

**Efeito da Proporção NH_4^+ / NO_3^- na
Distribuição de Nitrato e na Atividade
in vitro da Redutase do Nitrato em
Plantas de *Panicum maximum***



Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 12

Efeito da Proporção NH_4^+ / NO_3^- na Distribuição de Nitrato e na Atividade in vitro da Redutase do Nitrato em Plantas de *Panicum maximum*

Solange R. M. Andrade
R. Sant'Anna
J. Cambraia
Paulo R. Mosquim

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73301-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Ronaldo Pereira de Andrade*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Membros: *Maria Alice Bianchi, Leide Rovênia Miranda de Andrade, Carlos Roberto Spehar, José Luiz Fernandes Zoby*

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira e Jaime Arbués Carneiro*

Normalização bibliográfica: *Maria Alice Bianchi*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Editoração eletrônica: *Jussara Flores de Oliveira*

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

E27 Efeito da proporção $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ na distribuição de Nitrato e na atividade *in vitro* da redutase do Nitrato em plantas de *Panicum maximum* / Solange R. M. Andrade ... [et al.]. – Planaltina : Embrapa Cerrados, 2001.

16 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 12)

1. Nitrogênio - fisiologia vegetal. 2. Fisiologia vegetal - nitrogênio. I. Série.

571.2 - CDD 21

Sumário

Introdução	7
Material e Métodos	8
Obtenção do material vegetal	8
Determinação do N-nítrico	10
Determinação da atividade Redutase do Nitrato (RN)	10
Resultados e Discussão	11
Conclusões	13
Referências Bibliográficas	13

Efeito da Proporção NH_4^+ / NO_3^- na Distribuição de Nitrato e na Atividade *in vitro* da Redutase do Nitrato em Plantas de *Panicum maximum*

Solange R. M. Andrade¹; R. Sant'Anna²;
J. Cambraia³; Paulo R. Mosquim⁴

Resumo – O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da nutrição nítrica e amoniacal na distribuição de nitrato e na atividade *in vitro* da redutase do nitrato em plantas de capim colônia (*Panicum maximum* Jacq). As plantas receberam 7 mM de nitrogênio nas formas N-NH_4^+ , N-NO_3^- ou combinadas nas seguintes proporções 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 e 100/0. A extração enzimática foi feita em Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM e b-mercaptoetanol 10 mM, e para o ensaio utilizou-se 200 mmoles de Tris-HCl pH 7,5, 20 mmoles KNO_3 , 0,1 mmol NADH e 0,1 mL de Triton X-100 1% no volume final de 2,0 mL. A concentração de nitrato foi levemente superior na parte aérea quando as plantas receberam ambas as formas de nitrogênio, e na raiz esta decresceu com o aumento da proporção de amônio. A atividade *in vitro* de redutase do nitrato só foi observada nas folhas e foi maior quando as plantas receberam ambas as formas de nitrogênio. Os resultados sugerem um efeito estimulador do amônio no transporte de nitrato e na atividade da redutase do nitrato quando NO_3^- está presente.

Termos para indexação: assimilação de nitrogênio, nitrato, amônio, *Panicum maximum*.

¹ Biol., Dr., Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

² Eng. Agrôn., Ph.D., Universidade Federal de Viçosa

³ Eng. Agrôn., Ph.D., Universidade Federal de Viçosa, cambraia@ufv.br

⁴ Eng. Agrôn., Dr., Universidade Federal de Viçosa, pmosquim@ufv.br

Effect of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ Ratio on Nitrate Partition and in Vitro Nitrate Reductase Activity in Seedlings of *Panicum maximum*

Abstract – The aim of this work was to study the effects of nitric and ammoniacal nutrition on the nitrate partition and in vitro activity of nitrate reductase in the *Panicum maximum* seedlings. Seedlings received 7 mM of nitrogen in NH_4^+ -N or NO_3^- -N or both forms in the following ratios 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 and 100/0. Enzyme extraction was done in Tris-HCl 50 mM pH 7.5, with EDTA 0,5 mM and b-mercaptoetanol 10 mM, and the assay was carried out in 200 mmoles of Tris-HCl pH 7.5, 20 mmoles KNO_3 , 0.1 mmol NADH and 0,1 mL Triton X-100 1% in a final volume of 2,0 mL. The nitrate concentration was slightly higher in shoots that received both forms of nitrogen, while in roots it decreased with the increase of ammonium proportion. In vitro activity of nitrate reductase was only observed in the leaf, and was biggest when the seedlings received both forms of nitrogen. The results suggest a stimulatory effect of ammonium in nitrate transport and in the reductase nitrate when nitrate was present.

