

ALTERAÇÕES DA ATIVIDADE DA REDUTASE
DE NITRATO DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DA FOLHA DE SOJA (*Glycine max* L. MERR.)

Luis Gonzaga Santero

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do título
de Mestre em Biologia Vegetal

Orientador:

Prof. Dr. Antonio C. N. Moysalhões

CAMPINAS

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Para

José Santoro (in memoriam)

e

Maria B. A. Santoro, meus pais.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Antonio Celso N. Magalhães, pela orientação do trabalho de pesquisa.
- Ao Professor Dr. Ladaslav Štědek, pelas sugestões feitas a este trabalho.
- Ao Departamento de Bioquímica, por me ter facilitado a utilização dos equipamentos do laboratório.
- À Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento do material vegetal.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Efeito do nitrato na indução da atividade da atividade da redutase de nitrato.....	5
2.2. Efeito da idade do tecido foliar sobre a atividade da redutase de nitrato.....	7
2.3. Aspectos relacionados com a inibição e instabilidade da redutase de nitrato.....	9
2.4. Outros aspectos que controlam a atividade da redutase de nitrato.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Material vegetal e cultivo das plantas.....	11
3.2. Câmara de crescimento.....	12
3.3. Amostragem.....	12
3.4. Determinações da área foliar.....	12
3.5. Dosagens de íons nitrato.....	13
3.6. Dosagens de proteína.....	13
3.7. Redutase de nitrato, <u>in vitro</u> : extração e ensaio..	14
3.8. Redutase de nitrato, <u>in vivo</u>	15
3.9. Infiltração de glicose e malato no tecido foliar..	16
3.10. Absorção de nitrato por folhas intactas de diferentes idades fisiológicas.....	17
3.11. Protease: extração e ensaio.....	18
3.12. Instabilidade da redutase de nitrato.....	19
3.13. Estudo termo-cinético da redutase de nitrato.....	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Atividade da redutase de nitrato durante a ontogênese da folha.....	22
4.2. Concentração endógena de nitrato e o efeito na atividade <u>in vivo</u> da redutase de nitrato.....	25
4.3. Atividade específica <u>in vitro</u> da redutase de nitrato.....	28

4.4.	Infiltração de glicose e malato no tecido foliar...	30
4.5.	Efeito de glicose na atividade <u>in vivo</u> da redutase de nitrato.....	33
4.6.	Instabilidade da redutase de nitrato.....	36
4.7.	Efeito de caseína na instabilidade da redutase de nitrato.....	38
4.8.	Efeito de caseína na atividade <u>in vitro</u> da redutase de nitrato.....	41
4.9.	Efeito de caseína adicionada no meio de reação da redutase de nitrato.....	41
4.10.	Instabilidade da redutase de nitrato no extrato obtido de mistura de folhas com idades fisiológicas distintas.....	44
4.11.	Estudo termo-cinético da redutase de nitrato.....	46
4.12.	Atividade de protease durante a ontogênese da folha.....	50
4.13.	Absorção de nitrato pela folha.....	52
4.14.	Efeito da absorção de nitrato na atividade <u>in vivo</u> da redutase de nitrato.....	52
5.	DISCUSSÃO.....	57
5.1.	Atividade <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> da redutase de nitrato.....	57
5.2.	Absorção de nitrato pelas folhas e o efeito na atividade <u>in vivo</u> da redutase de nitrato.....	61
5.3.	Aspectos relacionados com a instabilidade da redutase de nitrato.....	62
6.	CONCLUSÕES.....	67
7.	RESUMO.....	69
8.	SUMMARY.....	73
9.	APÊNDICE.....	76
10.	ABREVIATURAS.....	77
11.	BIBLIOGRAFIA CITADA.....	78

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio constitui aproximadamente 2% e o carbono 40% do peso seco das plantas. No globo terrestre, é estimado que cerca de duzentos bilhões de toneladas de carbono são anualmente fixadas através da fotossíntese (Galston, 1961), concomitantemente com a incorporação de dez bilhões de toneladas de nitrogênio.

Com exceção das espécies vegetais capazes de utilizarem o nitrogênio através de bactérias fixadoras, a totalidade do nitrogênio fixado pelas plantas é proveniente da redução de íons nitrato absorvidos do solo. Para aquelas espécies vegetais cultivadas em condições normais de campo, e em solos não deficientes em nitrogênio, é estimado que, em média, apenas 25 a 50% de todo o nitrogênio fixado provem daquele processo (Harper, J.E., 1974, Hardy e Havelka, 1975).

Variações sazonais da absorção e redução de nitrato, bem como da fixação de nitrogênio em soja, tem indicado que esses dois processos são consecutivos, durante o desenvolvimento da leguminosa (Harper e Hageman, 1972, Thibodeau e Jaworsky, 1975).

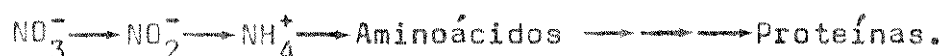
As avaliações da assimilação do nitrogênio em plantas de soja, através de determinações in vivo da enzima redutase do nitrato, e da redução do acetileno, indicam que a assimilação daquele elemento, via redução do nitrato absorvido do solo é de importância primária durante o crescimento vegetativo, enquanto que a fixação simbiótica se torna importante durante a fase do desenvolvimento que corresponde ao enchimento das vagens (Harper, J.E., 1976).

Em outras leguminosas, como Phaseolus, a contribuição relativa daqueles dois processos se dá inversamente ao descrito em soja (Franco, et al., 1979)

Uma vez que a redução do nitrato a amônia, forma utilizável pelos vegetais, requer pelo menos o concurso de oito elétrons, é de se esperar que quantidades maciças de energia solar sejam exigidas para a realização daquele processo.

A assimilação do nitrato nos tecidos vegetais se dá através de duas reações que produzem íons amônio, com posterior incorporação destes em aminoácidos, principalmente através das vias da desidrogenase glutâmica (Givan, et al., 1970, Magalães, et al., 1974, Tsukamoto, 1970) e sintetase da glutamina/glutamina-oxo glutárico aminotransferase (Mifflin e Lea, 1976).

Basicamente esse processo pode ser sumariado da seguinte forma:



As duas primeiras enzimas que atuam naquela sequência de reações são respectivamente a redutase do nitrato e a redutase do nitrito. A enzima considerada limitante nesse processo é a primeira (Beevers e Hageman, 1969), que é induzida pelo substrato (Hageman e Flesher, 1960), utilizando predominantemente NADH como cofator (Beevers, et al., 1964, Schrader, et al., 1968).

A redutase do nitrato tem peso molecular entre 5.10^5 e 6.10^5 D e contém na molécula, molibdênio, ferro e FAD. As constantes de Michaelis para o nitrato e o cofator são respectivamente ao redor de 2.10^{-4} M e $2,5.10^{-6}$ M, citado por Beevers e Hageman, 1969.

Nos tecidos vegetais, principalmente em plantas de me

tabolismo " C_3 ", a redução de nitrato se associa indiretamente com a oxidação de metabólitos sintetizados na fotossíntese, através da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Kleper,et al., 1971), e em plantas de metabolismo " C_4 ", pela enzima NADH-malato desidrogenase (Neyra e Hageman, 1978).

A propriedade de assimilar nitrato não é inerente apenas de tecidos fotossintetizadores, mas também daqueles que não realizam fotossíntese, como é o caso das raízes (Wallace, 1973, Aslam e Oaks, 1975, Blevins,et al., 1976).

A contribuição relativa dos dois tipos de tecidos para o processo de assimilação de nitrato, pode ser variável de acordo com a espécie vegetal e condições ambientais, principalmente os relacionados com a disponibilidade do íon no meio das raízes (Younis,et al., 1965).

A natureza induzível da redutase do nitrato pelo nitrato, bem como a adaptabilidade da enzima a variações ambientais, proporcionam às plantas um mecanismo capaz de controlar a disponibilidade de nitrogênio reduzido, indispensável ao crescimento vegetal. Nesse aspecto, estudos baseados nos mecanismos de assimilação daquele íon em plantas poderão proporcionar melhor eficiência do aproveitamento do nitrogênio do solo, bem como uma otimização dos efeitos ambientais sobre aquele processo.

Nas leguminosas, a manutenção de alta atividade metabólica das folhas está diretamente associada com o crescimento dos órgãos reprodutores, representados pelas vagens e grãos. Dessa forma, alterações nos processos de anabolismo nas folhas poderão refletir na produção econômica da planta.

Considerando a importância da soja como fonte de pro

teínas de alta qualidade, o presente trabalho, que tem por objetivo estudar as alterações na redução de nitrato durante o desenvolvimento da folha de soja, é perfeitamente justificável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A participação de uma enzima dependente de nucleotídeo de piridina no processo de redução de nitrato em soja, e em outras plantas superiores, foi primeiramente demonstrada por Evans e Nason, 1953. Posteriormente outros aspectos foram adicionados àquele, por Cheniae e Evans, 1956, Nason, 1956 e Nicholas e Stevens, 1956.

2.1. Efeito do nitrato na indução da atividade da redutase do nitrato.

Geralmente plantas crescidas na presença de nitrato apresentam atividades da enzima mais elevadas do que quando desenvolvidas na presença de outros íons nitrogenados. Candella, et al., 1957, demonstraram que a atividade da redutase do nitrato em plantas de couve-flor, relacionava-se melhor com a presença do nitrato no meio de cultivo, em comparação com íons amônio.

Em plantas de milho, Hageman e Flesher, 1960 mostraram que a atividade da redutase de nitrato era proporcional à concentração de nitrato, assim como o teor de proteína solúvel determinado na parte aérea das plantas. A concentração de nitrato que proporciona indução máxima da enzima, está na dependência do tipo de tecido, quando outros fatores, principalmente ambientais, permanecem constantes. Beevers, et al., 1965, verificaram que a concentração ótima de nitrato para indução da atividade da redutase de nitrato, em cotilédones de rabanete, foi de $10^{-2}M$, decrescen

do com o aumento da concentração do íon, além daquele valor. Concentrações maiores do que aquela não inibiram a atividade da enzima em plântulas de milho.

Concentrações de nitrato entre 10^{-3} e 10^{-1} M proporcionaram um aumento da atividade da redutase de nitrato, em plantas de milho, tanto quando se trabalhou com tecido radicular, quanto escutelo, (Wallace, 1973). Concentrações relativamente altas de nitrato foram exigidas a fim de proporcionar máxima indução da redutase de nitrato. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferrari e Warner, 1969, trabalhando com células de aleurona de cevada. Por outro lado, Kinsky, 1961 e Stewart, 1972, trabalhando respectivamente com Neurospora e Lemna, mostraram que a máxima indução da enzima se verificava a baixos níveis de nitrato no meio de cultivo (abaixo de 10^{-3} M). Nesse pormenor, essas verificações corroboram as obtidas por Klepper e Hageman, 1969, em folhas de macieira.

A presença de nitrato no meio de cultivo de plantas é fator limitante na indução da redutase de nitrato por outros fatores. Travis, et al., 1970-b, trabalhando com folhas destacadas de cevada, mostraram que a indução da enzima redutase de nitrato pela luz era dependente de um suprimento ótimo daquele íon, avaliado pela sua concentração no tecido foliar. Semelhantemente, a indução dessa enzima por glicolato, em folhas de cevada, se verificava somente na presença de nitrato. (Roth-Bejerano e Lips, 1973).

A indução da atividade da redutase de nitrato pelo substrato pode ser independente da presença da luz. Em plantas de soja crescidas sob fotoperíodo de 14 horas de luz, a adição de nitrato no meio de cultivo induziu a atividade da enzima tanto

na presença como na ausência da luz (Nicholas,et al.,1976). Esse aspecto poderia estar relacionado com a síntese "de novo"de proteínas, induzida pelo substrato (Zielke e Filner,1971, Travis, et al.,1970, Travis e Key,1971).

Se por um lado, a concentração de nitrato no tecido foliar pode afetar o nível de atividade da redutase de nitrato, a concentração do íon presente no sítio ativo da enzima, bem como o fluxo de nitrato, através do citoplasma das células são mais importantes como fatores indutores da atividade da redutase de nitrato. Heimer e Filner,1971, trabalhando com células em cultura de plantas de tabaco, verificaram que a concentração de nitrato metabolizável era responsável pela indução da enzima.

Em plantas de milho, a importância do fluxo de nitrato na indução da atividade da redutase de nitrato, foi demonstrado por Shaner e Boyer,1976-a.

Além desses aspectos, a presença do nitrato no sítio da enzima pode estar relacionado com a manutenção da estabilidade da redutase de nitrato. Em Neurospora crassa tratada com cicloheximida, a perda de atividade enzimática foi reduzida quando na presença de nitrato (Subramanian e Sorger,1972). Semelhantemente, trabalhos de Aslan e Oaks,1975, e Aslan,et al.,1978 mostraram, respectivamente, que a presença de nitrato reduzia a perda de atividade da redutase de nitrato em tecidos radiculares tratados com tungstênio, e que o nitrato protegia a enzima contra inativação por L-canavanina, em raízes de milho.

