



ISSN 0104-866X

Agosto, 2009

*empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 195

Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara
Sônia Regina de Sousa
Gustavo Ribeiro Xavier
Maurisrael de Moura Rocha
Norma Gouvêa Rumjanek*

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2009



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires,
Caixa Postal: 01
CEP 64006-220 Teresina, PI.
Fone: (86) 3089-9100
Fax: (86) 3089-9130
Home page: www.cpamn.embrapa.br
Email: sac@pamn.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Flávio Flavaro Blanco*,
Secretária Executiva: *Luísa Maria Resende Gonçalves*
Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio Mendonça Diniz, Cristina
Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro
Azevêdo, Carlos Antônio Ferreira de Sousa, José Almeida Pereira e Maria
Teresa do Rêgo Lopes*

Supervisor editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*
Revisor de texto: *Lígia Maria Rolim Bandeira*
Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*
Editoração eletrônica: *Jorimá Marques Ferreira*

1ª edição

1ª impressão (2009): 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).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio-Norte**

Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a
eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas / Rosa
Maria Cardoso Mota de Alcantara ... [et al.]. - Teresina : Embrapa Meio-
Norte, 2009.

39 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-
866X ; 195).

1. Fisiologia vegetal. 2. Metabolismo vegetal. 3. Nitrogenase. 4.
Absorção de nutriente. I. Alcantara, Rosa Maria Cardoso Mota de. II.
Embrapa Meio-Norte. III. Série.

CDD 581.1 (21. ed.)

© Embrapa, 2009



Autores

Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara

Engenheira agrônoma, M.Sc. em Agronomia,
pesquisadora da Embrapa Meio-Norte e doutoranda
do Curso de Agronomia, Ciência do Solo - UFRRJ,
Teresina, PI
rmaria@cpamn.embrapa.br

Sônia Regina de Souza

Engenheira agrônoma, D.Sc. em Agronomia (Nutrição
de Plantas), professora da Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, RJ
soniabq@ufrj.br

Gustavo Ribeiro Xavier

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Ecologia Microbiana
Molecular, pesquisador da Embrapa Agrobiologia,
Seropédica, RJ
gustavo@cnpab.embrapa.br



Maurisrael de Moura Rocha

Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas,
pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI
mmrocha@cpamn.embrapa.br

Norma Gouvêa Rumjanek

Bioquímica farmacêutica, Ph.D. em Clínica Farmacêutica, pesquisadora da
Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ
norma@cnpab.embrapa.br





Apresentação

As adubações nitrogenadas que se fazem necessárias para incrementar a produtividade agrícola têm o lado negativo de provocarem danos ambientais, pela contaminação do solo e da água, além de constituírem importante fator de aumento do custo de produção. Estudos realizados há algumas décadas indicaram a existência da diversidade genética e, portanto, a possibilidade de seleção de materiais com maior eficiência no uso de nitrogênio. A busca dessas plantas constitui preocupação dos cientistas. Essa não é uma tarefa fácil, dada o elevado número de fatores ambientais que interferem no metabolismo do nutriente.

As modernas técnicas de biologia molecular são aliadas de peso dos pesquisadores, que conjuntamente com estudos bioquímicos e fisiológicos podem resultar em importantes avanços relativos ao aumento da eficiência do uso de nitrogênio pelas plantas.

A presente publicação discorre sobre os progressos relativos ao tema, sem deixar de considerar também as perspectivas de ações futuras, cujos resultados trarão benefícios econômicos e ambientais.

Hoston Tomás Santos do Nascimento
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte



Sumário

Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas	9
Introdução	9
Absorção do nitrogênio pelas plantas	11
Assimilação do nitrogênio pelas plantas	14
Ação das enzimas na eficiência de uso do nitrogênio	16
Identificação de genes relacionados à eficiência de uso do nitrogênio	21
Genes envolvidos na absorção do nitrato	21
Genes envolvidos na absorção do amônio	23
Estudos genéticos da eficiência de uso do nitrogênio	24



Varição da eficiência de uso de nitrogênio em gramíneas e leguminosas	26
Considerações finais	32
Referências	33





Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas

*Rosa Maria Cardoso Mota de Alcantara
Sônia Regina de Sousa
Gustavo Ribeiro Xavier
Maurisrael de Moura Rocha
Norma Gouvêa Rumjanek*

Introdução

O nitrogênio (N) é considerado elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (HARPER, 1994). É um dos elementos minerais requerido em maior quantidade e em muitos sistemas de produção. Sua disponibilidade é quase sempre um fator limitante, influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente.

A maior fração do N no solo está na forma orgânica e seu aporte ocorre por deposições atmosféricas, fixação biológica, adubações químicas e orgânicas. No entanto, em razão da sua alta mobilidade, está sujeito a muitas perdas em decorrência de inúmeros fatores dos muitos processos aos quais está sujeito, tais como lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de N_2 , N_2O e outros óxidos de nitrogênio (CANTARELLA, 2007).

¹Trabalho de revisão apresentado pela primeira autora, no exame de qualificação do Curso de Doutorado em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



10 | *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

Dada a sua importância e a alta mobilidade no solo, o nitrogênio tem sido intensamente estudado, no sentido de maximizar a eficiência do seu uso. Para tanto, as pesquisas com N em sua maioria buscam formas de diminuir suas perdas no solo, bem como melhorar sua absorção e metabolismo no interior da planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

A eficiência de uso do nitrogênio refere-se ao grau de recuperação desse elemento pelas plantas, considerando as perdas que geralmente ocorrem. Normalmente, menos de 50 % do nitrogênio aplicado sob a forma de fertilizante é utilizado pelas culturas (PEOPLES; HERRIDGE; LADHA, 1995).

Existem diversos caminhos possíveis para se aumentar a eficiência de uso do nitrogênio. Uma alternativa simples é a diminuição nas doses de adubos para níveis que sejam produtivos e seguros (FERNÁNDEZ et al., 1998). Outra possibilidade é o melhoramento genético, como é o caso de várias culturas cujo melhoramento visa a obtenção de cultivares mais produtivos para solos pobres em N (MACHADO, 1997; SANTOS et al., 1998).

Absorção do nitrogênio pelas plantas

A passagem de nitrato (NO_3^-) e de amônio (NH_4^+) por meio membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz ocorre por meio de transportadores específicos para essas formas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

Após a entrada na célula, o nitrato pode ser reduzido a nitrito (NO_2^-) no citosol, através da enzima nitrato redutase (NR - EC. 1.6.6.1) e, logo a seguir, convertido a NH_4^+ no plastídio, através da enzima nitrito redutase. O amônio é, então, incorporado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase (GS - EC. 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT - EC. 1.4.1.13), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos e seus metabólitos (CRAWFORD, 1995). Alternativamente, o NO_3^- e o NH_4^+ podem ser transportados por carregadores específicos através do tonoplasto e armazenados no vacúolo, para posteriormente serem reduzidos no citosol da mesma célula ou serem translocados inalterados para a parte aérea da planta.

A absorção de N através da membrana plasmática é mediada por dois tipos de carregadores (VON WIRÉN; GAZZARRINI; FROMMER, 1997), os de baixa afinidade (Low Affinity Transport System - LATS) e os de alta afinidade (High Affinity Transport System - HATS). Os LATS operam quando a concentração externa de N é alta e são caracterizados por serem constitutivos e não sujeitos à regulação. Os HATS atuam sob baixas concentrações externas de N e podem ser constitutivos (Constitutive High Affinity Transport System - CHATS) ou induzidos pela exposição ao N (Inducible High Affinity Transport System - IHATS) (LEA, 1993).