Index terms: nitrogen assimilation, nitrate, ammonium, *Panicum maximum*.

Introdução

O nitrogênio é um elemento essencial para os vegetais por ser constituinte de biomoléculas importantes para o desenvolvimento das plantas. Ocorre nos solos principalmente nas formas nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+). Ambas as formas podem ser absorvidas pelas plantas em taxas e em proporções dependentes da espécie, estágio de desenvolvimento, disponibilidade de carboidratos, pH do meio e fatores do ambiente ([Beevers, 1976](#); [Deane-Drummond & Glass, 1983](#); [Takács & Tecsí, 1992](#)).

O nitrato absorvido, em geral, é translocado, via xilema, para a parte aérea, onde esse íon pode ser armazenado ou reduzido, no entanto algumas espécies reduzem o nitrato no sistema radicular ([Oaks, 1982](#); [Rufty et al., 1986](#)). A redutase do nitrato RN é a enzima chave reguladora desta assimilação, e sofre regulação pelo nitrato, pelo amônio e por alguns metabólitos resultantes da assimilação de ambos ([Hoff et al., 1992](#); [Sttit & Krapp, 1999](#)). A quantidade de redutase do nitrato ativa *in vivo* é determinada por diversas condições do meio ambiente, como luz, concentração de nitrato e de amônio nos solos, e por fatores internos como disponibilidade de metabólitos para a planta ([Andrews, 1986](#); [Loyola-Vargas & Jimenez, 1984](#); [Wakhaloo & Staudt, 1988](#)). Alguns trabalhos demonstram que o aparecimento da atividade enzimática é precedido por um aumento na síntese do RNA mensageiro da redutase do nitrato ([Hoff et al., 1992](#); [Kleinhofs et al., 1989](#)).

O nitrato pode induzir a atividade da redutase do nitrato (ARN) por um aumento da síntese “de novo” da proteína ou por ativação da proteína redutase do nitrato (PRN) pré-existente ([La Haba et al., 1988](#); [Oaks et al., 1982](#); [Srivastava, 1980](#); [Sttit & Krapp, 1999](#)). [Remmler & Campbell \(1986\)](#) demonstraram que ocorreu um aumento da PRN em folhas de milho quando nitrato foi adicionado ao meio nutritivo, seguido de um incremento da ARN. [Toamye & Tabaco](#) também apresentaram um aumento da transcrição do gene *Nia*, que expressa a PRN, na presença de nitrato e luz ([Sttit & Krapp, 1999](#)). Porém, tem sido relatado que o “pool” celular de nitrato não está, necessariamente, correlacionado com a atividade da RN ([Nambiar et al., 1988](#); [Sechley et al., 1992](#)). Estudos com células isoladas ou com protoplastos de diferentes espécies vegetais, mostram que de 58% a 99% do nitrato total é estocado no vacúolo ([Oscarson et al., 1987](#)). Mesmo se grandes acréscimos são feitos para a redução e troca vacuolar, parece que o fluxo do tonoplasto e plasmalema mantêm uma

concentração citoplasmática suficiente para a saturação da RN ([Oscarson et al., 1987](#)), sendo a taxa de fluxo decisiva para a atividade RN ([Hoff et al., 1992](#)). Assim, alguns autores acreditam que o acúmulo de nitrato no vacúolo, evidenciado em várias espécies, só ocorre após a saturação da enzima redutase do nitrato ([Lewis et al., 1982a](#)). Segundo Jones & Sheard (1975), citados por [Nambiar et al. \(1988\)](#), apenas pequena quantidade de nitrato é necessária para a indução da RN, ocorrendo o contrário para a sua estabilização. Existem evidências demonstrando que a ativação da RN é mediada por sinais de açúcar ([Sttit & Krapp, 1999](#)), a assimilação de nitrato é acompanhada por um aumento na síntese de 2-oxoglutarato, malato e outros ácidos orgânicos necessários para a síntese de outros aminoácidos ([Sttit & Krapp, 1999](#)).