2.2. Efeito da idade do tecido foliar sobre a atividade da redutase de nitrato.

Tem sido demonstrada a existência de correlações enter o desenvolvimento de cloroplastos e enzimas do processo de carboxilação na fotossíntese, com a idade fisiológica de folhas de plantas (Rhodes e Yemm, 1963, Obendorf e Huffaker, 1970). Uma vez que a redução de nitrato depende de metabólitos sintetizados naquele processo, a idade fisiológica de tecidos vegetais se relaciona com o processo de redução e assimilação de nitrato. Wallace e Pate, 1965, estudando a atividade da redutase de nitrato em folhas de ervilha de diferentes idades, verificaram que a atividade máxima da enzima era coincidente com a total abertura das folhas, declinando posteriormente. Resultados semelhantes foram encontrados pelos mesmos autores quando trabalhando com plantas de Xanthium (Wallace e Pate, 1967), por Kannangara e Woolhouse, 1967, em Perilla frutescence, e em plantas de soja, por Harper e Hageman, 1972.

O efeito da idade fisiológica da folha sobre a atividade da redutase de nitrato independe da presença ou ausência de luz. Jordan e Huffaker, 1972, verificaram que em folhas de cevada, a atividade máxima da enzima era observada ao redor do 5º dia após a emergência da plântula, declinando a seguir, tanto no escuro quanto na presença de luz. O decréscimo da atividade enzimática no escuro não era devido à diminuição da concentração de nitrato do tecido.

O efeito da idade sobre a atividade da redutase de nitrato independe do tipo de tecido vegetal. Regiões apicais de raiz de milho apresentaram cerca de 2,5 vezes mais atividade da enzima do que a apresentada pelos tecidos mais diferenciados (Wallace, 1973).

Não somente a indução da atividade da redutase de nitrato é afetada pela idade do tecido, como também a estabilidade da enzima. Schrader,et al.,1974 mostraram que em folhas de milho, aveia e fumo, os tecidos mais velhos apresentavam redutase de nitrato com maior instabilidade do que aquela verificada em tecidos mais jovens.

2.3. Aspectos relacionados com a inibição e instabilidade da redutase de nitrato.

A redutase de nitrato é uma enzima que apresenta uma taxa de síntese e degradação relativamente rápida, quando comparada com a de outras enzimas. Klepper e Hageman,1969, trabalhando com folhas de diferentes variedades de macieira, mostraram que atividades apreciáveis da enzima poderiam ser obtidas protegendo-se devidamente a enzima contra inibições causadas por polifenois.

A influência de substâncias de natureza fenólica sobre a atividade da redutase de nitrato tem sido identicamente sugerida por Stulen,et al.,1971 em trabalho realizado com cotilédones de rabanete, através da ação protetora de PVP sobre a enzima. A propriedade da polivinilpirrolidona em proteger a redutase de nitrato contra fatores inativantes tem sido mostrado também por Wallace,1973, em raízes de plântulas de milho. Nesse caso, a natureza do fator inativante foi determinada como sendo enzimática.

Semelhantemente, Aslam,1977 trabalhando com raízes de milho, mostrou a existência de substância (s) com propriedade inibidora da redutase de nitrato, sintetizada em condições

de altas temperaturas.

O decaimento da atividade da redutase de nitrato se caracteriza pela perda de atividade enzimática in vitro, em função do tempo decorrido após a sua extração. Schrader et al., 1968 trabalhando com folhas de plantas de milho, verificaram que a redutase de nitrato apresentava meia vida de 4 horas. Resultado semelhante foi obtido posteriormente por Zielke e Filner, 1971, em células de tabaco. Tem sido demonstrado ainda que a instabilidade da redutase de nitrato é proporcional à idade do tecido vegetal (Oaks, et al., 1972, Schrader, et al., 1974).

2.4. Outros aspectos que controlam a atividade da redutase de nitrato.

A redutase de nitrato, independentemente dos fatores mencionados, é controlada por fatores genéticos (Hageman, et al., 1963, Warner, et al., 1969, Goodman, et al., 1974) e hormonais (Lips e Roth-Bejerano, 1969, Roth-Bejerano e Lips, 1970, Kende, et al., 1971, Shaulka, 1972), bem como através de fatores ambientais, como, intensidade luminosa (Beevers, et al., 1965, Hageman e Flesher, 1960, Hageman, et al., 1961, Kannangara e Woolhouse, 1967, Lips e Roth-Bejerano, 1969, Travis, et al., 1970-a e 1970-b, Beevers e Hageman, 1972, Stulen, et al., 1973, Calvin e Atkins, 1974, Nicholas, et al., 1976), concentração de gás carbônico (Kannangara e Woolhouse, 1967, Calvin e Atkins, 1974, Purvis, et al., 1974), temperatura (Ritenour e Huffaker, 1964, Mattas e Pauli, 1965, Onwueme, et al., 1971, Alofe, et al., 1973, Magalhães, 1973, Benzion e Heimer, 1977) e disponibilidade de água (Mattas e Pauli, 1965, Huffaker, et al., 1970, Bardzik, et al., 1976, Shaner e Doyer, 1976-a e 1976-b, Morilla, et al., 1973, Pal, et al., 1976).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e cultivo das plantas.

O material vegetal utilizado foi planta de soja (Glycine max L. Merril), variedade Santa Rosa. As sementes foram obtidas na Seção de Leguminosas do Instituto Agronômico de Campinas e colocadas para germinar em recipientes de plástico de dez litros de capacidade, contendo vermiculita previamente irrigada com água destilada. A germinação ocorreu em câmaras de crescimento a temperatura constante de 27°C durante o período de luz, e a 23°C durante o período noturno. Nessas condições, o tempo requerido para a emergência da plântula foi equivalente a cinco dias após o plantio.

Após a expansão das folhas cotiledonares, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo cerca de três litros de solução nutritiva (Apêndice).

As plantas permaneceram na câmara de crescimento durante 15 dias, em cada um dos experimentos realizados. Durante esse período, foram determinados parâmetros bioquímicos e fisiológicos relacionados com a redução de nitrato pelas folhas.

As condições ambientais de cultivo das plantas foram as seguintes: fotoperíodo de 13 horas, termoperíodo de 27°C/22°C (dia/noite), radiação luminosa incidente de 0,22 cal.cm⁻².min⁻¹ e iluminância de 18.000 lux. A umidade relativa oscilou entre 35% e 50% durante aquele período.

3.2. Câmara de crescimento.

A câmara de crescimento utilizada foi uma "Conviron", modelo EF-7 de $0,7\text{m}^2$ de área útil. A iluminação foi fornecida por 8 lâmpadas fluorescentes de 80 watts cada uma, e quatro incandescentes de 25 watts, permitindo uma iluminância nominal equivalente a 20.000 lux. O controle da temperatura foi realizado por termostato e condensador refrigerado a ar, com compressor de desvio contínuo de gás quente.

A remoção de ar do sistema foi realizada por meio de filtros com circulação vertical.

3.3. Amostragem

As determinações bioquímicas, bem como as medidas de área foliar foram realizadas utilizando-se a primeira folha trifoliolada desenvolvida logo após o aparecimento da folha primária. Foi considerado como início da ontogênese da folha, o estágio do desenvolvimento correspondente ao primeiro dia após a emergência da lâmina foliar.

Todas as análises foram realizadas utilizando-se pelo menos uma grama de material vegetal. As determinações foram feitas dentro do período compreendido entre o 2º e 10º dia após o início da expansão da lâmina foliar.

3.4. Determinações da área foliar.

As áreas da primeira folha trifoliolada, durante seu

desenvolvimento, foram avaliadas comparando-se o peso de recortes das projeções dos perímetros foliares em papel sulfite, com o peso de uma área conhecida do mesmo papel. Os valores de área foram expressos em dm^2 .

3.5. Dosagens de íons nitrato.

As concentrações de nitrato no tecido foliar foram avaliadas de acordo com o método descrito por Gallo e Lott, 1965. O nitrato foi extraído homogeneizando-se o tecido com tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Após centrifugação do extrato a 5.000g, uma alíquota de 2,0ml foi colocada na presença de 1,0ml de ácido fenoldissulfônico. Toda a matéria orgânica contida no extrato foi previamente oxidada a carbonato através de reação com peróxido de hidrogênio. Após elevação do pH do meio com 25,0ml de uma solução de hidróxido de amônia (1+9), as concentrações do composto nitrobenzênico formado foram avaliadas por dosagem colorimétrica a 420nm, em espectrofotômetro. As absorbâncias foram comparadas com as de uma reta padrão de nitrato de potássio, até 5,0 umoles de nitrato.

3.6. Dosagens de proteína.

As determinações de proteína solúvel foram realizadas nos extratos utilizados para a avaliação das atividades, in vitro, da redutase de nitrato (ítem 3.7). A quantidade de proteína contida numa alíquota de 1,0ml de extrato foi precipitada pela adição de igual volume de ácido tricloroacético a 10,0% du

rante um período de 12 horas a 0°C. A proteína foi separada do so brenadante por centrifugação a 5.000g durante 15 minutos e lavada com 2,0ml de éter etílico para eliminação de resíduos de clorofila e do ácido tricloroacético. Após nova centrifugação idêntica a anterior, o sedimentado protéico foi dissolvido em 5,0ml de hidróxido de sódio 0,1N.

A proteína foi dosada, após diluição conveniente, pelo método de Lowry, et al., 1951, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.7. Redutase de nitrato, in vitro: extração e ensaio.

As atividades, in vitro, da redutase de nitrato foram determinadas de acordo com o método descrito por Hageman e Hcklesby, 1971. O tecido foliar foi homogeneizado com meio extrator na proporção de 1:6 (p/v), contendo 25,0mM de fosfato de potássio pH 7,0; 5,0mM de EDTA e 10,0mM de L-cisteína na forma de hidrocloreto.

Após centrifugação do homogeneizado a 20.000g, durante 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático. Nos experimentos realizados com objetivo de se verificar o efeito da presença de proteína durante a extração da enzima, ao extrato foram adicionados 3% de caseína. Todo o procedimento descrito foi sempre realizado a uma temperatura de cerca de 4°C, em banho de gelo.

O método de ensaio constituiu-se numa modificação de Magalhães, 1973, da técnica descrita por Wells, 1971, citada

por Magalhães, 1973. O meio de reação continha 125,0mM de fosfato de potássio pH 6,8; 10mM de nitrato de potássio e 0,2mM de NADH. Nos experimentos planejados para se verificar o efeito da adição de caseína após a obtenção do extrato, essa proteína foi adicionada ao meio de reação da enzima, e não ao meio de extração da redutase de nitrato. A reação foi iniciada pela adição de 0,2ml do extrato enzimático, completando-se um volume total de 2,0ml.

Nos diferentes ensaios, o tempo de reação variou entre 10 e 20 minutos, em função da idade fisiológica do tecido foliar. Todos os ensaios foram realizados a temperatura constante de 32°C. Após um intervalo de tempo apropriado, a reação foi interrompida pela adição de 2,0ml de reagente constituído por 0,01% de N-naftiletilenodiamino e 0,5% de sulfanilamida em ácido clorídrico 0,75M. Após a estabilização do complexo diazo formado, as absorbâncias foram determinadas contra controles individuais (que não continham NADH no meio de reação), a 540nm, em espectrofotômetro.

As atividades enzimáticas foram expressas em umoles de nitrito produzido por grama de tecido fresco, durante uma hora, ou em umoles de nitrito por miligrama de proteína por hora, dependendo do objetivo da determinação.

3.8. Redutase de nitrato, in vivo.

A atividade, in vivo, da redutase de nitrato foi avaliada segundo técnica descrita por Hageman e Hucklesby, 1971 modificada por Magalhães, 1973. Duzentas miligramas de tecido foliar foram subdivididos em segmentos com cerca de 3 a 5mm de largu

ra e 10 a 20mm de comprimento, e colocados em recipientes de vidro de 30mm de diâmetro por 60mm de altura, contendo 5,0ml de solução denominada meio de infiltração, constituída por 0,1M de fosfato de potássio, pH 7,8, 0,1M de nitrato de potássio e 1% de N-propanol.

Nos experimentos realizados com a finalidade de se verificar a atividade enzimática somente em função da concentração de nitrato endógeno, o meio de infiltração não continha nitrato de potássio.

O tecido vegetal foi mantido submerso no meio de infiltração através de um suporte plástico revestido de uma tela de nylon, e submetido à infiltração a vácuo durante dois minutos. Após esse tratamento, os frascos foram mantidos à temperatura de 32°C, em banho maria sob agitação. Dentro de um intervalo de tempo variável entre 10 e 20 minutos, em função da idade do tecido, a quantidade de íons nitrito liberada no meio de infiltração foi determinada em alíquotas de 0,2ml de maneira idêntica a descrita anteriormente (3.7.).