O transporte do nitrato, sob concentrações externas inferiores a 100-200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ocorre via carregadores de alta afinidade (HATS), com um K_m entre 7 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Acima dessas concentrações, a absorção de nitrato ocorre pelos carregadores de baixa afinidade (LATS), com K_m maior que 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (VON WIRÉN; GAZZARRINI; FROMMER, 1997).



12 | *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

A absorção do amônio é mediada pelo HATS quando a concentração externa deste íon é menor que $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que o LATS é responsável pela absorção de amônio em concentrações externas superiores a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (VON WIRÉN; GAZZARRINI; FROMMER, 1997).

Nesse contexto, a absorção de N é modulada pela presença dos carregadores específicos; pela afinidade desses carregadores em relação ao nitrato ou amônio; pela quantidade de N presente no solo.

A quantidade de N absorvida varia durante o ciclo de desenvolvimento da planta em função da quantidade de raízes e da taxa de absorção por unidade de peso de raiz. Essa quantidade aumenta progressivamente durante o período de desenvolvimento vegetativo, atinge o máximo durante os estádios reprodutivos e cai na fase de enchimento dos grãos (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

Segundo Imsande e Touraine (1994) os fatores intrínsecos à planta têm papel relevante nesse processo, como pode ser verificado nos mecanismos do ciclo de aminoácidos entre o colmo e a raiz e o suprimento de carboidratos às raízes.

Considerando que o nível de aminoácidos no floema da raiz regula a absorção e a assimilação de nitrogênio pela planta, durante o rápido crescimento vegetativo, Imsande e Touraine (1994) observaram que são altas as taxas de redução de nitrato e síntese de aminoácidos nas folhas, onde é utilizada a maioria dos aminoácidos para a síntese de clorofila, rubisco e outras proteínas e, com isso, é baixo o nível de aminoácidos no floema que entra nas raízes.

Por outro lado, durante a fase reprodutiva, diminui a taxa de redução de nitrato, em função da remobilização do N foliar para o desenvolvimento das inflorescências, aumenta a exportação de aminoácidos das folhas, enriquecendo, com esses compostos, o floema que entra nas raízes. O mecanismo proposto sugere que esses aminoácidos provocam uma redução



na taxa de absorção de NO_3^- . É provável que os altos níveis de aminoácidos nas raízes inibam a ação dos transportadores de NO_3^- na membrana e a síntese da enzima NR (LEA, 1997).

A absorção de nitrogênio pode ser modulada pelo suprimento de carboidratos às raízes que atuam no processo de transporte de íons pelas membranas, os quais são dependentes de energia. Os carboidratos provindos da parte aérea disponibilizam a energia para esse processo, como mostrado por Huppe e Turpin (1994), em trigo. Esses autores mostraram que a capacidade das raízes em absorver nitrogênio esteve diretamente correlacionada com o suprimento de carboidratos. Isso explica, em parte, a variação diária na taxa de absorção de N nas plantas em função da maior disponibilidade de carboidratos na presença de luz.

Nesse mesmo contexto, um estudo detalhado foi realizado em soja por Touraine, Muller e Grignon (1992), no qual foi realizado o incremento do suprimento de carboidratos às raízes com a adição de malato e a diminuição dos carboidratos com o corte do hipocótilo. A adição de malato ao meio de cultivo praticamente dobrou a taxa de absorção de NO_3^- , enquanto que o corte do hipocótilo resultou na diminuição gradativa da taxa de absorção de nitrato, ou seja, ambos os tratamentos afetaram a disponibilidade energética.

Segundo Vessey, Raper e Henry (1990), o suprimento de energia também é modificado quando é alterada a taxa de translocação de carboidratos para as raízes. Assim, se no decorrer do desenvolvimento de uma planta, houver emissão de uma nova folha, grande parte dos carboidratos é direcionada para o desenvolvimento do novo órgão, e então há uma diminuição na taxa de translocação desses compostos para o sistema radicular, diminuindo a disponibilidade de energia nas raízes, o que reduz a taxa de absorção de nitrogênio.



Assimilação do nitrogênio pelas plantas

A assimilação do N compreende os processos de redução do nitrato a amônio e a incorporação do amônio em aminoácidos. A taxa e a quantidade de nitrogênio assimilado pelas plantas durante o seu ciclo dependem da atividade das enzimas envolvidas no ciclo desse nutriente e da disponibilidade de energia necessária para os processos de assimilação.

A assimilação do N pelas plantas além de ser regulada pelas enzimas do ciclo desse elemento, também é regulada pela disponibilidade energética, pois é um processo altamente exigente em termos de energia. O processo de conversão requer a transferência de dois elétrons por NO_3^- convertido em NO_2^- , seis elétrons por NO_2^- convertido em NH_4^+ e dois elétrons e um ATP por molécula de NH_4^+ convertida em glutamato (BLOOM; SUKRAPANNA; WARNER, 1992). Disso decorre que a assimilação do NO_3^- demanda mais energia, em comparação à assimilação do NH_4^+ , e isso é comprovado com as maiores taxas de liberação de CO_2 respiratório no processo de assimilação do nitrato (WEGER; TURPIN, 1989).

A exigência energética da assimilação do amônio é menor do que a exigência energética para a assimilação do nitrato, em razão do primeiro não precisar ser reduzido para sua incorporação em aminoácidos. Bloom, Sukrapanna e Warner (1992) observaram em cevada que o metabolismo do NO_3^- consumiu 23 % de toda energia produzida na raiz, em comparação aos 14 % exigidos para o metabolismo do NH_4^+ .

O aproveitamento dessa vantagem energética orientou a criação de programas de seleção de linhagens de milho (*Zea mays*) com maior eficiência na utilização do NH_4^+ . O pressuposto para essa orientação foi que as plantas supridas com amônio exigem menos energia para crescer e, em decorrência, o número de plantas por área pode ser aumentado, resultando em maior produtividade líquida. Para tanto, as plantas necessitam ter alta atividade da GS e GOGAT, e



o NH_4^+ deve ser a forma do fertilizante aplicado ao solo e preferencialmente assimilada pela planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

Com relação à disponibilidade energética para a assimilação do N, além de ser considerada a fonte de N fornecida às raízes, deve ser considerado também o local da assimilação. O nitrogênio, uma vez absorvido, pode ser assimilado na própria raiz ou ser transportado para as folhas, onde, então, ocorre a sua assimilação. Nas folhas, a energia para as reações de assimilação do nitrogênio é gerada nos cloroplastos pela fotossíntese, no citosol pela glicólise, e nos mitocôndrios pelo ciclo do ácido tricarbóxico no processo de respiração (HUPPE; TURPIN, 1994). Nos cloroplastos, as reações catalisadas pela NR e GOGAT exigem a redução da ferredoxina, o que é feito pelo sistema de transporte não-cíclico de elétrons (CRAWFORD, 1995).

Quando o nitrogênio é metabolizado nas raízes, a energia é gerada no citosol, através do ciclo das pentoses e da glicólise, e nos mitocôndrios pelo ciclo do ácido tricarbóxico. A ferredoxina, para as reações que envolvem a NR e a GOGAT, é reduzida no citosol pelo NADPH produzido pelo ciclo das pentoses (CRAWFORD, 1995). Nas raízes, existe a necessidade de importação de carboidratos produzidos nas folhas para, após serem metabolizados, gerar energia e fornecer esqueletos de carbono para o processo de incorporação do nitrogênio em aminoácidos (OAKS, 1994).