O amônio, por sua vez, pode apresentar desde efeito inibidor até efeito estimulador dessa enzima ([Srivastava, 1980](#)). A atividade redutase do nitrato parece ser afetada pelo amônio por meio da redução na absorção de nitrato, ou por interferência com sua síntese e degradação ou degradação por modulação física ou ainda por indução da síntese de proteína regulatória específica para a RN ([Srivastava, 1980](#); [Sttit & Krapp, 1999](#)). Os efeitos estimuladores podem ser devidos ao favorecimento da síntese da proteína redutase do nitrato (PRN), ou mesmo pela síntese de uma proteína reguladora específica da redutase do nitrato ([Remmler & Campbell, 1986](#); [Oaks et al., 1982](#); [Sihag et al., 1979](#)). [Datta et al. \(1981\)](#) observaram que o amônio estabiliza a atividade da RN em folhas de trigo, por meio de algum mecanismo *in vivo* ainda não identificado. Segundo [Oaks \(1982\)](#) adição de nitrato e amônio, quando comparado com adição única de nitrato, geralmente aumentam os níveis de RN em raízes e folhas de plântulas.

O objetivo do trabalho foi estudar os efeitos da proporção NH_4^+ / NO_3^- na atividade *in vitro* da redutase do nitrato e na distribuição de NO_3^- em plantas de capim colônio cultivadas hidroponicamente em câmara de crescimento.

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal

Sementes de *Panicum maximum* cv. Vencedor foram esterilizadas em hipoclorito a 5% por 5 minutos, lavadas em água estéril, semeadas em areia autoclavada e irrigadas com água até a germinação. Durante os 10 primeiros dias após a

germinação, as plântulas foram irrigadas, a cada três dias, com uma solução nutritiva contendo 100% de nitrato (1/3 força e pH 5,5), especificadas na Tabela 1, e com água desmineralizada nos demais dias. No décimo primeiro dia, grupos de três plântulas foram transferidos para vasos plásticos, pintados externamente de preto, contendo 1,5 L da mesma solução nutritiva utilizada na irrigação e sob arejamento contínuo. As plantas foram cultivadas nessa solução nutritiva, em câmara de crescimento, à temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de aproximadamente $250\text{ mmol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 15 dias, com ajustes di\u00e1rios do pH para 5,5. A cada tr\u00eas dias, acrescentou-se \u00e0 solu\u00e7\u00e3o 1,5 mL de FeEDTA. No s\u00e9timo dia, procedeu-se \u00e0 renova\u00e7\u00e3o da solu\u00e7\u00e3o nutritiva. Ap\u00f3s 25 dias da germinação, as plantas foram submetidas \u00e0s solu\u00e7\u00f5es nutritivas de tratamento contendo 7 mM de nitrog\u00eanio, sob as formas n\u00edtrica e amoniacal, conforme as propor\u00e7\u00f5es especificadas na Tabela 1. As solu\u00e7\u00f5es foram renovadas ap\u00f3s um per\u00edodo de 48 horas e, quando completaram 96 horas, procedeu-se \u00e0 coleta do material.

Foram feitas tr\u00eas e quatro repeti\u00e7\u00f5es, respectivamente para a determina\u00e7\u00e3o do concentra\u00e7\u00e3o de nitrato e da atividade enzim\u00e1tica.

Tabela 1. Composi\u00e7\u00e3o das solu\u00e7\u00f5es nutritivas utilizadas nos experimentos.