As atividades enzimáticas foram expressas em umoles de nitrito produzido durante uma hora, por grama de tecido fresco, ou por folha, dependendo do objetivo.

3.9. Infiltração de glicose e malato no tecido foliar.

Duzentas miligramas de tecido, provenientes de plantas previamente mantidas no escuro durante 40 horas, foram colocadas nos recipientes de vidro juntamente com 5,0ml de meio de

infiltração contendo 100,0mM de glicose ou 100,0mM de malato de sódio. A infiltração foi realizada de maneira descrita anteriormente (3.8).

Os tecidos foliares, infiltrados com os devidos substratos, permaneceram em banho maria sob agitação, à temperatura de 32°C, durante pelo menos 15 minutos.

A liberação de íons nitrito no meio de infiltração, nos diferentes tratamentos, foi avaliada a cada 10 minutos em alíquotas de 0,2ml, de maneira descrita no ítem 3.8, dentro do período de tempo de 40 minutos.

Os valores das absorbâncias das soluções nos vários tratamentos foram comparados com aqueles obtidos no controle, que não continha nenhum dos substratos especificados. Os resultados foram apresentados em unidades de absorbância.

3.10. Absorção de nitrato por folhas intactas de diferentes idades fisiológicas.

Sementes de soja foram colocadas para germinar de maneira descrita no ítem 3.1, em lotes plantados a intervalos de tempo apropriados com a finalidade de se obter, simultaneamente, folhas primárias com diferentes idades: 4, 7 e 13 dias. Cerca de cinco folhas trifolioladas de cada uma das idades foram colocadas para absorver íons nitrato através dos pecíolos, durante um período de quatro horas, em câmaras de crescimento, à temperatura de 27°C, sob iluminação de 18.000 lux.

Os meios de absorção, para cada uma das idades, eram constituídos por 5,0mM de fosfato de potássio, pH 6,8, contendo

individualmente 1,6, 3,2, 6,4, 12,8 e 25,6mM de nitrato de potásio. Após o tempo de absorção, as concentrações de nitrato acumulado nos tecidos foram determinadas pelo método descrito no item 3.5. As diferenças entre as concentrações de nitrato determinadas após o tempo de absorção, e as quantidades medidas imediatamente antes do início do ensaio (tempo "zero"), em cada uma das idades, corresponderam às quantidades de nitrato acumuladas pelo tecido, durante 4 horas. Os dados foram expressos em umoles de nitrato acumulado, por grama de material fresco, durante as 4 horas.

Após o processo de absorção, as atividades, in vivo, (sem nitrato no meio de incubação do tecido) da enzima foram determinadas. O efeito da absorção do íon pelos tecidos foliares foi avaliado através da transformação de Lineweaver-Burk.

3.11. Protease: extração e ensaio.

As atividades de protease foram avaliadas de acordo com o método descrito por Harvey e Oaks, 1974, com algumas modificações. O tecido foliar foi homogeneizado em 25,0mM de fosfato de potássio, pH 6,5, contendo 10,0mM de L-cisteína. O sobrenadante, obtido pela centrifugação do extrato a 20.000g, foi utilizado como preparação enzimática.

A atividade da protease foi avaliada através da capacidade da enzima em hidrolizar hemoglobina. Cada tubo de reação continha 2,0ml de tampão fosfato 0,2M, pH 8,0 e 50,0mg de hemoglobina. A reação foi iniciada pela adição de 0,5ml do extrato e interrompido após 30 min. com 2,5ml de ácido tricloroacético a 10%. O ensaio foi realizado a temperatura de 40,0°C.

A precipitação da proteína não hidrolizada se processou durante 12 horas em banho de gelo. Após a centrifugação extrato a 5.000g, a absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 280nm, contra controle individual. Cada controle foi obtido interrompendo-se a reação no tempo "zero".

A atividade de protease foi arbitrariamente calibrada por meio de reta padrão de triptofano. As atividades foram expressas em microgramas de triptofano liberado durante uma hora, por grama de tecido fresco.

3.12. Instabilidade da redutase de nitrato.

A instabilidade da molécula da redutase de nitrato, avaliada através de alterações da atividade enzimática, foi estimada em folhas de diferentes idades, correspondendo ao 3º, 4º, 6º, 10º e 13º dia após a emergência da lâmina foliar, por meio da determinação do decaimento das atividades in vitro, isto é em função do tempo necessário, transcorrido entre a extração da enzima e o ensaio, para que os valores de atividade fossem reduzidos à metade ($T-1/2$). Os valores de decaimento foram calculados pelas equações de regressão entre os logarítmos decimais das atividades enzimáticas e os valores em minutos, dos intervalos de tempo.

As determinações dos decaimentos foram realizadas mantendo-se os extratos enzimáticos a 0°C. O ensaio enzimático foi realizado de maneira descrita no item 3.7.

3.13. Estudo termo-cinético da redutase de nitrato.

Os extratos enzimáticos foram obtidos de acordo com o procedimento descrito no ítem 3.7. Foram determinadas, em três idades distintas do desenvolvimento da folha, temperaturas que pudessem induzir alterações na estrutura da enzima, assim como foi investigado o efeito da presença de caseína no meio de extração da redutase de nitrato, sobre os valores de temperaturas que induziram transformações na estruturação da molécula da enzima.

As preparações enzimáticas foram divididas em alíquotas de 0,5ml e mantidas, durante 15 minutos, em temperaturas específicas entre 0°C e 38°C. Posteriormente, as alíquotas foram transferidas para banho de gelo durante 15 minutos. As atividades da enzima foram determinadas, in vitro, de maneira descrita anteriormente no ítem 3.7.

As temperaturas que induziram alterações na estruturação da molécula da enzima, assim como os valores das energias de ativação do processo de inativação enzimática, foram avaliadas segundo a equação de Arrhenius:

$$\text{Log } K_2/K_1 = \frac{-A}{2,3026 \times 1,987} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad \text{onde:}$$

K_2 e K_1 representam as velocidades da reação enzimática nas temperaturas absolutas T_2 e T_1 e A representa a energia de ativação do processo de inativação, em cal.mol⁻¹.

A partir dos valores das tangentes das funções lineares entre os valores de LogK e 1/T, foram calculadas as energias de ativação. As temperaturas que induziram alterações na es-

truturação da enzima foram calculadas através dos pontos de interseção das funções.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade da redutase de nitrato durante a ontogênese da folha.

As atividades in vivo e in vitro da redutase de nitrato foram determinadas durante o crescimento da primeira folha trifoliolada com o objetivo de observar a seqüência das variações nas taxas de redução de nitrato durante o desenvolvimento foliar. Além disso, os dois métodos empregados na avaliação das atividades da enzima, foram cotejados com a finalidade de investigar diferenças quantitativas entre eles.

Verificou-se que os dois métodos empregados nas determinações das atividades enzimáticas mostram valores que diferem entre si (Fig. 1). A relação existente entre os valores das atividades in vitro, e aqueles determinados in vivo, foi determinada através de equação de regressão, e pode ser expressa da seguinte forma: Atividade in vitro = 0,43 (Atividade in vivo) + 0,1 (Fig. 2).

As atividades determinadas in vivo e in vitro, que no segundo dia da emergência foliar apresentaram valores iguais a 10,0 $\mu\text{M de NO}_2^-.g^{-1}.h^{-1}$ e 4,5 $\mu\text{M de NO}_2^-.g^{-1}.h^{-1}$, respectivamente, mostraram um padrão ascendente com picos de máximas atividades no 4º dia do desenvolvimento foliar, correspondentes a 25,0 e 11,0 $\mu\text{M de NO}_2^-.g^{-1}.h^{-1}$.

Os picos de máximas atividades foram coincidentes com a fase do crescimento logarítmico da área foliar, e corresponde a fase do desenvolvimento foliar equivalente a 1/3 da expansão

Fig. 1. Variações na atividade da redutase de nitrato ($\mu\text{M NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), in vivo ($\triangle-\triangle$) e in vitro ($\circ-\circ$) durante a ontogênese da primeira folha trifoliolada. O desenvolvimento da folha é apresentado pelas variações da área foliar, em dm^2 ($\square-\square$).

FIG. 1

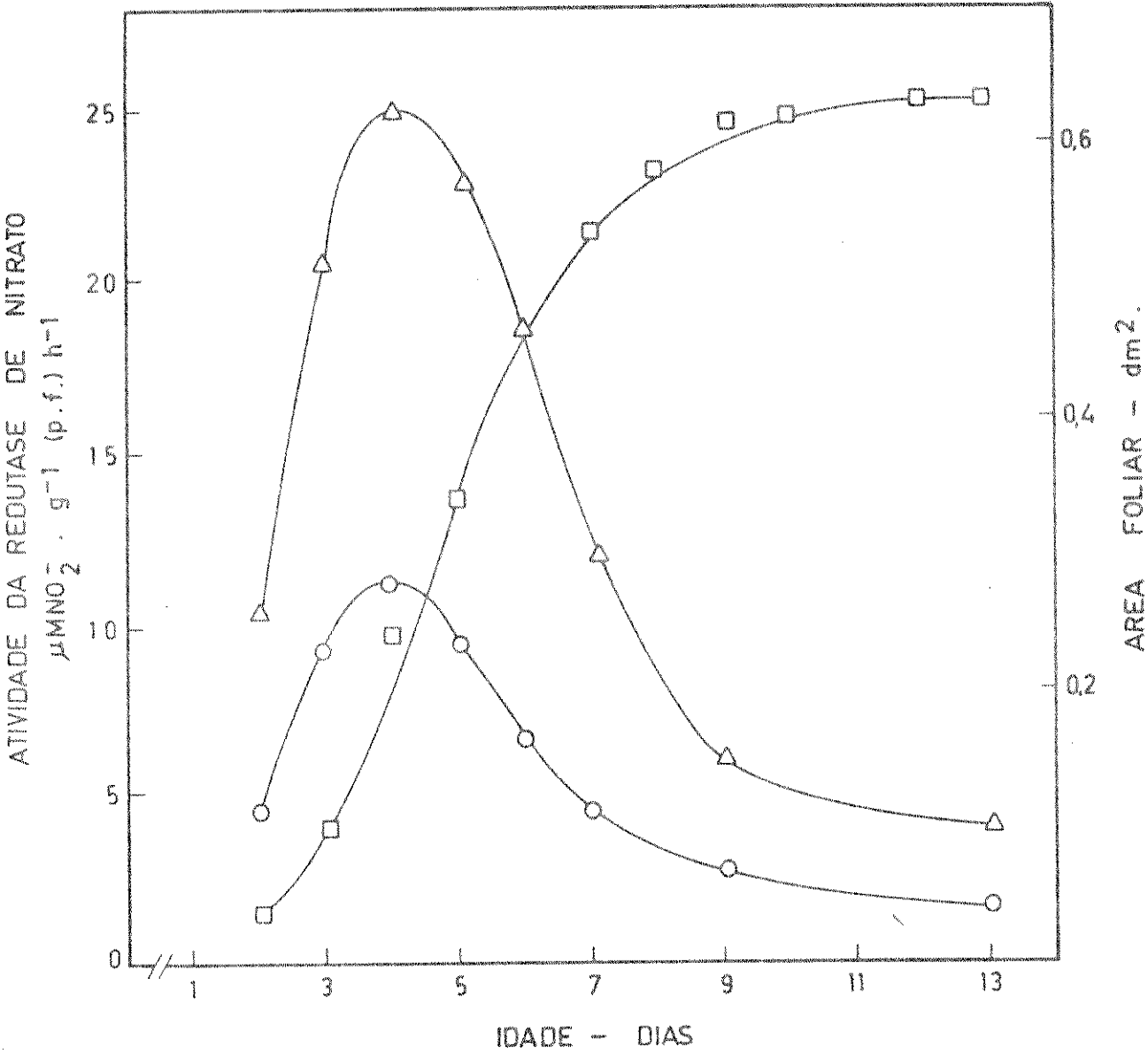
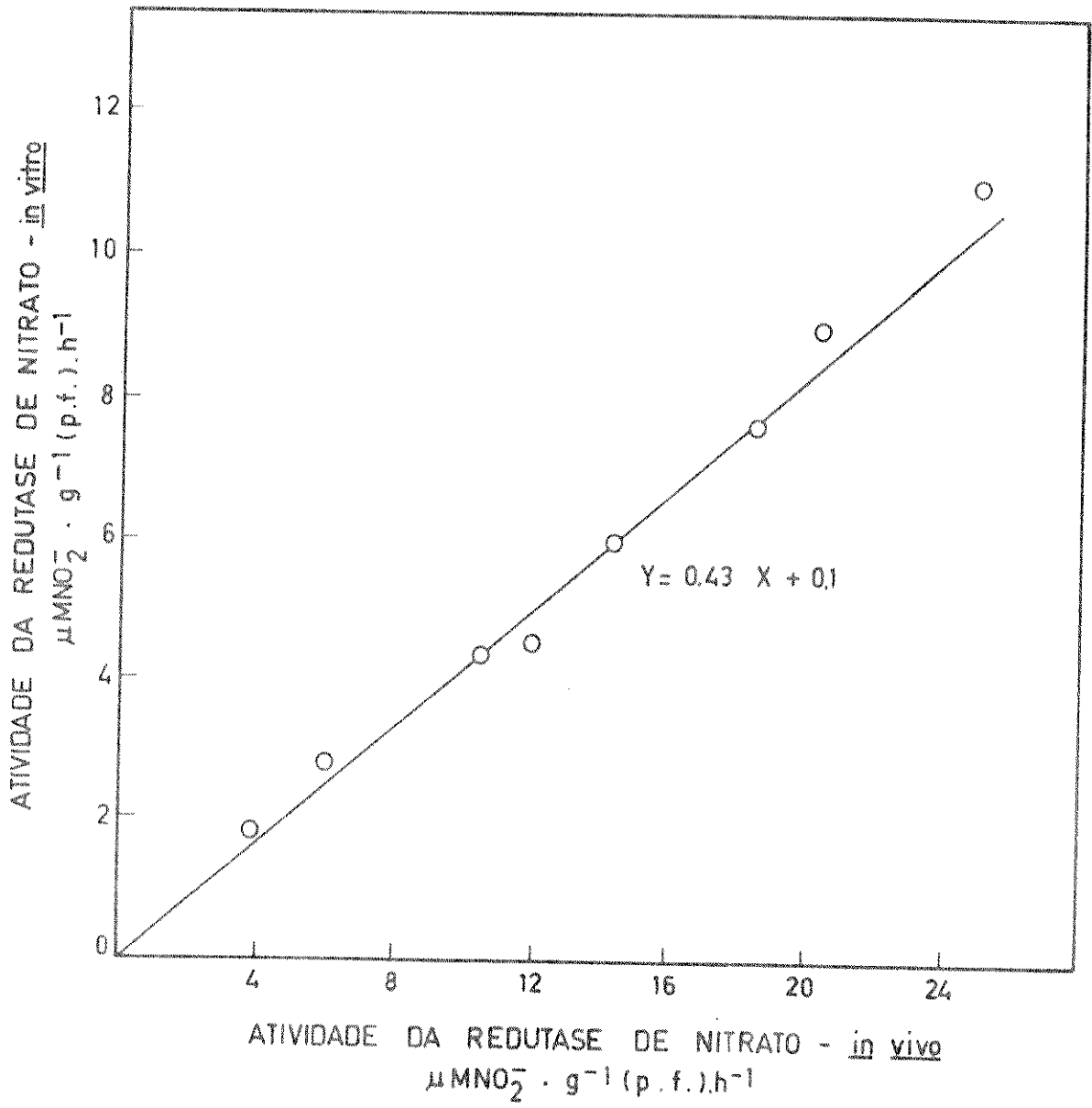