Harper (1994) cita que em estudo comparativo com a cultura do milho foi verificado que os custos energéticos para a conversão de NO_3^- em glutamato, em tecidos verdes (folhas) e em tecidos não-verdes (raízes) variavam. A assimilação de uma molécula de NO_3^- em aminoácidos nas raízes consumiu a energia equivalente à absorção de 35 fótons, enquanto que nas folhas esse mesmo processo consumiu a energia equivalente à absorção de 20 fótons. Essa vantagem energética é a base da sugestão da seleção de linhagens que maximizem a redução de NO_3^- nas folhas, visando reduzir as exigências energéticas e aumentar a produtividade.



Ação das enzimas na eficiência de uso do nitrogênio

Componentes fisiológicos como a atividade das enzimas envolvidas no processo de assimilação: nitrato redutase (NR), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT), têm sido propostos como critério auxiliar na seleção de cultivares eficientes no uso do nitrogênio (FURTINI, 2008). Cregan e Berkun (1984), em estudos genéticos sobre o metabolismo do N, concluíram que os atributos fisiológicos e bioquímicos relacionados a esse metabolismo deveriam ser incorporados à seleção de plantas para a eficiência de uso do nitrogênio.

A nitrato redutase é a primeira enzima na cadeia de redução do nitrogênio dentro do processo de assimilação do N nas plantas (PURCINO; MAGNAVACA; MACHADO, 1994). Por causa do seu papel regulador, a atividade da NR está relacionada, indiretamente, com a produtividade das culturas. Isso com base na pressuposição de que plantas com alta atividade da NR possuem maior capacidade de assimilar o nitrato disponível e, em consequência, maior capacidade em responder à adubação nitrogenada.

Vários trabalhos experimentais foram conduzidos para testar essa hipótese e para avaliar a possibilidade de se utilizar a atividade dessa enzima como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de genótipos mais produtivos ou mais eficientes no uso do nitrogênio (HAGEMAN; LAMBERT, 1988; HAGEMAN; LENG; DUDLEY, 1967; MACHADO; MAGALHÃES, 1995; PURCINO; MAGNAVACA; MACHADO, 1994).

No final da década de 60, várias pesquisas avaliaram a possibilidade de selecionar híbridos de milho mais produtivos em função da maior atividade da NR. Essa linha de pesquisa foi desenvolvida principalmente por Beevers e Hageman (1969), que verificaram o aumento da atividade da NR com a adição de NO_3^- ao meio de cultivo em inúmeras espécies de plantas. Essa ideia foi reforçada pelas correlações positivas entre produtividade de grãos de híbridos de milho e atividade da NR obtidas por Deckhard, Lambert e Hageman (1973).

Essas correlações, embora significativas, foram baixas, indicando que a assimilação de NO_3^- não era influenciada apenas pela atividade da NR.

Posteriormente, trabalhos como os de Fakorede e Mock (1978) e Eichelberger et al. (1989) não mostraram aumentos de produtividade de híbridos de milho associados com aumentos na atividade da enzima NR e concluíram que a atividade dessa enzima não era um critério adequado para ser utilizado como parâmetro no melhoramento, e tampouco como indicativo de alta eficiência na assimilação do N.

Purcino et al. (1990) observaram que materiais com alta atividade da NR tendiam a ser responsivos à adubação nitrogenada e, eficientes no uso do N, em ambientes com baixo teor desse nutriente, enquanto que materiais que só produziam bem quando adubados tendiam a ter baixa atividade dessa enzima. Feil, Thiraporn e Stamp (1993) encontraram correlação positiva entre a atividade da NR em plântulas e a produtividade de grãos em milho.

Purcino, Magnavaca e Machado (1994) avaliaram a atividade da NR em genótipos modernos e antigos de milho, desenvolvidos em dois níveis de nitrogênio, e observaram que as cultivares modernas apresentavam melhores produtividades, mas a atividade da NR não apresentou correlação com a produção.

Por outro lado, Machado e Magalhães (1995) verificaram que na variedade de milho, Nitrodente, a atividade da NR não foi modificada pela seleção para baixos níveis de N e que em populações da cultivar Nitroflint houve uma tendência de diminuição na atividade da NR quando a seleção foi efetuada sob condições de estresse de N.

Os resultados inconsistentes das pesquisas que buscavam a associação entre a atividade enzimática da NR e a capacidade de assimilação de N pelas plantas, conduziram à hipótese de que a atividade das enzimas GS e GOGAT estaria mais relacionada a essa capacidade. O pressuposto foi que os genótipos



18 *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

eficientes no uso do nitrogênio seriam aqueles com alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos, por meio das enzimas GS e GOGAT.

Dembinski, Rafalski e Wisniewska (1991) verificaram que a seleção para alto teor proteico em milho foi acompanhada pelo incremento da atividade da GS no endosperma. As enzimas NR e GS foram eficientes para discriminar famílias endogâmicas submetidas a diferentes regimes de N, podendo ser utilizadas como características bioquímicas em programas de melhoramento genético de milho visando à eficiência de uso do nitrogênio.

Machado et al. (1992) mostraram uma correlação igual a 0,68 entre a atividade da enzima GS e a produção de grãos de genótipos de milho. Trabalhos posteriores, desenvolvidos por Machado e Magalhães (1995) e Magalhães e Machado (1995), indicaram que a determinação da atividade da enzima GS poderia ser utilizada como um parâmetro auxiliar na seleção de genótipos mais eficientes na utilização do nitrogênio

No entanto, trabalhos realizados por Machado et al. (1992), Magalhães et al. (1993), Reggiani et al. (1999) e Hirel et al. (2001) comprovaram que existe variabilidade genética para a atividade da GS e que o uso generalizado desse parâmetro fica limitado pelo fato de que a assimilação do amônio em aminoácidos só é limitante quando apenas essa forma de N é suprida às raízes e/ou quando a quantidade absorvida excede a capacidade assimilatória da planta (HARPER, 1994).

Com o objetivo de identificar parâmetros que fossem utilizados em programas de melhoramento genético em milho para uso eficiente de N, Machado, Sodek e Fernandes (2001) testaram duas cultivares de milho, contrastantes, quanto ao uso desse nutriente e concluíram que a atividade das enzimas GOGAT (reação da transferase) e NR não foi eficiente para discriminar as cultivares em estudo.

Hirel et al. (2001), com o objetivo de analisar as bases genéticas do uso eficiente de N em genótipos de milho, desenvolveram um estudo com

abordagem genética quantitativa por associação com funções metabólicas e características agrônômicas com marcadores de DNA. Avaliaram características fisiológicas como teor de nitrato, atividade da NR e da GS e verificaram variações genotípicas para as características avaliadas e correlação positiva entre teor de nitrato, atividade da GS e produtividade. Por outro lado, foram observadas correlações negativas entre a atividade da NR e demais componentes. Os resultados obtidos sugeriram que o aumento na produtividade foi devido à habilidade dos genótipos em acumular nitrato nas folhas durante o desenvolvimento vegetativo e também, à eficiente remobilização do N armazenado durante o enchimento dos grãos.

Esses autores também verificaram coincidências nos locos com características quantitativas (QTLs) para a produtividade de grãos, atividade da GS, atividade da NR e teor de nitrato e concluíram que a acumulação de nitrato nas folhas e as reações catalisadas pelas enzimas, NR e GS, são correguladas e representam elementos chaves no controle do uso eficiente do nitrogênio.