Fonte	Solu\u00e7\u00e3o estoque (M)	Propor\u00e7\u00e3o Am\u00f4nio/nitrato				
		0/100	25/75	50/50	75/25	100/0
		Volume da Solu\u00e7\u00e3o-Estoque (mL/L)				
Ca(NO ₃)	1,04	2,5	1,7	-	-	-
NH ₄ NO ₃	1,00	-	1,8	3,6	1,8	-
KNO ₃	0,80	2,5	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	1,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
KCl	0,93	2,2	2,2	2,2	2,2	-
MgSO ₄	0,60	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
CaCl ₂	1,00	-	0,7	2,5	2,5	2,5
NH ₄ Cl	2,38	-	-	-	1,5	3,0
Micronut.	1,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FeEDTA	1,00	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Fonte: Clark, 1975.

Determinação do N-nítrico

As plantas foram removidas da solução nutritiva, subdivididas em parte aérea e sistema radicular e pesadas para a determinação da matéria fresca. Parte desse material foi utilizada para a determinação do peso da matéria seca, e o restante foi fragmentado, imerso em etanol 80% fervente e armazenado em congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, para processamento posterior.

O material imerso em etanol 80% foi homogeneizado (homogeneizador Marconi TE 102) até a obtenção de polpa fina. Seguiram-se mais 4 extrações sucessivas com etanol a 80%, em banho maria em ebulição, durante uma hora cada. Após cada extração, o material foi centrifugado a 15.000 g, durante 10 min. Os extratos alcoólicos foram combinados, sendo o etanol eliminado por evaporação à vácuo, à temperatura de $45\text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, procedeu-se a remoção dos pigmentos e lípidios, por meio de quatro extrações sucessivas com igual volume de clorofórmio, em funil de decantação. A fase aquosa foi evaporada a vácuo, a $45\text{ }^\circ\text{C}$, até a secura. O resíduo foi dissolvido em 10 mL de água desmineralizada, seguido de uma centrifugação a 15.000 g, durante 15 min, e filtração em papel Whatman nº 1. Esse extrato aquoso (extrato I) foi congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o processamento posterior ([Wang & Waygood, 1962](#)).

O N-nítrico foi determinado no extrato I, em ensaio colorimétrico, por meio da reação de nitração do ácido salicílico, conforme protocolo de [Cataldo et al. \(1975\)](#).

Determinação da atividade Redutase do Nitrato (RN)

O extrato enzimático bruto foi obtido por maceração de cerca de 1 g de tecido, em almofariz de porcelana, em 10 mL do seguinte meio de extração: tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 0,5 mM e b-mercaptoetanol 10 mM ([Dougall, 1974](#)). Após filtração através de 4 camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g, durante 15 min. Utilizou-se o sobrenadante como extrato bruto para a determinação da atividade enzimática. Todos os equipamentos e todas as soluções foram mantidos entre as temperaturas de $0\text{ }^\circ\text{C}$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

Para a determinação da atividade da redutase do nitrato (ARN), adicionou-se 0,2 mL do extrato enzimático bruto a 1,8 mL de um meio de reação constituído de 200 mmoles de tampão Tris-HCl pH 7.5, 20 mmoles de KNO_3 , 0,1 mmol de NADH e 0,1 mL de Triton X-100 1% ([Lewis et al., 1982b](#)). Após a incubação

da mistura à temperatura de 30 °C, durante 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de sulfanilamida 1% em HCl 3 N e para a reação de cor acrescentou-se 1,0 mL de N-naftiletilenodiamino 0,01% ([Ingemarsson et al., 1987a](#)). Determinou-se o nitrito produzido pela medição de absorvância a 540 nm ([Jaworski, 1971](#)), expressando-se a atividade enzimática em $\text{mmoles de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MS} \cdot \text{min}^{-1}$.