FIG. 2. Correlação entre as atividades da redutase de nitrato determinadas in vivo (com 100 mM de nitrato no meio de incubação do tecido) e in vitro ($\mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), na primeira folha trifoliolada.

FIG. 2



foliar máxima, verificada aos treze dias após a emergência da folha ($0,63 \text{ dm}^2$).

A partir do 4º dia do desenvolvimento foliar, o padrão descendente das atividades (in vivo e in vitro), foi exponencialmente proporcional à idade do tecido foliar, pelo menos até o 9º dia após a emergência da folha. Nesta idade, as atividades enzimáticas determinadas in vitro e in vivo apresentaram valores respectivamente iguais a 2,8 e 6,0 $\mu\text{M de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

No final do período ontogenético investigado, ou seja, no 13º dia após a emergência do tecido foliar, aqueles valores de atividade representaram, em ambos os casos, apenas 16% dos máximos apresentados no 4º dia.

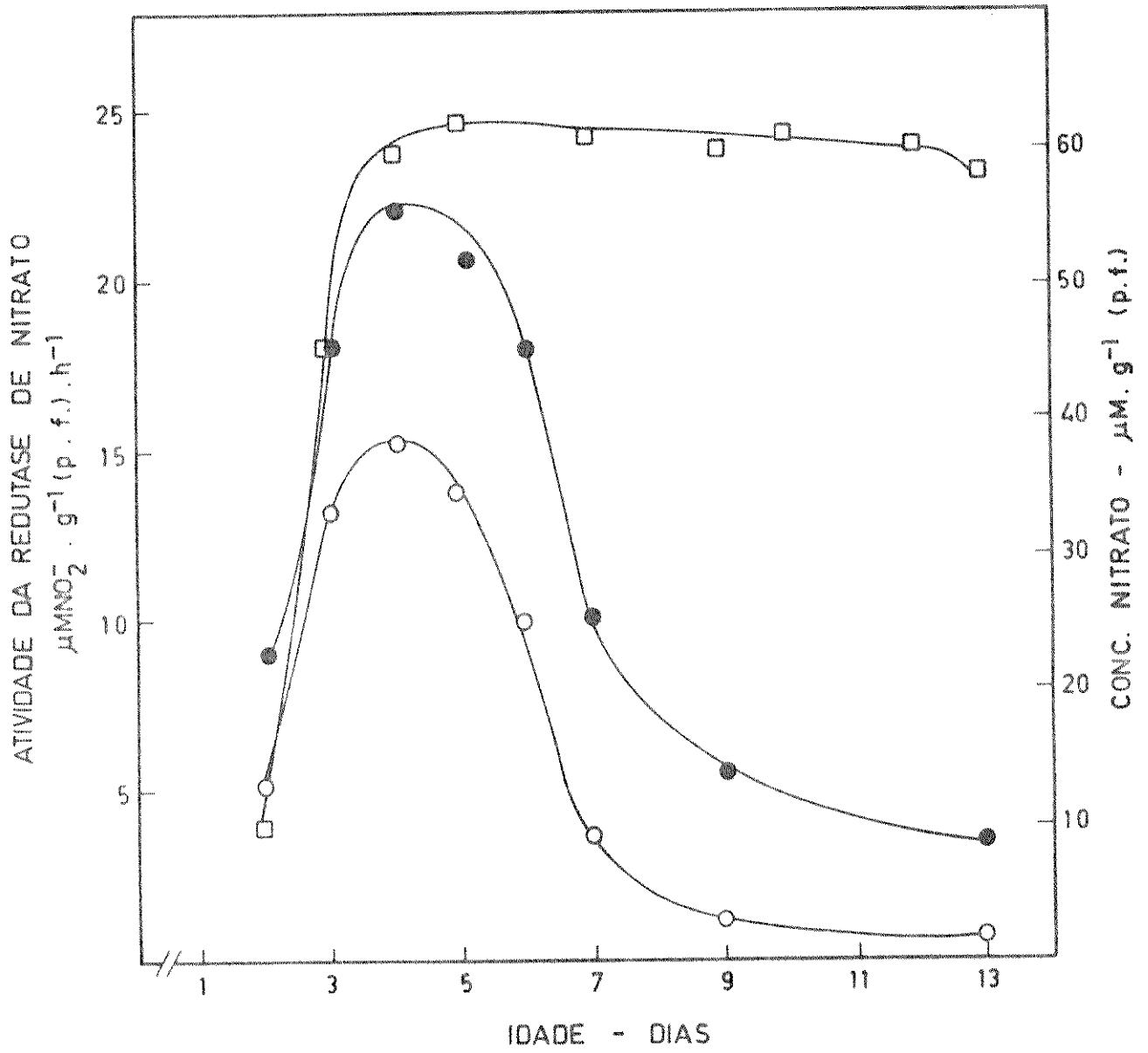
4.2. Concentração endógena de nitrato e o efeito na atividade, in vivo, da redutase de nitrato.

Os valores das concentrações de nitrato durante o desenvolvimento da primeira folha trifoliolada são apresentados na Fig. 3. As variações na atividade, in vivo, da enzima, determinadas simultaneamente na presença e ausência daquele íon no meio de incubação do tecido, estão incluídas na figura.

A concentração de nitrato, no segundo dia do desenvolvimento foliar, foi equivalente a $10,0 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido fresco e atingiu aproximadamente $60,0 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$, no quinto dia. Essa concentração máxima de nitrato na folha, praticamente coincidente com a máxima atividade da redutase de nitrato, manteve-se constante durante todo o período da ontogênese foliar. As variações na atividade da enzima determinadas no mesmo período, mostraram um pa

FIG. 3. Concentrações de nitrato em $\mu\text{M.g}^{-1}$ ($\square-\square$), e variações na atividade in vivo da redutase de nitrato ($\mu\text{MNO}_2^{-}.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), determinada na presença ($\bullet-\bullet$) e na ausência ($\circ-\circ$) de nitrato no meio de incubação do tecido, durante a ontogênese da primeira folha trifoliolada.

FIG. 3



drão semelhante àquele descrito anteriormente (4.1). Os valores da atividade enzimática calculadas no ensaio realizado sem nitrato no meio de incubação do tecido foram menores do que aqueles a avaliados na presença daquele íon. A Tabela-1 mostra o efeito do nitrato no meio de incubação do tecido em função da idade da folha, através das relações entre as atividades determinadas na presença e na ausência de nitrato no meio.

O menor efeito do íon foi coincidente com a máxima atividade da redutase de nitrato. A presença de nitrato no meio proporcionou um aumento na atividade da enzima de cerca de 40%, em comparação com o valor obtido na sua ausência. Durante a ontogênese foliar, aquele efeito foi crescente, atingindo um valor e quivalente a cerca de 400% no 13º dia após a emergência da folha trifoliolada.

IDADE (dias)	REDUTASE DE NITRATO (relação c/NO_3^- : s/NO_3^-)
2	1,8
3	1,4
4	1,4
5	1,5
6	1,8
7	2,6
9	4,8
13	5,4

Tabela - 1. Efeito do nitrato presente no meio de incubação do tecido, avaliado pela relação entre as atividades, in vivo, da redutase de nitrato, na presença e na ausência do íon.

As variações na atividade total (por folha) da redutase de nitrato, bem como as variações no conteúdo de nitrato no tecido durante o desenvolvimento foliar, são apresentados na Fig. 4. Nota-se que, independentemente da presença de nitrato no meio de incubação da enzima, as variações na atividade enzimática mostraram um padrão crescente desde o 2º até o 5º dia da emergência da folha. As atividades máximas nesse estágio do desenvolvimento corresponderam a $6,6 \text{ uM de NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, na presença do nitrato no meio de incubação do tecido, e $4,3 \text{ uM de NO}_2^- \cdot \text{f}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ na ausência daquele íon. Os padrões decrescentes observados após o 5º dia foram semelhantes aos já descritos anteriormente.

O efeito da presença de nitrato no meio de incubação do tecido foliar foi idêntico àquele apresentado na Tabela 1, uma vez que a atividade total foi determinada através dos valores de área foliar específica em cada uma das idades, e que esses valores permaneceram constantes durante o período da ontogênese investigado.

