthesis. In: SINGH, B. K. ; FLORES, H. E. & SHANNON, J.C. (Eds.) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. American Society of Plant Physiologists, 1992. P. 98-110.
- 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**, 49:39-49, 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**, 193:267-275, 1951.
- MACK, 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 NH_4^+ . **Planta**, 196: 231-238, 1995.
- MATOH, T.; SUZUKI, F. & IDA, S. Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme. **Plant Cell Physiology**, 20:1239-1340, 1979.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, 28: 299-329, 1977.
- OAKS, A. Nitrogen assimilation in roots: a re-evaluation. **Bioscience**, 142:103-111, 1992.
- PATE, T.S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology**, 31:313-340, 1980.
- PURCINO, A.A.C.; PAIVA, E.; SILVA, M.R. & ANDRADE, S.R.M. Influence of *Azospirillum* inoculation and nitrogen supply on grain yield, and carbon- and nitrogen-assimilating enzymes in maize. **Journal of Plant Nutrition**, 19:1045-1060, 1996.
- PURCINO, A.A. C. ; ARELLANO, C. ; ATHWAL, G. S. & HUBER, S. H. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. **Maydica**, 43: 83-94, 1998.
- REDINBAUGH, M.G. & CAMPBELL, W.H. Higher plant response to environmental nitrate. **Physiologia Plantarum**, 82: 640-650, 1993.
- 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**, 84:145-152, 1992.
- SAKAKIBARA, H.; KAWATA, S.; TAKASHI, H.; HASE, T. & SUGIYAMA, T. Molecular cloning of the family of glutamine synthase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. **Plant Cell Physiology**, 33:19-58, 1992.
- SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. & OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. **Plant Physiology**, 72:948-952, 1983.
- SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. **Phytochemistry**, 19:725-733, 1980.
- 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 Brazil. **Oecologia**, 91:511-517, 1992.
- WALLSGROVE, R.M.; KEYS, A.J.; LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. **Plant Cell and Environment**, 6:301-309, 1983.