Resultados e Discussão

A maior atividade da redutase do nitrato (ARN) nas folhas foi observada quando houve combinação de nitrato e amônio, atingindo seu ápice na proporção 50/50, sugerindo um efeito estimulador do NH_4^+ na atividade da RN quando na presença de NO_3^- ([Figura 1](#)). Esses resultados são corroborados por alguns autores que têm relatado efeito estimulador do amônio sobre a ARN ([Oaks, 1982](#); [Oaks et al., 1982](#); [Skoczek, 1992](#)). [Skoczek \(1992\)](#) determinou que NH_4NO_3 estimula a ARN de folhas de cevadas. [Oaks et al. \(1982\)](#) determinaram em folha de milho, que o NO_3^- é responsável pela indução do precursor da PRN e em altas concentrações pela ativação desse precursor. A adição de NH_4^+ ao sistema, também, permite a indução do precursor PRN e o desenvolvimento da ARN, resultado semelhante foi encontrado por [Sihag et al. \(1979\)](#) em folha de ervilha. Segundo [Srivastava \(1980\)](#) o amônio estimula a ARN por meio de um aumento na concentração de aminoácidos, devido a detoxificação de amônio do meio externo, havendo, conseqüentemente, um aumento da concentração de proteínas, entre elas a PRN. Tal hipótese foi comprovada por [Campbell & Remmler \(1986\)](#), que trabalhando com milho, demonstraram que NH_4NO_3 foi tão ou mais efetivo que KNO_3 no estímulo da síntese de PRN. Além disso, tem sido relatado que a RN de plantas cultivadas em NH_4NO_3 é mais resistente a extração e a purificação do que aquelas que foram cultivadas somente em NO_3^- ([Datta et al., 1981](#)).

Neste experimento observou-se que houve uma tendência de crescimento da concentração de nitrato na parte aérea, quando ambas as formas de N estavam presentes, seguida de queda quando da presença de 100% de NH_4^+ . [Silveira & Sant'Anna \(1988\)](#), trabalhando com capim colômbio em casa de vegetação, encontraram resultado semelhante. Isso não significa uma contradição pois, segundo alguns autores ([Nambiar et al., 1988](#); [Oscarson et al., 1987](#); [Hoff et al., 1992](#)) o "pool" celular de nitrato não está necessariamente relacionado com a atividade da RN. Tais resultados sugerem que houve uma saturação da RN da folha e acúmulo de nitrato no vacúolo para posterior utilização conforme descrito por [Lewis et al. \(1982b\)](#).

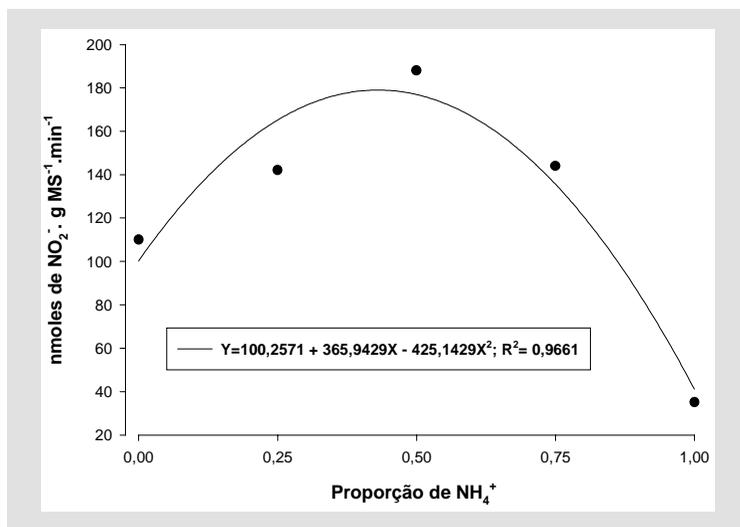


Figura 1. Efeito da proporção de amônio na atividade da redutase do nitrato em folhas de *Panicum maximum* cv. Vencedor cultivadas em solução nutritiva.

Tabela 2. Concentração de nitrato na parte aérea e sistema radicular de plantas de *Panicum maximum* cv. Vencedor submetidas a diferentes proporções amônio/nitrato.