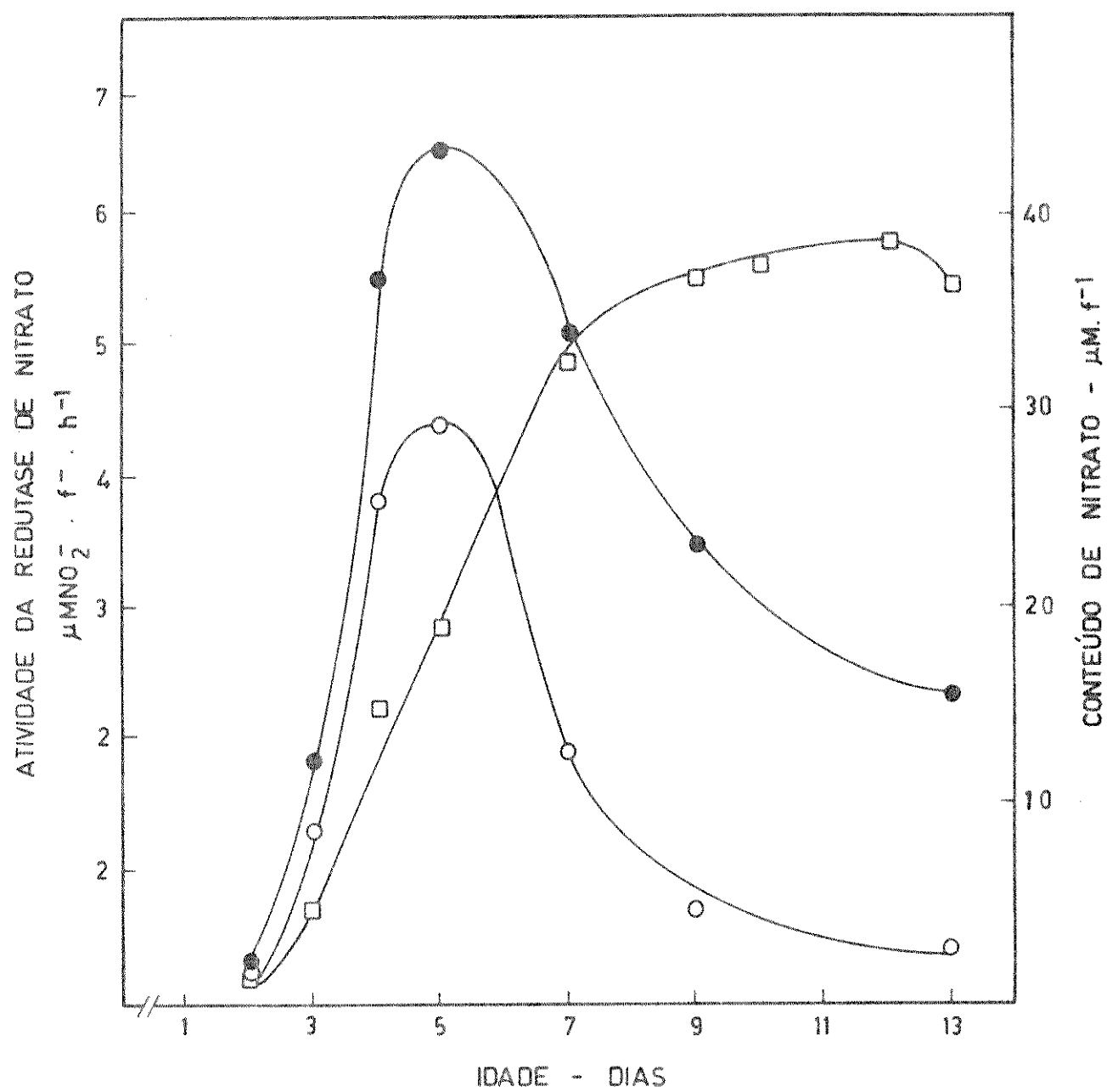
O conteúdo total (por folha) de nitrato, que no segundo dia da emergência da folha foi de $1,0 \text{ uM}$, aumentou de maneira praticamente linear até o sétimo dia, apresentando um valor de aproximadamente $32,0 \text{ uM}$. A partir desse estágio do desenvolvimento esse aumento foi menos pronunciado, chegando a cerca de $36,0 \text{ uM}$ no 13º dia do período ontogenético em questão.

4.3. Atividade específica, in vitro, da redutase de nitrato.

A atividade específica da enzima foi determinada em

FIG. 4. Conteúdo de nitrato em μM por folha ($\square-\square$) e variações na atividade total, in vivo, da redutase de nitrato ($\mu\text{MNO}_2^-.\text{folha}^{-1}.\text{h}^{-1}$) determinada na presença ($\bullet-\bullet$) e na ausência de nitrato no meio de incubação do tecido ($\circ-\circ$), durante a ontogênese da primeira folha trifoliolada.

FIG. 4



função da concentração de proteína no extrato enzimático. As concentrações de proteína durante o desenvolvimento da primeira folha trifoliolada estão apresentados na Fig. 5. No primeiro dia após a emergência foliar o teor em proteína no tecido foi equivalente a cerca de $50,0 \text{ mg.g}^{-1}$ de tecido fresco, decrescendo exponencialmente com a idade do tecido foliar até o 6º dia. Após essa idade, a concentração na folha permaneceu praticamente constante, atingindo cerca de 20% daquele valor após o 9º dia de desenvolvimento.

A atividade máxima da redutase de nitrato, determinada em função da quantidade de proteína do extrato, foi equivalente a cerca de $0,7 \text{ uM de NO}_2^-. \text{mg}^{-1} \text{ prot.h}^{-1}$, e foi observada no quinto dia da emergência da folha. No segundo dia do desenvolvimento da folha, a atividade específica da redutase de nitrato foi de $0,15 \text{ uM de NO}_2^-. \text{mg}^{-1} \text{ prot.h}^{-1}$. O decréscimo na atividade enzimática, observado a partir do ponto de máxima, foi exponencialmente proporcional à idade do tecido. No 13º dia, a atividade específica correspondeu a cerca de 25% daquela verificada no estágio de máxima atividade (Fig. 6).

4.4. Infiltração de glicose e malato no tecido foliar.

A infiltração de glicose e malato no tecido foliar foi realizada em duas idades fisiológicas que mostraram valores distintos nas atividades da redutase de nitrato, in vivo ou in vitro. Nestes ensaios foram utilizados tecidos foliares com idades correspondentes ao 4º e 7º dias após a emergência da folha

FIG. 5. Concentrações de proteína (mg.g^{-1}) durante a ontogênese da primeira folha trifoliolada.

FIG. 5

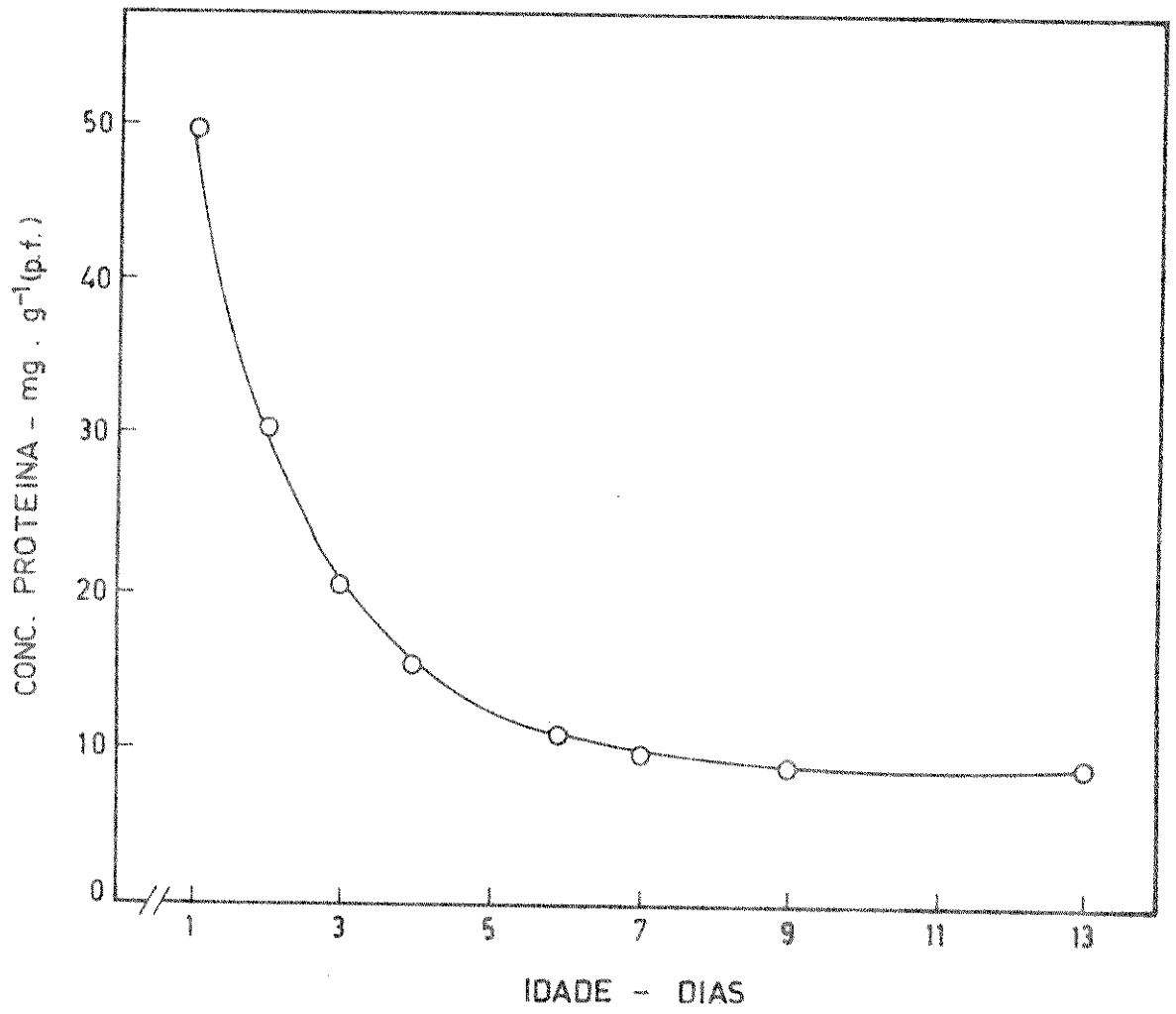
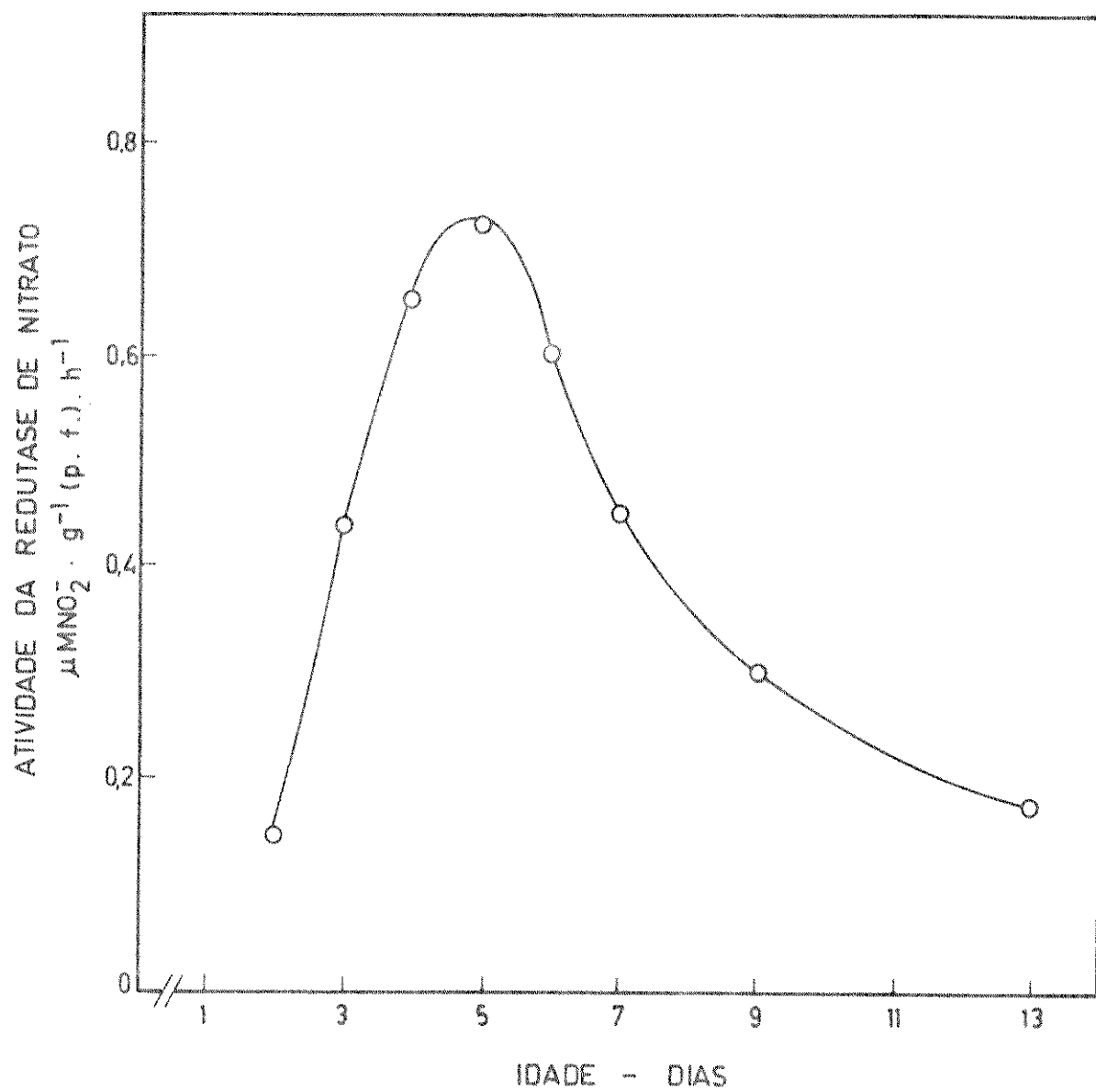


FIG. 6. Variações da atividade específica da redutase de nitrato ($\mu\text{MNO}_2^- \cdot \text{mg Proteína}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), determinada in vi
tro, durante o desenvolvimento da primeira folha trifoliolada de soja.