Estudos de correlação entre os diferentes componentes da eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e produção de milho têm sido efetuados com o objetivo de identificar os componentes do processo, as regiões cromossômicas e os genes candidatos que podem controlar a produção e seus componentes direta e indiretamente, quando a quantidade de N fornecido a planta é variável (HIREL et al., 2007).

Bertin e Gallais (2001) verificaram que a maioria das regiões cromossômicas para produção, composição dos grãos e características relacionadas à EUN, detectadas em baixo nível de N, correspondiam a QTLs detectados sob alto nível de N. Agrama et al. (1999), utilizando marcadores moleculares para identificar QTLs associados à EUN, detectaram mais QTLs em baixo nível de N.

Obara et al. (2001), em similar linha de pesquisa desenvolvida por Hirel et al. (2001), observaram QTLs coincidentes para características de produtividade da cultura do arroz e um gene estrutural para GS1. Esses resultados sugerem



20 | *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

que é possível que o gene GS1 possa representar um componente-chave para o uso eficiente de N e produtividade de grãos.

Habash et al. (2001) observaram que resultados com trigo sugeriram que a adição extra do gene GS não conduziu ao aumento da quantidade de GS. Porém, uma análise detalhada dos componentes da GS de folhas de trigo mostrou que existe um balanço das atividades de GS1 e GS2, ou seja, tanto a atividade da GS1 como da GS2 influenciam a quantidade da GS.

Majerowicz et al. (2002) estudaram a variabilidade genética das enzimas NR e GS, o teor de pigmentos fotossintéticos e o acúmulo de massa seca em plantas jovens de milho crioulo e variedades melhoradas em solos férteis e pobres em N. Concluíram que a deficiência de N afetou de modo muito mais intenso o crescimento da parte aérea em todos os genótipos. As características bioquímicas estudadas (atividades das enzimas NR e GS e conteúdo de pigmentos fotossintéticos) foram sensíveis à disponibilidade de N, mas não permitiram discriminar diferenças genotípicas. A massa seca das plantas deficientes em N apresentou elevada correlação positiva ($r = 0,86$) com a massa seca acumulada nas raízes dos diferentes genótipos. Esses resultados sugerem a importância do estudo das características morfológicas e fisiológicas do sistema radicular na seleção de genótipos eficientes quanto ao uso do nitrogênio.

A GS tem uma importante característica que é sua alta afinidade com o amônio que permite uma eficiente incorporação dessa forma de nitrogênio. Seu papel no metabolismo do N depende do local onde ocorre a reação, sendo o seu controle de regulação múltiplo e sua atividade dependente do nível de proteína e dos genes envolvidos. A GS, em conjunto com outras enzimas, possibilita o balanço do carbono e o metabolismo do N em diferentes partes da célula, em diferentes tempos, em diferentes órgãos e sob diferentes condições ambientais (MIFLIN; HABASH, 2002).

Identificação de genes relacionados à eficiência de uso do nitrogênio

Genes envolvidos na absorção do nitrato

As plantas são hábeis em acumular nitrato em altas concentrações, a maioria dos quais concentrados nos vacúolos, e possuem capacidade de se desenvolverem, com sucesso, em uma ampla faixa de nitrato disponível (DE ANGELI et al., 2006). Sob essa ótica, a absorção de nitrato pelas raízes não é um processo simples. Ocorre por meio de sistemas de absorção de alta (HATS) e baixa afinidades (LATS), sendo: constitutivos de alta afinidade (cHATS); passíveis de indução de alta afinidade (iHATS), constitutivos de baixa afinidade (cLATS) e passíveis de indução de baixa afinidade (iLATS) (GLASS, 2003; OKAMOTO et al., 2006).

Conforme Lea e Azevedo (2006), já foram identificadas em *Arabidopsis* duas famílias de genes que codificam para os transportadores de nitrato, denominados de NRT1 (*Nitrate transporter*) e NRT2. Os genes NRT1 têm uma ampla faixa de substratos com afinidades que incluem os LATS e transportadores de nitrato com dupla afinidade (GUO; WANG; CRAWFORD, 2002). Os estudos de expressão de genes e mutantes evidenciam que as proteínas de NRT2 contribuem para os iHATS (LITTLE et al., 2005; OKAMOTO; VIDMAR; GLASS, 2003) quando a concentração de nitrato no solo é muito baixa.

O gene NRT2.1, codificando um iHATS, se expressa na epiderme e nas camadas de células corticais e endodermiais de raízes maduras de *Arabidopsis thaliana*, sendo a expressão do gene induzida por nitrato e reprimida por glutamina (NAZOA et al., 2003). Porém, há um gene, AtNRT2; 5, que ao contrário dos outros, é inibido pela adição de NO_3^- (OKAMOTO; OKADA, 2004).



22 | *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

Em plantas transgênicas de milho desenvolvidas em altas concentrações de nitrato, a taxa de absorção foi três a quatro vezes maior do que em espécies silvestres, porém a concentração de nitrato em plantas transgênicas e espécies silvestres é similar dependendo do conteúdo de nitrato fornecido (FRAISIER et al., 2000).

Lea e Azevedo (2006) verificaram que quando *Arabidopsis thaliana* foi desenvolvida com nitrato de amônio existiu uma massiva diferença na expressão do gene NRT2.1 entre plantas transgênicas e plantas silvestres, enquanto que o influxo de nitrato foi similar. Zhou et al. (2000), usando mutantes e expressão heteróloga, demonstraram que para um iHATS de alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, são requeridos os genes NRT2.1 e NRT2. Tong et al. (2005), em trabalho com cevada, mostraram que para a formação completa da proteína NRT2.1 eram requeridos tanto o gene NRT2.1, quanto o NRT2.3. Por sua vez, Okamoto et al. (2006) confirmaram esse resultado mostrando que o gene NAR (renomeado NRT3) foi requerido para a operação funcional de HATS, mas não de LATS em *Arabidopsis thaliana*.

Lea e Azevedo (2006) concluíram que ambos os genes (NRT1 e NRT2) podem conduzir à construção de plantas transgênicas com cHATS nas raízes e que pode haver outro mecanismo que inibe a absorção do nitrato na presença de N reduzido, como sugerido por Fraiser et al. (2000).

Kant et al. (2008) estudaram espécies de plantas (*Thellungiella halophila* e *Arabidopsis thaliana*) que naturalmente são adaptadas a baixas concentrações de N, com o objetivo de identificar genes reguladores que conferem melhor eficiência de uso de N. Observaram que a *Thellungiella halophila* desenvolvia-se melhor do que a *Arabidopsis thaliana* em condições moderadas e severas de limitação de N e que a *Thellungiella halophila* exibia menor atividade da NR, sendo a expressão do gene GS1 na parte aérea mais induzida por baixo nível de N. Nas raízes, a expressão do gene GS2 foi mantida sob limitação de N, mas diminuiu na *Arabidopsis thaliana*. A regulação da expressão dos genes NRT2.1 e NRT3.1 foi maior e a repressão do NRT1.1 foi menor nas raízes de *T. halophila*, sob limitação de N e em comparação à *Arabidopsis thaliana*. A expressão do gene transportador diferencial foi correlacionada com o alto influxo de nitrato em *T. halophila* em baixas concentrações de N.

Genes envolvidos na absorção do amônio

Ao contrário do nitrato, as plantas em geral não tendem a acumular altas concentrações de íons de amônio e os sintomas de toxicidade frequentemente acontecem se o desenvolvimento destas ocorrer na presença de amônio e na ausência de nitrato (BRITTO; KRONZUCKER, 2002).