Proporção $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$	mg N-nítrico/g MS		
	Parte aérea	Sistema radicular	Planta inteira
0/100	11.99	18.44	12.81
25/75	13.18	14.02	13.29
50/50	13.13	12.98	13.05
75/25	12.02	13.13	12.15
100/0	3.87	4.29	3.92

A concentração de nitrato na planta inteira permanece praticamente constante em todos os tratamentos havendo queda somente a 100% de NH_4^+ (Tabela 2) Isso sugere um estímulo da absorção e translocação de NO_3^- pelo amônio a fim de repor aquele que foi reduzido, conforme detectado por [Silveira et al. \(1985\)](#) e relatado por [Cox & Reisenauer \(1973\)](#). O transporte de nitrato para a parte aérea pode estar envolvido com o aumento da ARN, uma vez que o fluxo de nitrato desempenha função maior no controle da atividade da RN do que o conteúdo celular do mesmo ([Nambiar et al., 1988](#); [Hoff et al., 1992](#)).

A queda da atividade da RN, observada a partir de 50% de amônio na solução nutritiva ([Figura 1](#)), pode ser resultado da diminuição da concentração externa de nitrato, uma vez que esse ânion é um dos principais fatores que controlam a atividade da RN ([Srivastava, 1980](#)). Evidentemente, não se pode descartar a possibilidade de o amônio estar atingindo uma concentração intracelular elevada o suficiente para causar toxidez à planta. Uma vez que a toxidez do amônio provoca redução na síntese protéica e de amido, além de desacoplar a fosforilação em cloroplastos ([Lea & Fowden, 1975](#)).

A presença de nitrato nas plantas tratadas com 100% de amônio é, provavelmente, devido ao pré-tratamento com uma solução 100% de nitrato. Sendo que a RNA encontrada nessas plantas indica que esse nitrato está sendo redistribuído à medida que é necessário.

No sistema radicular pode-se observar uma queda na concentração de nitrato quando se passa da proporção 0/100 NH_4^+ / NO_3^- para 25/75, que se manteve similar até 75/25, caindo bruscamente a 100/0 ([Tabela 2](#)). Não se detectou ARN *in vitro* na raiz o que sugere incapacidade, ou capacidade extremamente baixa, das plantas em assimilar nitrato nessa parte da planta ([Andrews, 1986](#); [Nambiar et al., 1988](#)) ou presença de proteases específicas liberadas no extrato radicular ([Ingemarsson et al., 1987b](#)).

Conclusões

1. A concentração de nitrato na parte aérea é superior nas plantas que recebem ambas as fontes de nitrogênio, e no sistema radicular houve tendência de decréscimo quando da presença de amônio.
2. A atividade *in vitro* da RN é detectada somente na parte aérea com aumentos significativos quando lhe são fornecidas ambas as fontes de nitrogênio, o que indica certa ação estimulatória do íon amônio na atividade da enzima.
3. A alta concentração de nitrato na parte aérea indica que houve saturação dessa enzima pelo seu substrato.

Referências Bibliográficas

ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between shoot of higher plants. **Plant, Cell Environment**, Oxford, v. 9, p. 511-519, 1986.

- BEEVERS, L. Nitrogen nutrition. In: BEEVERS, L. **Nitrogen metabolism in plants**. London: Edward Arnold, 1976. p. 1-27.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHREDER, L. E. ; YOUNGS, U. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 23, p. 458-460, 1975.
- COX, W. J.; REISENAUER, H. Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. **Plant and Soil**, The Hague, v. 38, p. 363-380, 1973.
- DATTA, N.; RAO, L. V. M.; GUHA-MUKHERJEE, S.; SOPORY, S. K. Regulation of nitrate reductase activity by ammonium in wheat. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 20, p. 305-313, 1981.
- DEANNE-DRUMMOND, C. E.; GLASS, A. D. Short-term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}Cl_3^-$: II. regulation of efflux by NH_4^+ . **Plant Physiology**, Bethesda, v. 73, p. 105-110, 1983.
- DOUGALL, D. K. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, New York, v. 58, p. 639-646, 1974.
- HOFF, T.; STUMMANN, B. M.; HENNINGSSEN, K. W. Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 616-624, 1992.
- INGEMARSSON, B.; OSCARSON, P.; AF UGGLAS, M. LARSSON, C. M. Nitrogen utilization in *Lemna*. II - Studies of nitrate uptake using $^{13}NO_3^-$. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 85, p.860-864, 1987a.
- INGEMARSSON, B.; OSCARSON, P.; AF UGGLAS, M. LARSSON, C. M. Nitrogen utilization in *Lemna*. III. Short-term effects of ammonium on nitrate uptake and nitrite reduction. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 85, p. 865-867, 1987b.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, New York, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

KLEINHOF, A.; WARNER, R. L.; MELZER, J. M. Genetics and molecular biology of higher plant nitrate reductase. In: POULTON, J. E.; ROMEO, J. T., CONN, E. **Recent advances in phytochemistry**: plant nitrogen metabolism. New York: Plenum Press, 1989. p. 117-155.