FIG. 6



trifoliolada. Os dados estão apresentados nas Figs. 7A e 7B respectivamente.

A liberação de íons nitrito decorrente da redução do nitrato, nos diferentes meios de incubação, foi diretamente proporcional ao tempo de reação a partir do 10º minuto do início do processo, independentemente da idade do tecido foliar.

O efeito da presença de glicose no meio de infiltração do tecido, sobre a taxa de redução de nitrato, foi evidente em ambas as idades dos tecidos, quando comparadas com os controles.

Por outro lado, a presença de malato aparentemente não alterou a liberação de nitrito no meio de incubação do tecido, independentemente da idade da folha.

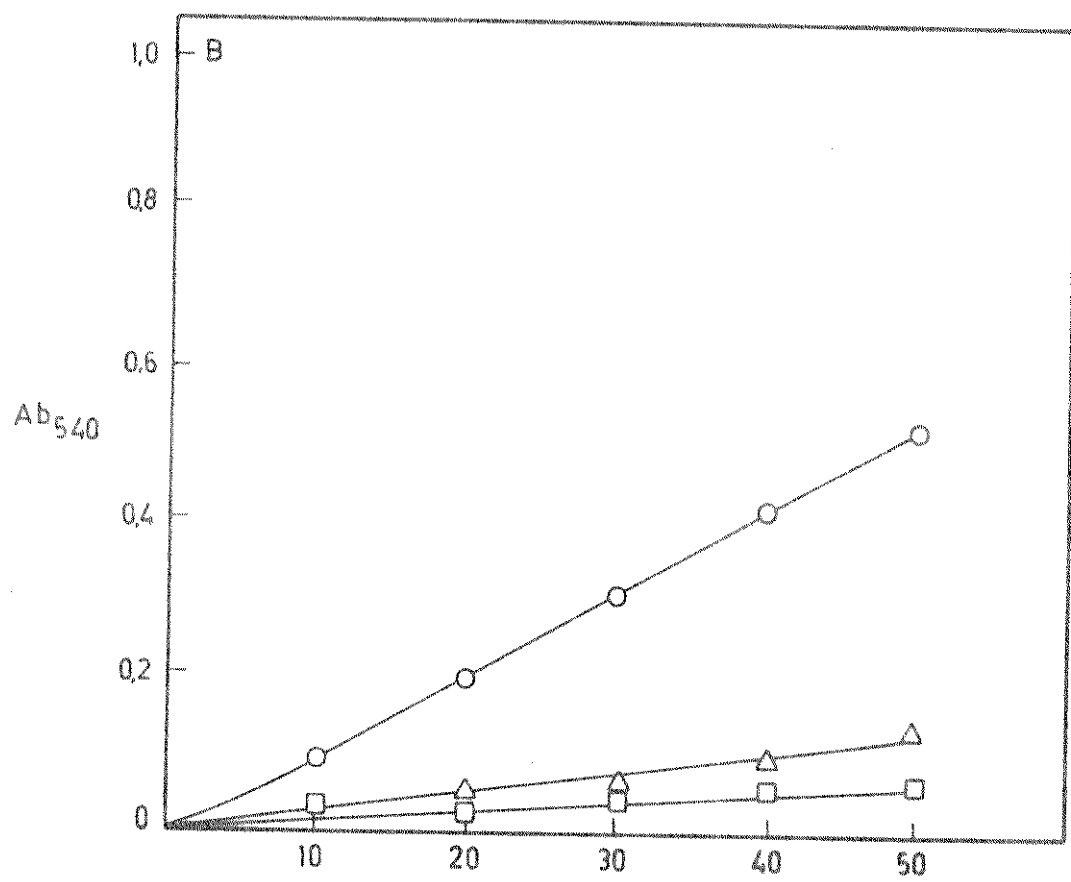
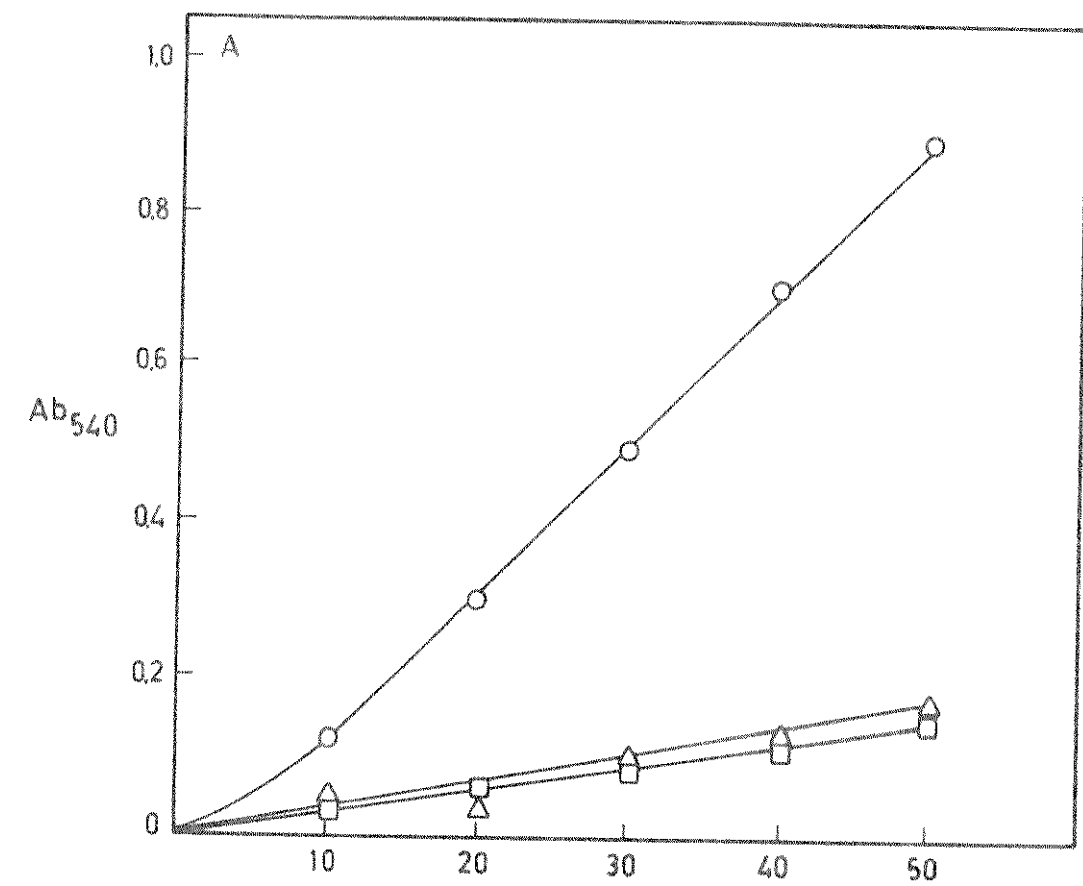
Dentro do intervalo de tempo compreendido entre 10 e 50 minutos do início da liberação de nitrito, as taxas de aumento dos valores das absorbâncias dos tratamentos com glicose foram equivalentes a cerca de 6 e 8 vezes àquelas dos controles, respectivamente nos tecidos foliares com idades fisiológicas correspondentes ao 4º e 7º dias da emergência.

4.5. Efeito de glicose na atividade, in vivo, da redutase de nitrato.

As variações na atividade da redutase de nitrato, de terminada na presença e na ausência de glicose, estão mostradas na Fig. 8. As curvas representativas dessas variações, durante a ontogênese foliar, são idênticas entre si, mostrando um pico de máxima atividade, ao redor de $25,0 \text{ } \mu\text{M de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, aos 4 dias

FIG. 7. Efeito da presença de malato ($\Delta-\Delta$) e glicose ($\bigcirc-\bigcirc$) na liberação de nitrito, in vivo, avaliada através do aumento na absorbância a 540 nm do meio de incubação do tecido, e do controle ($\square-\square$), na primeira folha trifoliolada de 4 dias (A) e de 7 dias de idade(B).

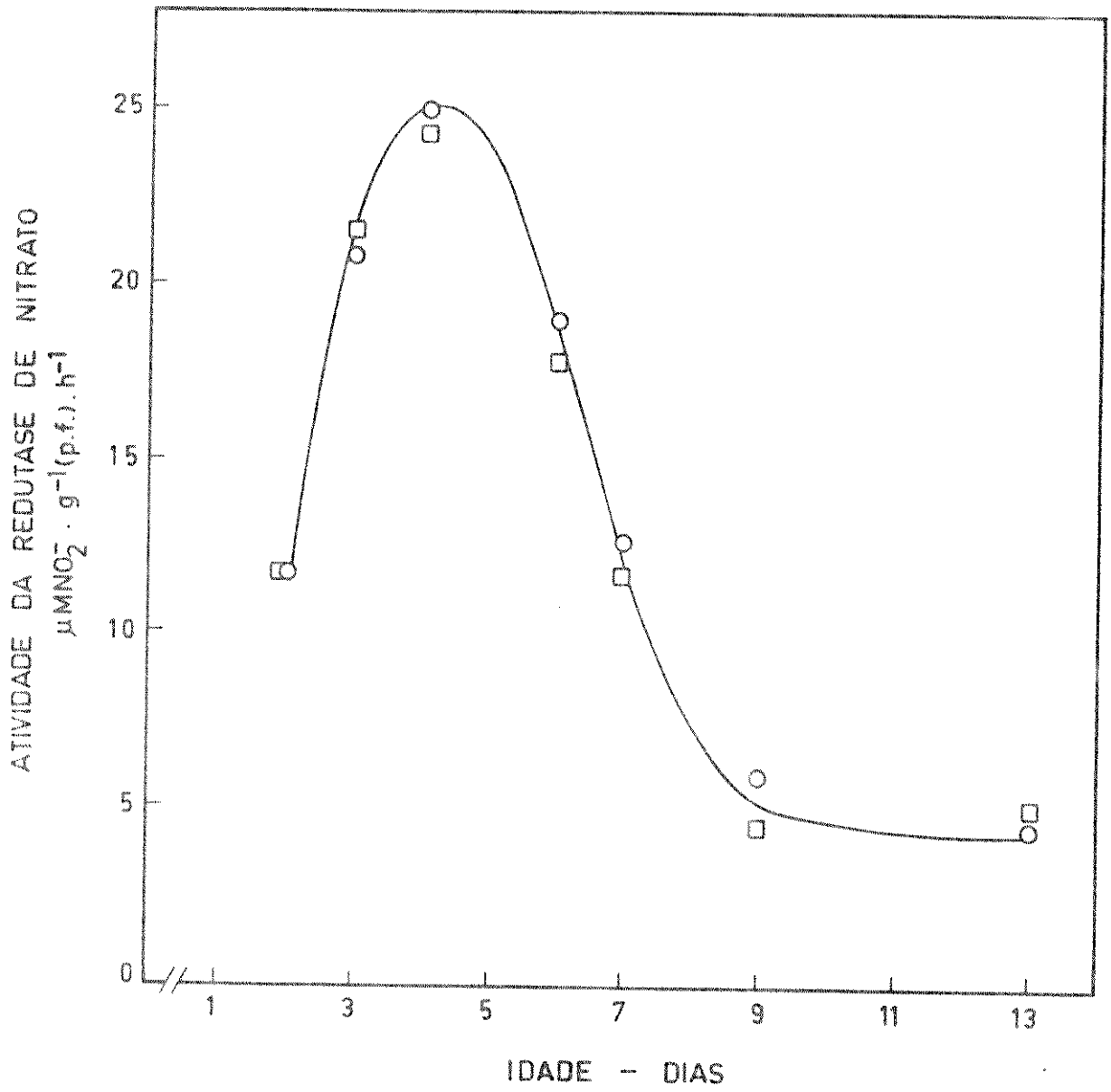
FIG. 7



TEMPO DE REAÇÃO - MINUTOS

FIG. 8. Variações da atividade in vivo da redutase de nitrato ($\mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), na presença de 100 mM de glicose no meio de incubação do tecido (○—○) e no controle (□—□), durante a ontogênese de folha de soja.

FIG. 8



após a emergência da folha. A atividade enzimática do tratamento contendo glicose, bem como do tratamento controle, diminui de maneira idêntica, apresentando valores ao redor de $5,0 \mu\text{M de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no 13º dia; cerca de 20% daquele verificado no 4º dia do desenvolvimento da folha.

4.6. Instabilidade da redutase de nitrato.

Independentemente da idade do tecido foliar, verificou-se que o decaimento da atividade enzimática foi exponencialmente proporcional ao tempo decorrido após a extração da enzima (Fig. 9).