Na absorção do amônio estão presentes nas raízes os transportadores HATS e LATS, os quais são constitutivos e não induzidos, significativamente (GLASS et al., 2002).

De acordo com Loqué e Von Wirén (2004), foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de cinco genes que codificam para transportadores de amônio, identificados como AMT1;1 (Ammonium transporter) a AMT 1;5. Em tomate apenas três genes AMT1 foram isolados. Por outro lado, em arroz foram identificados dez diferentes genes AMT1 (SUENAGA et al., 2003). Com base nessa constatação, Loqué e Von Wirén (2004) concluem que cada planta forma o seu sistema de transporte de acordo com a seleção a que foi submetida.

Estudos desenvolvidos por Loqué e Von Wirén (2004) mostraram que a falta de N e a presença de carboidratos solúveis promovem o aumento da transcrição de genes AMT em *A. thaliana*, sendo que AMT1;1 e AMT1;3 e o nível de RNA mensageiro aumentaram inicialmente nas raízes, seguido da remoção da fonte de N, enquanto que AMT1;2 e AMT2;1 aumentaram após um período de deficiência de N.

Sonoda et al. (2003) verificaram que em tomate a transcrição do gene AMT1;2 era induzida pelo ressurgimento de amônio e que o mesmo não ocorria para o gene AMT1;1. Na cultura do arroz foi observado que a regulação do gene AMT era mais complexa. Os genes AMT1;1 e AMT1;2 eram expressos tanto na raiz como na parte aérea induzidos por amônio. Segundo Souza e Fernandes (2006), a ocorrência de genes AMT1, expressando-se também na parte aérea, mostra a importância desses transportadores na reassimilação do NH_4^+ produzido na parte aérea das plantas, principalmente como consequência da fotorrespiração.

A ocorrência desses diversos sistemas de transporte de amônio, controlados por vários genes, é um indicativo da importância da nutrição amoniacal para as plantas (SOUZA; FERNANDES, 2006).



Estudos genéticos da eficiência de uso do nitrogênio

Tendo-se como requisito uma agricultura com base econômica e ecológica, as pesquisas têm dado grande importância à seleção de cultivares que absorvam e metabolizem o nitrogênio de forma mais eficiente (FAGERIA; BALIGAR, 2005).

O conhecimento dos mecanismos que regulam a eficiência de uso do N é necessário para reduzir excessivas aplicações de fertilizantes nitrogenados com consequente poluição do meio ambiente (KANT et al., 2008).

Na maioria das espécies vegetais, o ciclo de vida da planta compreende duas fases. Uma de desenvolvimento vegetativo, na qual as raízes e as folhas se comportam como órgãos de dreno e outra fase de remobilização, na qual as folhas começam a se comportar como órgãos de fonte, que translocam carbono e moléculas orgânicas para a formação de novos tecidos de desenvolvimento e armazenamento (MASCLAUX et al., 2000). Um melhor entendimento do controle genético e metabólico que ocorre nas fases de desenvolvimento da planta é de particular importância não apenas na melhoria da qualidade e produtividade, mas como também no uso eficiente do nitrogênio.

Na tentativa de decifrar os mecanismos de controle de regulação, durante a fase de transição de dreno para fonte dos órgãos vegetais, muitos estudos têm sido realizados (HARRISON et al., 2000; HELLMAN et al., 2000; LEWIS et al., 2000; MASCLAUX et al., 2000). No entanto, a abordagem desses estudos envolve apenas a fisiologia da planta e apesar da contribuição para o aumento da produtividade das culturas, foi observada a necessidade de estudos integrados das bases genéticas e fisiológicas para melhoria da eficiência de uso do nitrogênio.



Com esse enfoque, Causse et al. (1995) citam que estudos genéticos, associados ao uso de marcadores moleculares, podem ser uma forma de identificar genes envolvidos na variação genética de características complexas. Sendo que a combinação de estudos fisiológicos e agrônômicos, com abordagem de genética quantitativa, poderá permitir o uso de marcadores moleculares para identificar a chave estrutural ou *loci* regulatório, envolvido na expressão da característica quantitativa, e a seleção de genótipos mais eficientes no uso de nitrogênio (PRIOUL et al., 1997).

Bertin e Gallais (2000) observaram a existência de interação entre o genótipo e o nível de fertilização nitrogenada em milho, bem como a correlação entre características agrônômicas que foram diferentes dependendo do nível de fertilização nitrogenada. Essas diferenças na expressão da variabilidade genética foram confirmadas seguindo a detecção de locos de características quantitativas (QTLs) específicos para cada nível de nitrogênio. Isso sugere que vários genes são expressos diferencialmente, de acordo com a quantidade de nitrogênio fornecido à planta.

Estudos semelhantes permitiram a abordagem genética quantitativa usando marcadores moleculares para obter mais informações sobre a base genética da eficiência de uso do nitrogênio pela cultura do milho (PURCINO et al., 1998; TOLLENAAR, 1991). A cultura de milho serviu como modelo em razão da sua importância econômica e do seu alto nível de polimorfismo genético para marcadores moleculares.



Variação da eficiência de uso de nitrogênio em gramíneas e leguminosas

Ao longo do século passado muitas evidências já indicavam que havia variações entre as plantas, quanto à capacidade de absorver e utilizar nutrientes. A literatura especializada já deixava claro que plantas mais eficientes na absorção e utilização de nitrogênio teriam sistemas radiculares bem desenvolvidos, maior capacidade de absorção e de translocação de N e maior eficiência de conversão metabólica do N-mineral em N-orgânico, em presença de teores mais baixos nos meios de crescimento.

Atualmente, a eficiência de uso de N é identificada como uma característica do genótipo atribuída a processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que ocorrem nas plantas em interação com fatores externos, como clima, solo, fertilizantes e práticas de manejo (SAMBORSKI; KOZAK; AZEVEDO, 2008).

Trabalhos realizados na década de 80 já indicavam que havia diferenças na habilidade de uso do nitrogênio entre espécies. A maioria dos estudos foi realizada com gramíneas e principalmente com a cultura do milho. Um trabalho considerado clássico, na interpretação dos fatores que contribuem para EUN, foi desenvolvido por Moll et al. (1982) com a cultura do milho. Foram avaliados oito híbridos de acordo com a produtividade de grãos, acumulação de N nos grãos e restos culturais. Em todos os níveis de N e para todos os caracteres avaliados, foram encontradas diferenças significativas. Sob baixa disponibilidade de N, a diferença entre híbridos na EUN foi devida, principalmente, à variação na utilização do nutriente acumulado, bem como a proporção do N translocado para os grãos.

Furlani, Bataglia e Lima (1985) avaliaram a absorção e a utilização de N, em 39 linhagens de milho (*Zea mays* L.). Observaram diferenças entre as linhagens na produção de matéria seca da parte aérea e das raízes, nos



teores de N, nos conteúdos totais de N e nas relações de eficiência (matéria seca produzida por unidade de N absorvida). Concluíram que os processos de absorção e de utilização de N limitaram o desenvolvimento das plantas, sendo, este último o principal fator de variação entre as linhagens. Concluíram também que a maior produção de matéria seca total pelas plantas das linhagens eficientes era consequência do maior crescimento tanto da parte aérea como das raízes. No entanto, observaram que algumas das linhagens classificadas como eficientes sobressaíram-se pelo melhor desenvolvimento do sistema radicular, apresentando menor relação parte aérea/raízes.

Guazelli (1988) desenvolveu estudo com a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*), utilizando três cultivares e constatou que entre as cultivares havia diferenças quanto à eficiência de uso do N.