LA HABA, P.; AGUERA, E.; MALDONADO, J. M. Development of nitrogen-assimilation enzymes in sunflower cotyledons during germination as affected by the exogenous nitrogen source. **Planta**, New York, v. 173, p. 52-57, 1988.

LEA, P. J.; FOWDEN, L. The purification of glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from *Lupinus albus*. **Proceedings of Royal Society of London**, Series B, London, v. 192, p. 13-26, 1975.

LEWIS, O. A. M.; JAMES, D. M.; HEWITT, E. J. Nitrogen assimilation in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in response to nitrate and ammonium nutrition. **Annals of Botany**, London, v. 49, p. 39-49, 1982a.

LEWIS, O. A. M.; WATSON, E. F.; HEWITT, E. J. Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. **Annals of Botany**, London, v. 49, p. 32-37, 1982b.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; JIMENEZ, E. S. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 76, p. 536-540, 1984.

NAMBIAR, P. T. C.; REGO, T. J.; RAO, B. S. Nitrate concentration and nitrate reductase activity in the leaves of three legumes and three cereals. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 112, p. 547-553, 1988.

OAKS, A. A Re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **BioScience**, Washington, v. 42, p. 103-111, 1992.

OAKS, A.; POULLE, M.; GOODFELLOW, V. J.; CASS, L. A.; DEISING, H. The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 88, p. 1067-1072, 1982.

OSCARSON, P.; INGEMARSSON, B.; AF UGGLAS, M.; LARSSON, C-M. Short-term studies of NO_3^- uptake in *Pisum sativum* using $^{13}NO_3^-$. **Planta**, New York, v. 170, p. 550-555, 1987.

REMMER, J. L.; CAMPBELL, W. H. Regulation of corn leaf nitrate reductase. II. Synthesis and turnover of the enzyme's activity and protein. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 80, p. 442-447, 1986.

RUFTY JUNIOR, T. W. THOMAS, J. F., REMMLER, J. L.; CAMPBELL, W. H.; VOLK, R. J. Intercellular localization of nitrate reductase in roots. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 82, p. 675-680, 1986.

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

SIHAG, R. K., GUHA-MUKHERJEE, S.; SOPORY, S. K. Effect of ammonium, sucrose and light on the regulation of nitrate reductase level in *Pisum sativum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 45, p. 281-287, 1979.

SILVEIRA, J. S. M.; SANT'ANNA, R. Efeitos de nitrato e amônio no crescimento e fracionamento do nitrogênio em capim colômbio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 135-143, 1988.

SILVEIRA, J. S. M.; SANT'ANNA, R.; RENA, A. B.; GARCIA, R. Transporte de nitrogênio em função de várias proporções de nitrato e amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 15-23, 1985.

SKOCZEK, H. Nitrate reductase activity and protein content in leaves and roots of two doubled haploid barley lines depending on seedlings age and nitrogen source. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 14, p. 77-84, 1992.

SRIVASTAVA, H. S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 725-733, 1980.

STTIT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiology and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 22, p. 583-621, 1999.

TAKÁCS, E.; TÉCSI, L. Effects of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsium annuum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 298-305, 1992.

WAKHALOO, J. L.; STAUDT, A. Development of nitrate reductase activity in expanding leaves of *Nicotiana tabacum* in relation to the concentration of nitrate and potassium. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 87, p. 258-263, 1988.

WANG, D.; WAYGOOD, F. R. Carbon metabolism of C^{14} -labeled aminoacids in wheat leaves. I. A pathway of glyoxilate-serine metabolism. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 37, p. 826-832, 1962.