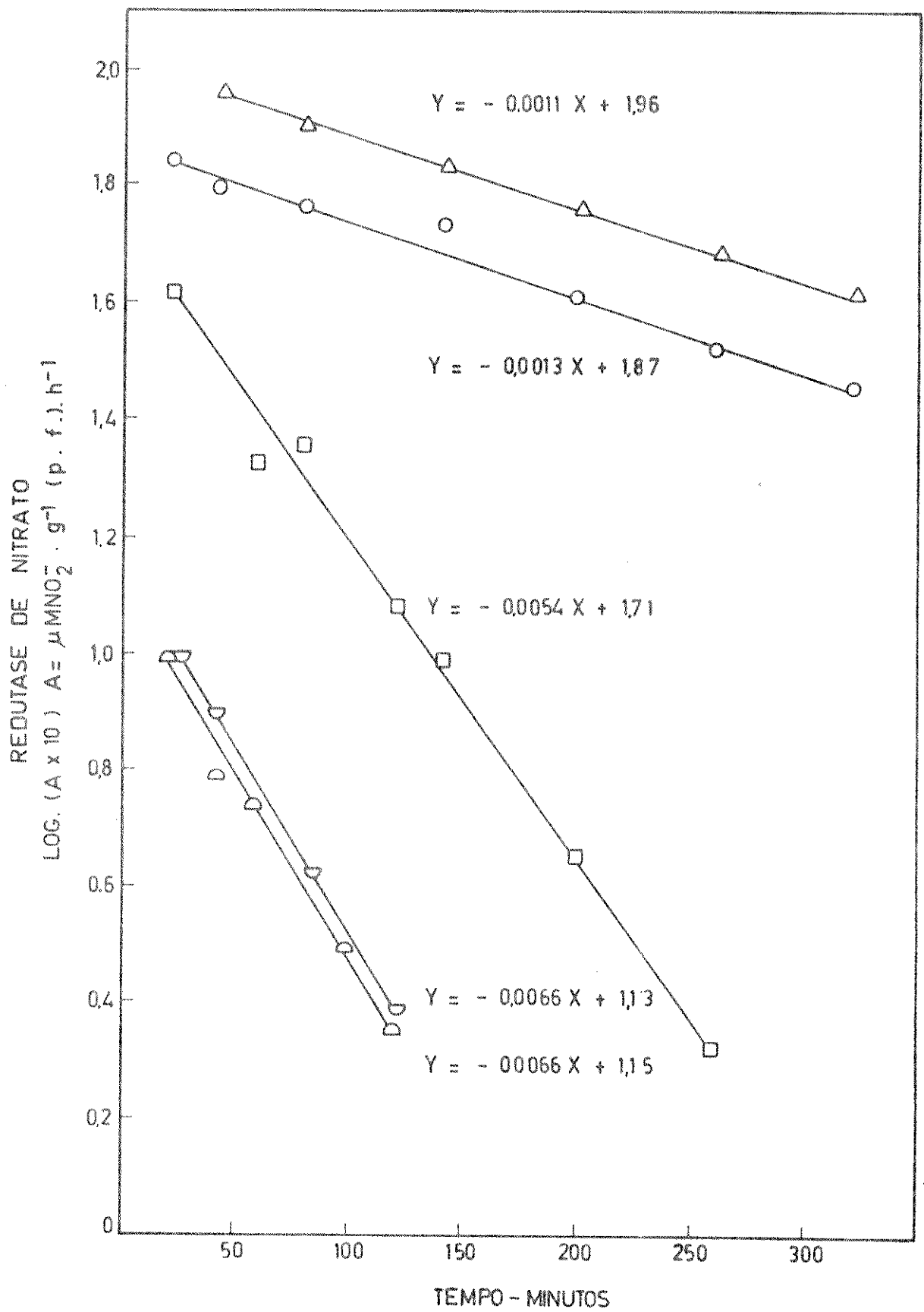
A tabela-2 apresenta os valores das taxas de decaimento da atividade enzimática em folhas de diferentes idades fisiológicas.

IDADE (dias)	TAXA DE DECAIMENTO ($T-1/2$ - hs)
3	3,8
4	4,6
6	0,9
10	0,7
13	0,7

Tabela - 2. Instabilidade da redutase de nitrato em folhas de diferentes idades, avaliada através das taxas de decaimento da atividade enzimática determinada in vitro.

As menores instabilidades foram verificadas nos extratos enzimáticos provenientes de tecidos foliares com idades

FIG. 9. Decaimento da atividade in vitro da redutase de nitrato, na primeira folha trifoliolada de diferentes idades fisiológicas: 3 dias (●—●), 4 dias (△—△), 6 dias (□—□), 10 dias (◻—◻) e 13 dias (◻—◻).



fisiológicas correspondentes ao 3º e 4º dias da emergência da folha.

Por outro lado, as maiores instabilidades da enzima foram verificadas após o pico de máxima atividade da redutase de nitrato. A enzima extraída de folhas com 6 dias de idade mostrou uma instabilidade cerca de cinco vezes aquela apresentada no 4º dia do desenvolvimento da folha. As instabilidades observadas nos dias 10 e 13 após a emergência da folha foram idênticas entre si ($T-1/2 = 0,7h$), e corresponderam a valores seis vezes aqueles que prevaleceram no pico de máxima atividade.

4.7. Efeito de caseína na instabilidade da redutase de nitrato.

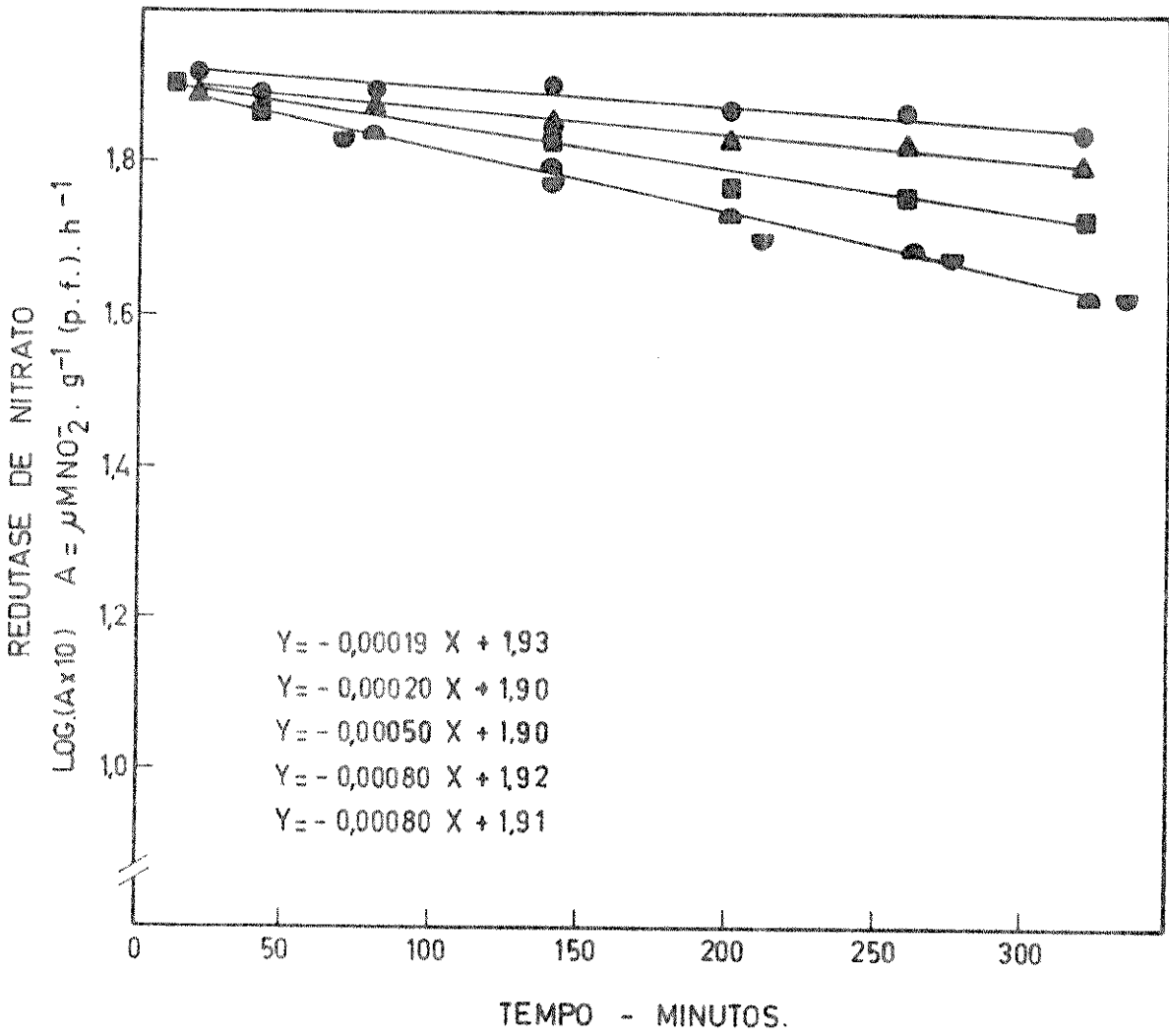
Os valores de decaimento da atividade da redutase de nitrato extraída em meio contendo caseína, em diferentes idades da folha, estão apresentados na Fig. 10.

A presença da proteína durante a extração da enzima proporcionou, independentemente da idade do tecido, menor instabilidade da redutase de nitrato, em comparação com aquela avaliada na ausência de caseína (Fig. 9).

As taxas de decaimento da atividade enzimática figuram na Tabela-3. As menores instabilidades foram verificadas nos extratos enzimáticos provenientes de folhas com 3 e 4 dias de idade (26,4hs e 26,0hs respectivamente). A enzima extraída nesse período do desenvolvimento foi 2,6 vezes mais estável do que a obtida no 6º dia do desenvolvimento foliar, e 4,3 vezes aquela do 13º dia.

FIG. 10. Decaimento da atividade in vitro da redutase de nitrato extraída na presença de 3% de caseína, na primeira folha trifoliolada de diferentes idades fisiológicas: 3 dias (●—●), 4 dias (▲—▲), 6 dias (■—■), 10 dias (☪—☪) e 13 dias (◐—◐).

FIG. 10



IDADE (dias)	TAXA DE DECAIMENTO (T-1/2 - hs)
3	26,4
4	26,0
6	10,0
10	6,1
13	6,2

Tabela - 3. Instabilidade da redutase de nitrato em folhas de diferentes idades, avaliada através das taxas de decaimento da atividade enzimática determinada in vitro, na presença de caseína.

Relacionando-se os dados apresentados na Tabela - 3 com os da Tabela - 2, nota-se que o efeito da caseína na diminuição da instabilidade da redutase de nitrato foi maior nos tecidos com 6, 10 e 13 dias de idade, em comparação com o efeito da proteína nos 3º e 4º dias da ontogênese foliar (Tabela-4).

IDADE (dias)	TAXA DE DECAIMENTO (razão c/cas.:s/cas.)
3	6,9
4	5,7
6	11,1
10	8,7
13	8,8

Tabela - 4. Relação entre os valores das taxas de decaimento, determinadas na presença e na ausência de caseína, em diferentes idades da folha.

4.8. Efeito da caseína na atividade, in vitro, da redutase de nitrato.

As variações na atividade enzimática determinadas em extratos com e sem caseína, durante a ontogênese da folha, estão mostradas na Fig. 11. Verificou-se que a presença de caseína no meio de extração da enzima proporcionou a manutenção da atividade máxima da redutase de nitrato ($9,2 \text{ } \mu\text{M de NO}_2^-. \text{g}^{-1}. \text{h}^{-1}$), durante o período ontogenético compreendido entre o 4º e 13º dias após a emergência da folha.

As variações na atividade da enzima extraída na ausência de caseína, mostraram um padrão idêntico ao apresentado anteriormente (4.1), com um pico de máxima atividade no 4º dia após a emergência da folha. Nessa fase do desenvolvimento, o efeito da caseína na atividade enzimática foi praticamente inexistente, aumentando exponencialmente com a idade do tecido foliar. A área compreendida entre as curvas representativas das variações das atividades enzimáticas, na presença e na ausência de caseína no meio extrator, representa graficamente o efeito daquela proteína nos níveis de atividade da redutase de nitrato.

4.9. Efeito de caseína adicionada no meio de reação da redutase de nitrato.

Os decréscimos da atividade determinada in vitro, em função do tempo decorrido após a extração da enzima, em folhas de 5 e 11 dias de idade, são apresentados nas Figs. 12A e 12B. Enquanto que a atividade enzimática mostrada na figura 12A foi

FIG. 11. Variações da atividade in vitro da redutase de ni
trato, na presença (●—●) e na ausência (○—○)
de 3% de caseína no meio de extração da enzima
durante a ontogênese da primeira folha trifoliola
da.