Em outro estudo, realizado também com a cultura do feijão, Furtini et al. (2006) observaram em 100 linhagens, em diferentes ambientes, que estas diferiam na tolerância à baixa disponibilidade de N e/ou a resposta ao N aplicado. Na média de todos os ambientes, a EUN entre as linhagens variou de 11 a 18 kg de grãos por kg de N aplicado.

Górny et al. (2006) desenvolveram estudos sobre a variação genética na eficiência de uso do N e na atividade fotossintética de modernos e antigos genótipos de trigo de inverno, em condições de campo. Observaram variações significativas entre os genótipos, sendo que no geral os genótipos modernos apresentaram maior atividade fotossintética e utilizaram o N de forma mais eficiente. Apesar de as concentrações de proteínas terem sido menores nos grãos dos genótipos modernos, esses mostraram uma maior habilidade para redistribuir o N dentro do grão, ou seja, apresentaram um maior índice de N na colheita e formaram mais matéria seca do grão/unidade de N no grão. De acordo com Moll et al. (1982) essas características fisiológicas são muito importantes na utilização eficiente do N e também garantem o êxito de programas de melhoramento genético vegetal na obtenção de cultivares eficientes no uso de N.



28 *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

Com o objetivo de avaliar a resposta de genótipos de arroz irrigado à aplicação de nitrogênio, Fageria, Santos e Cutrim (2007) conduziram experimento de campo com 12 genótipos de arroz e cinco doses de N. Observaram que os genótipos de arroz irrigado apresentaram diferenças significativas na produtividade de grãos e também na eficiência do uso de N, expressa em produtividade de grãos por quilograma de N aplicado, N acumulado na planta ou recuperado pela planta. Em média, foram produzidos 19 kg de grãos por quilograma de N aplicado. Yoshida (1981) relatou que a eficiência agrônômica nas regiões tropicais, geralmente, situa-se na faixa de 15 a 25 kg de arroz produzido por quilograma de N aplicado.

Lago (2007), estudando os mecanismos que promovem o comportamento diferencial entre linhagens de feijão em relação a EUN, associou os teores de N-total e frações nitrogenadas na folha (N-nítrico, N-insolúvel, N-solúvel e N-orgânico solúvel) à EUN. Constatou que em algumas linhagens havia indicação de que as frações de N e N-total nas folhas estavam correlacionadas com a EUN.

Santos e Fageria (2007), ao avaliarem a resposta da EUN em cultivares de feijão, em função do manejo do fertilizante nitrogenado em solo de várzea, verificaram que houve diferenças entre as cultivares com relação à EUN, sendo que cultivares de ciclo médio eram mais eficientes do que aquelas de ciclo curto.

Os caminhos para se obter genótipos eficientes na utilização do N são bastante complexos, pois o metabolismo do N é influenciado por diversos fatores ambientais (MACHADO; MAGNAVACA, 1991). As condições de estresses agem diretamente sobre a atividade das enzimas do metabolismo do N e, provavelmente, com o catabolismo de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados. Assim, o incremento da atividade de enzimas do metabolismo do N pode ser importante em programas de melhoramento que visam à eficiência no uso do N (MACHADO; MAGALHÃES, 1995; MAGALHÃES; MACHADO, 1995).



A taxa fotossintética por unidade de N é geralmente maior em plantas C4 do que em plantas C3, porque menor quantidade da enzima rubisco é requerida para altas taxas de fotossíntese em plantas C4 do que em plantas C3. Gramíneas C4, geralmente, têm maiores taxas de desenvolvimento e expansão foliar e, portanto, maior taxa fotossintética por unidade de N, do que gramíneas C3 e dicotiledôneas (SAGE; PEARCE, 1987a). Tem sido verificado que plantas com maior eficiência de uso de nitrogênio podem ter similar quantidade de N por unidade de área foliar e, portanto, maior capacidade fotossintética do que plantas menos eficientes. Alternativamente, plantas mais eficientes podem investir menos N por unidade de área e proporcionalmente mais N para a produção de nova área foliar, sendo esta melhor indicador do desenvolvimento do que da capacidade fotossintética por unidade de área.

Sage e Pearce (1987b) estudaram a eficiência de uso de N em *Chenopodium album* e *Amaranthus retroflexus* e concluíram que *A. retroflexus* apresentava maior eficiência de uso de N, porém com o aumento do nível de N, *C. album* apresentava mais N por unidade de área foliar, embora as taxas fotossintéticas fossem similares para as duas espécies. Esses resultados mostram que a fotossíntese não capacita automaticamente as plantas C4 para uma melhor capacidade fotossintética, porque diferenças na quantidade de N nas folhas pode resultar em maior eficiência de uso. Porém, o maior custo de N para a fotossíntese em plantas C3 pode limitar a alocação de N para outros processos.

Oaks (1994) cita que a eficiência com que o N é utilizado varia com a espécie de planta e com as condições ambientais. Dessa forma, plantas de padrão fotossintético C4 têm em adição a forma superior de absorver CO₂ da atmosfera, uma maior eficiência no uso de N do que as plantas C3. Existem muitas diferenças entre o metabolismo de plantas C3 e C4, mas a maior diferença entre os dois padrões de fotossíntese é a contribuição da fotorrespiração. Quando a fotorrespiração é reduzida em



30 | *Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas*

plantas C3, por meio do aumento do nível do CO₂ ou redução do O₂, tanto a produtividade como a eficiência de uso do N são aumentadas (HOCKING; MEYER, 1991).

O suprimento de carbono necessário para conduzir o aumento de carboidratos e proteínas e a disponibilidade de redutores e ATP são fatores que podem ser alterados pela redução e contribuição da fotorrespiração. Altos níveis de NO₃⁻ foram encontrados em cevada e trigo quando comparados com milho e sorgo e são relacionados à deficiência de carbono, causada pela inibição do PDC (Pyruvate Dehydrogenase Complex) mitocondrial por cátions monovalentes, em particular por NH₄⁺ produzido por fotorrespiração em plantas C3 (GEMEL; RANDALL, 1992).

A produção de NH₄⁺ é menor em cereais C4 do que em C3, sendo que a produção de amônio em plantas C4 está localizada em células da bainha vascular, enquanto que a assimilação do nitrato é realizada nas células mesófilas. Dessa forma, o impacto do fluxo de carbono requerido para a assimilação de NO₃⁻ é insignificante nas plantas C4 (BECKER et al., 1993).

Yuan et al. (2007) selecionaram duas espécies de gramíneas, sendo uma C3 (*Leymus chinensis*) e outra C4 (*Chloris virgata*) para investigar as estratégias de uso de N das espécies submetidas a diferentes variações no suprimento desse nutriente em cultivos simples e em consórcio e sob efeitos de sazonalidade, na China. Observaram que a *Chloris virgata* apresentou maior eficiência de uso de N e que a alteração na sazonalidade promovia alterações na concentração de N na planta e na produtividade das culturas em maior proporção no consórcio. Concluíram que as estratégias de uso de N das duas espécies eram relacionadas às dinâmicas das estações e à competição entre as culturas.

Niu, Liu e Wan (2008) citam que o conhecimento dos efeitos da sazonalidade na eficiência de uso do N em plantas C3 e C4 é limitado.



Porém, considerando as diferenças nessa eficiência entre as espécies C3 e C4 já comprovadas cientificamente, as mudanças sazonais na disponibilidade de N no solo indicam que as respostas serão diferentes e dependentes das estratégias de uso de N que cada espécie apresenta em decorrência dos fatores ambientais (WINSLOW; HUNT; PIPER, 2003).

A eficiência de uso do nitrogênio é desejável no sentido de aumentar a produtividade das culturas, reduzir os custos de produção e manter a qualidade ambiental. Nesse contexto, o manejo adequado com o propósito de aumentar a EUN tem sido uma das principais metas da agricultura sustentável que só será factível mediante a redução das perdas do N e melhoria de sua absorção pelas plantas.





Considerações finais

Em razão da importância do N no desenvolvimento das plantas e de sua alta mobilidade no solo, esse nutriente tem sido intensamente estudado, no sentido de maximizar a eficiência do seu uso. Para tanto, muitos estudos estão sendo realizados tendo como enfoque a diminuição das perdas desse elemento, bem como a melhoria da sua absorção e do seu metabolismo no interior da planta.

Nesse contexto, as ações da pesquisa científica para aumentar a eficiência na utilização de nitrogênio pelas plantas estão direcionadas, principalmente, aos estudos da eficiência das enzimas e suas isoformas envolvidas no ciclo do N na planta e à identificação dos transportadores de nitrogênio presentes na membrana plasmática das células.

Os estudos moleculares dos transportadores de nitrato e de amônio abrem uma perspectiva de atuação direta no processo de absorção do nitrogênio pela planta. A perspectiva é que os conhecimentos obtidos possam ser futuramente utilizados em programas de melhoramento genético, visando ao desenvolvimento de genótipos mais eficientes na utilização do nitrogênio em uma ampla faixa de disponibilidade desse nutriente no solo.



Referências

AGRAMA, H. A. S.; ZAKARIA, A. G.; SAID, F. B.; TUINSTRA, M. Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 187-195, 1999.

BECKER, T. W.; PERROT-RECHENMANN, C.; SUZUKI, A.; HIREL, B. Subcellular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. **Planta**, Berlin, v. 191, n. 1, p. 129-136, July 1993.

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, n. 1, p. 495-522, 1969.

BERTIN, P.; GALLAIS, A. Physiological and genetic basis of nitrogen use efficiency in maize. I. Agrophysiological results. **Maydica**, Bergamo, v. 45, n. 1, p. 53-66, 2000.

BERTIN, P.; GALLAIS, A. Physiological and genetic basis of nitrogen use efficiency in maize. II. QTL detection and coincidences. **Maydica**, Bergamo, v. 46, n. 1, p. 53-68, 2001.

BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 99, n. 4, p. 1294-1301, 1992.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, n. 6, p. 567-584, 2002.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CAUSSE, M.; ROCHER, J. P.; HENRY, A. M.; CHARCOSSET, A.; PRIOUL, J. L.; VIENNE, D. de. Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme *loci*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 259-272, Sep. 1995.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 859-868, 1995.

CREGAN, P. B.; BERKUM, P. Genetics of nitrogen metabolism and physiological/biochemical selection for increased grain crop productivity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 67, n. 2-3, p. 97-111, 1984.

DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J. M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, London, v. 442, n. 7105, p. 939-942, 2006.



34 | **Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas**

DECKHARD, E. L.; LAMBERT, R. J.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yields of grain and grain protein. **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 3, p. 343-350, 1973.

DEMBINSKI, E.; RAFALSKI, A.; WISNIEWSKA, I. Effect of long-term selection for high and low protein content on the metabolism of amino acids and carbohydrates in maize kernel. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 29, n. 6, p. 549-557, 1991.

EICHELBERGER, K. D.; LAMBERT, R. J.; BELOW, F. E.; HAGEMAN, R. H. Divergent phenotypic recurrent selection for nitrate reductase activity in maize. I. Selection and correlated responses. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 6, p. 1393-1397, 1989.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, New York, v. 88, p. 97-185, 2005.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B. dos; CUTRIM, V. dos A. Produtividade de arroz irrigado e eficiência de uso do nitrogênio influenciadas pela fertilização nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 7, p. 1029-1034, jul. 2007.

FAKOREDE, M. A. B.; MOCK, J. J. Nitrate-reductase activity and grain yield of maize cultivar hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 4, p. 680-682, 1978.

FEIL, B.; THIRAPORN, R.; STAMP, P. In vitro nitrate reductase activity of laboratory-grown seedlings as an indirect selection criterion for maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1280-1286, 1993.

FERNANDÉZ, J. E.; MURILLO, J. M.; MORENO, F.; CABRERA, F.; FERNANDÉZ-BOY, E. Reducing fertilization for maize in southwest Spain. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 29, n. 19-20, p. 2829-2840, 1998.

FRAISIER, V.; GOJON, A.; TILLARD, P.; DANIEL-VEDELE, F. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 489-496, 2000.

FURLANI, A. M. C.; BATAGLIA, O. C.; LIMA, M. Eficiência de linhagens de milho na absorção e/ou utilização de fósforo, a baixo nível, em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 129-147, 1985.

FURTINI, I. V. **Implicações da seleção no feijoeiro efetuada em ambientes contrastantes em níveis de nitrogênio**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FURTINI, I. V.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; FURTINI NETO, A. E. Resposta diferencial de linhagens de feijoeiro ao nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1696-1700, nov./dez. 2006.

GEMEL, J.; RANDALL, D. D. Light regulation of leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex: role of photorespiratory carbon metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 2, p. 908-914, 1992.

GLASS, A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Colchester, v. 22, n. 5, p. 453-470, Sep. 2003.



GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. B.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 855-864, 2002.

GÓRNY, A. G.; GARCZYŃSKI, S.; BANASZAK, Z.; LUGOWSKA, B. Genetic variation in the efficiency of nitrogen utilization and photosynthetic activity of flag leaves among the old and modern germoplasm of winter wheat. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 47, n. 3, p. 231-237, 2006.

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**. 1988. 112 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1988.

GUO, F. Q.; WANG, R.; CRAWFORD, N. M. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 835-844, 2002.

HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M.; LEIGH, R. A. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 138, n. 1, p. 83-89, 2001.

HAGEMAN, R. H.; LAMBERT, R. J. The use of physiological traits for corn improvement. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3rd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1988. Chapter 7, p. 431-461.

HAGEMAN, R. H.; LENG, E. R.; DUDLEY, J. W. A biochemical approach to corn breeding. **Advances in Agronomy**, Amsterdam, v. 19, p. 45-86, 1967.

HARPER, J. E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K. J.; BENNETT, J. M.; SINCLAIR, T. R. (Ed.). **Physiology and determination of crop yield**. Madison: American Society of Agronomy: Crop Science Society of America: Soil Science Society of America, 1994. Chapter 11A, p. 285-302, 1994.

HARRISON, J.; BRUGIERE, N.; PHILLIPSON, B.; FERRARIO-MERY, S.; BECKER, T.; LIMAMI, A.; HIREL, B. Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding: consequences to plant physiology and plant development. **Plant Soil**, The Hague, v. 221, n. 1, p. 81-93, June 2000.

HELLMANN, H.; BARKER, L.; FUNCK, D.; FROMMER, W. B. The regulation of assimilate allocation and transport. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, n. 6, p. 583-594, 2000.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERE, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 3, p. 1258-1270, 2001.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2369-2387, 2007.



36 **Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas**

HOCKING, P. J.; MEYER, C. P. Effects of CO₂ enrichment and nitrogen stress on growth and partitioning of *dry* matter and nitrogen in wheat and maize. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 18, n. 4, p. 339-396, 1991.

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. 577-607, 1994.

IMSANDE, J.; TOURAINE, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 3-7, 1994.

KANT, S.; BI, Y. M.; WERETILNYK, E.; BARAK, S.; ROTHSTEIN, S. J. The *Arabidopsis halophytic* relative *Thellungiella halophila* tolerates nitrogen-limiting conditions by maintaining growth, nitrogen uptake, and assimilation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, n. 3, p. 1168-1180, 2008.

LAGO, F.J. do. **Estratégias de seleção de linhagens de feijoeiro eficientes no uso de nitrogênio**. 2007. 66p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

LEA, P. J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P. J.; LEEGOOD, R. C. (Ed.). **Plant biochemistry and molecular biology**. Chichester: John Wiley and Sons, 1993. Chapter 7, p. 155-180.

LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 149, n. 3, p. 243-247, 2006.

LEWIS, C. E.; NOCTOR, G.; CAUSTON, D.; FOYER, C. H. Regulation of assimilate partitioning in leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, n. 6, p. 507-519, 2000.

LITTLE, D. Y.; RAO, H.; OLIVA, S.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A.; MALAMY, J. E. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 38, p. 13693-13698, 2005.

LOQUÉ, D.; VON WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots: regulatory aspects of nitrogen assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 401, p. 1293-1305, 2004.

MACHADO, A. T. **Perspectiva do melhoramento genético em milho (*Zea mays* L.) visando eficiência na utilização do nitrogênio**. 1997. 219 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MACHADO, A. T.; MAGALHÃES, J. R. Melhoramento de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL, 1., 1992, Belo Horizonte. **O milho em perspectiva**: anais. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS; Mexico: CIMMYT/UNDP, 1995. p. 321-343.

MACHADO, A. T.; MAGALHÃES, J. R.; MAGNAVACA, R.; SILVA, M. R. e. Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio em diferentes genótipos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 45-47, 1992.

MACHADO, A. T.; MAGNAVACA, R. **Estresse ambiental**: o milho em perspectiva. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1991. 47 p.



MACHADO, A. T.; SODEK, L.; FERNANDES, M. S. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 2, p. 249-256, fev. 2001.

MAGALHÃES, J. R.; MACHADO, A. T. Biochemical parameters selecting maize for nitrogen assimilation efficiency under stress conditions. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL, 1., 1992, Belo Horizonte. **O milho em perspectiva: anais**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS; México: CIMMYT, 1995. p. 345-367.

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

MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MEDICI, L. O.; BISON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 129-136, jun. 2002.

MASCLAUX, C.; VALADIER, M. H.; BRUGIERE, N.; MOROT-GAUDRY, J. F.; HIREL, B. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 4, p. 510-518, 2000.

MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 979-987, 2002.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 562-564, 1982.

NAZOA, P.; VIDMAR, J. J.; TRANBARGER, T. J.; MOULINE, K.; DAMIANI, I.; TILLARD, P.; ZHUO, D.; GLASS, A. D. M.; TOURAINE, B. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 689-703, June 2003.

NIU, S.; LIU, W.; WAN, S. Different growth responses of C₃ and C₄ grasses to seasonal water and nitrogen regimes and competition in a pot experiment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 1431-1439, Apr. 2008.

OAKS, A. Efficiency of nitrogen utilization in C₃ and C₄ cereals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 2, p. 407-414, 1994.

OBARA, M.; KAJIURA, M.; FUKUTA, Y.; YANO, M.; HAYASHI, M.; YAMAYA, T.; SATO, T. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 359, p. 1209-1217, 2001.

OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y.; SIDDIQI, M. Y.; CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. High-affinity nitrate transport in roots of arabidopsis depends on expression of the NAR2-like Gene AtNRT3.1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 3, p. 1036-1046, 2006.

OKAMOTO, M.; OKADA, K. Differential responses of growth and nitrogen uptake to organic nitrogen in four gramineous crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 402, p. 1577-1585, 2004.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. M. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 304-317, 2003.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1-2, p. 3-28, July 1995.

PRIOUL, J. L.; QUARRIE, S.; CAUSSE, M.; DE VIENNE, D. Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 311, p. 1151-1163, 1997.

PURCINO, A. A. C.; ARELLANO, C.; ATHWAL, G. S.; HUBER, S. C. Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. **Maydica**, Bergamo, v. 43, n. 2, p. 83-94, 1998.

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 41-46, 1994.

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T.; MARRIEL, I. E.; MAGALHÃES, J. R. Redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITRÓGENO EM PLANTAS, 1., 1990, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1990. p. 491-492.

REGGIANI, R.; AURISANO, N.; MATTANA, M.; BERTANI, A. Genotypic variation and relationship among nitrogen assimilation traits in *Zea mays*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 123-128, 1999.

SAGE, R. F.; PEARCY, R. W. The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. I. Leaf nitrogen, growth, and biomass partitioning in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 3, p. 954-958, 1987a.

SAGE, R. F.; PEARCY, R. W. The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants: II. Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 3, p. 959-963, 1987b.

SAMBORSKI, S.; KOZAK, M.; AZEVEDO, R. A. Does nitrogen uptake affect nitrogen uptake efficiency, or vice versa? **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 30, n. 4, p. 419-420, July 2008.

SANTOS, A. B. dos; FAGERIA, N. K. Manejo do nitrogênio para eficiência de uso por cultivares de feijoeiro em várzea tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 9, p. 1237-1248, set. 2007.

SANTOS, M. X. dos; GUIMARÃES, P. E. de O.; PACHECO, C. A. P.; FRANCA, G. E.; PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G. e; LOPES, M. A. Melhoramento intrapopulacional no sintético elite NT para solos pobres em nitrogênio. I. Parâmetros genéticos de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 1, p. 55-61, jan. 1998.



SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; VON WIREN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1 - 1;3) in rice. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 7, p. 726-734, 2003.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. O nitrogênio na natureza. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 216-252.

SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; VON WIREN, N.; HAYAKAWA T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 206-211, 2003.

TOLLENAAR, M. Physiological basis of genetic improvement of maize hybrids in Ontario from 1959 to 1988. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 1, p. 119-124, 1991.

TONG, Y.; ZHOU, J. J.; LI, Z.; MILLER, A. J. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 442-450, 2005.

TOURAINÉ, B.; MULLER, B.; GRIGNON, C. Effect of phloem-translocated malate on NO_3^- uptake by roots of intact soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 3, p. 1118-1123, 1992.

VESSEY, J. K.; RAPER, C. D.; HENRY, L. T. Cyclic variations in nitrogen uptake rate in soybean plants: uptake during reproductive growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 233, p. 1579-1584, 1990.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; FROMMER, W. B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 196, n. 2, p. 191-199, 1997.

WEGER, H. G.; TURPIN, D. H. Mitochondrial respiration can support NO_3^- and NO_2^- reduction during photosynthesis: interactions between photosynthesis, respiration, and N assimilation in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, n. 2, p. 409-415, 1989.

WINSLOW, J. C.; HUNT, E. R.; PIPER, S. C. The influence of seasonal water availability on global C_3 versus C_4 grassland biomass and its implications for climate change research. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 163, n. 1-2, p. 153-173, 2003.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of rice crop science**. Los Baños: IRRI, 1981. 269 p.

YUAN, Z.; LIU, W.; NIU, S.; WAN, S. Plant nitrogen dynamics and nitrogen-use strategies under altered nitrogen seasonality and competition. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 4, p. 821-830, 2007.

ZHOU, J. J.; FERNÁNDEZ, E.; GALVÁN, A.; MILLER, A. J. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 466, n. 2-3, p. 225-227, 2000.