FIG. 11

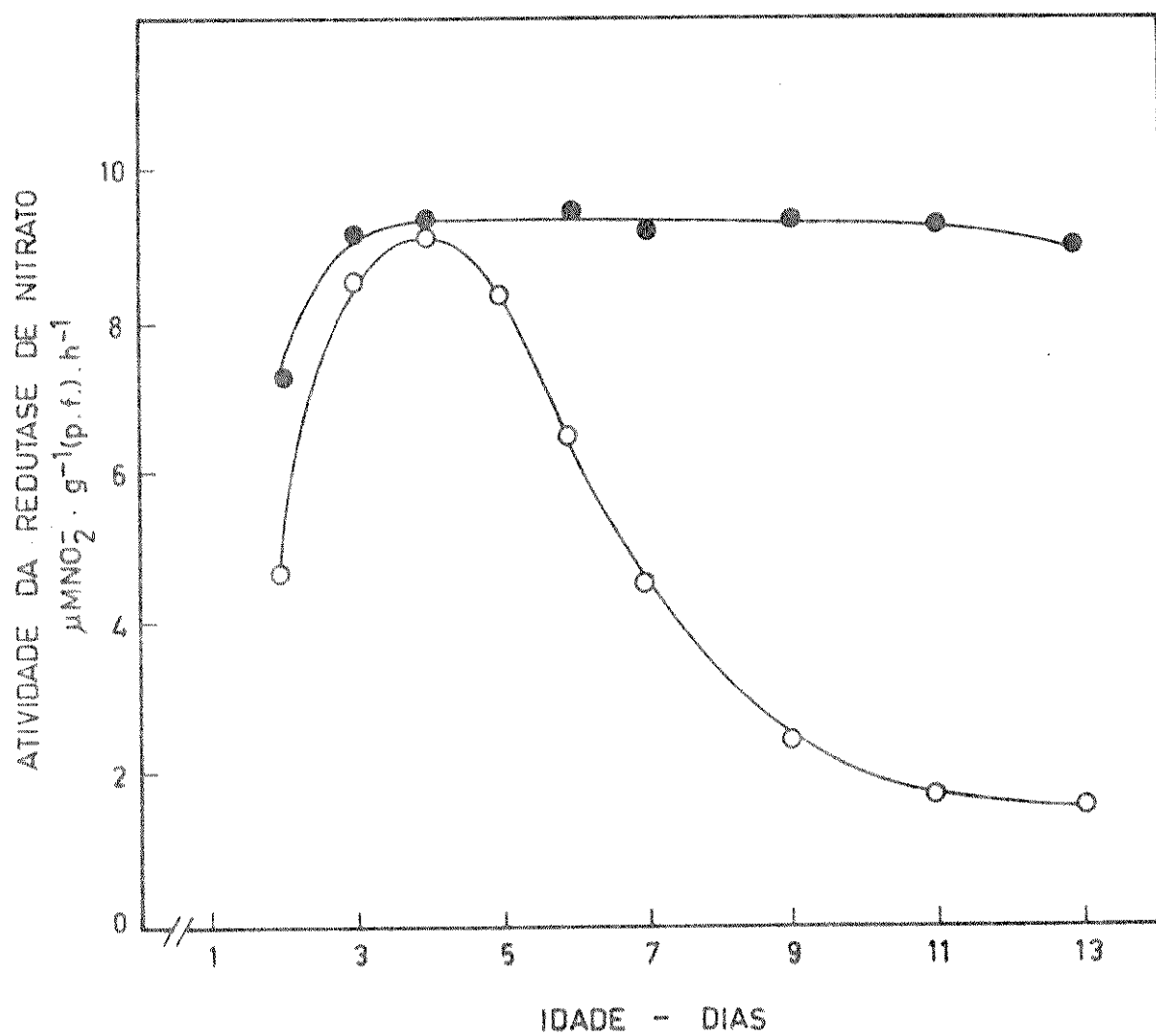
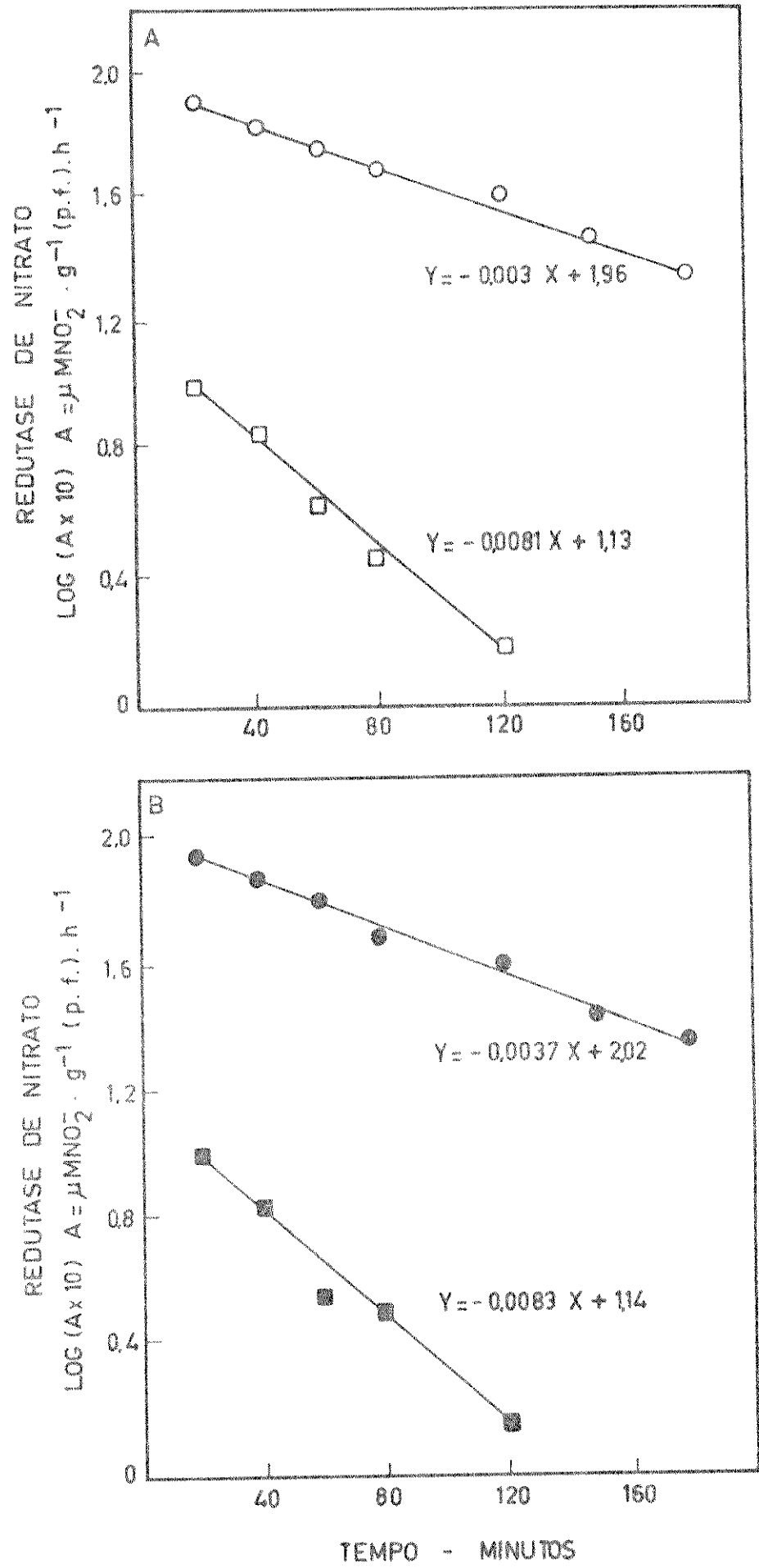


FIG. 12. Decaimento da atividade in vitro da redutase denitrato, na ausência (A) e na presença (B) de 3% de caseína no meio de reação da enzima, na primeira folha trifoliolada, e em duas idades distintas: 5 dias (○—○ e ●—●) e 11 dias (□—□ e ■—■).

FIG. 12



determinada na ausência de caseína no meio de reação, aquela representada na Fig. 12B foi avaliada na presença daquela proteína.

As taxas de decaimento da redutase de nitrato, em folhas de 5 e 11 dias de idade, e determinadas sem caseína no meio de reação, foram iguais a 1,5hs e 0,6h respectivamente. O valor de $T-1/2$ da enzima obtido na presença de caseína, em folhas de 5 dias de idade, foi de 1,3hs, enquanto que folhas com 11 dias apresentaram taxa de decaimento idêntica àquela verificada na ausência da proteína (0,6h).

Comparando-se as equações de regressão mostradas na Fig. 12A com aquelas da Fig. 12B, vê-se que o nível da atividade enzimática, dentro de uma mesma idade de tecido, não foi alterado pela presença de caseína no meio de reação, da mesma maneira que as taxas de decaimento não diferiram entre si, com relação ao efeito da caseína.

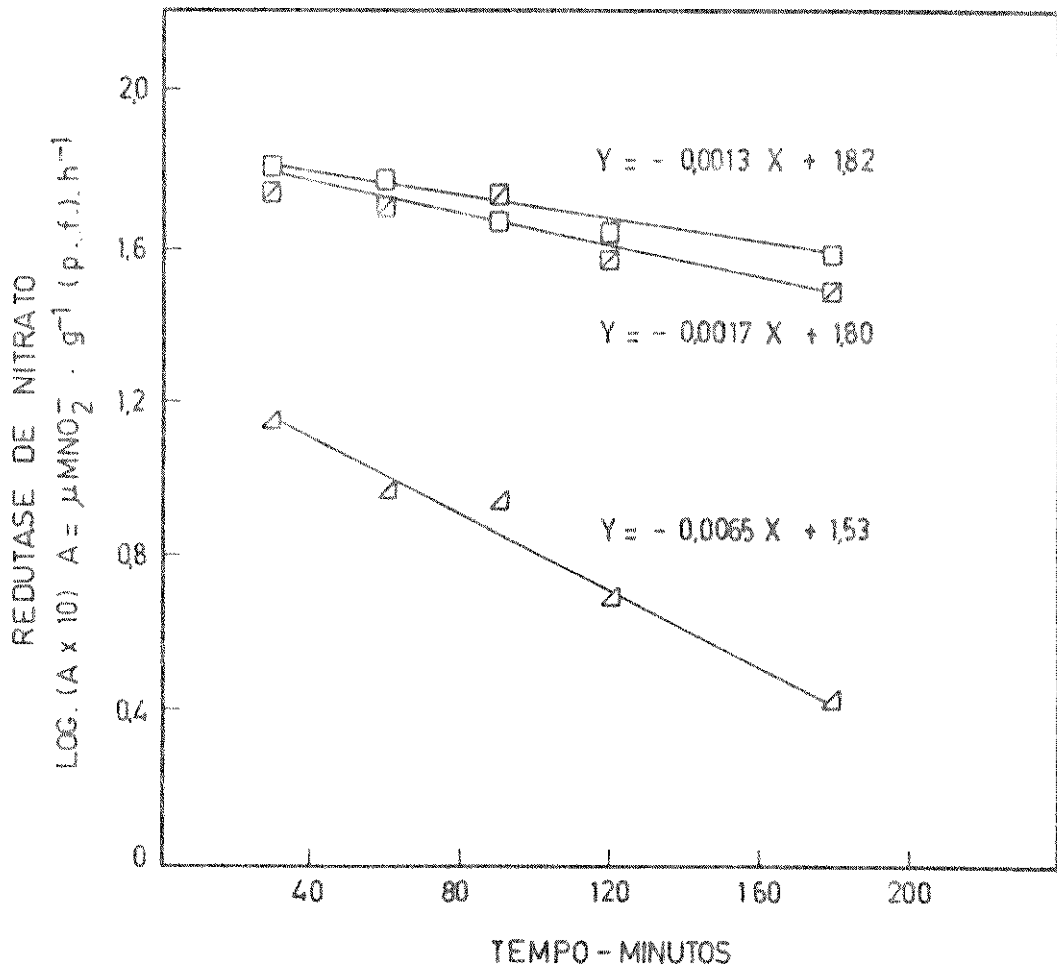
4.10. Instabilidade da redutase de nitrato no extrato obtido de mistura de folhas com idades fisiológicas distintas.

O extrato enzimático foi obtido a partir de uma mistura de tecidos de folhas de idades fisiológicas correspondentes ao 4º e 9º dias após a emergência foliar.

O decaimento da atividade, in vitro, da redutase de nitrato determinado no extrato da mistura de tecidos, bem como os determinados individualmente, estão apresentados na Fig. 13. Os valores de $T-1/2$ da redutase de nitrato, em folhas com 4 e 9 dias de idade foram respectivamente iguais a 3,8hs e 0,8h. O tem

FIG. 13. Decaimento da atividade in vitro da redutase de nitrato obtida separadamente de folhas com 4 dias ($\square-\square$) e 9 dias ($\triangle-\triangle$) de idade, bem como da enzima obtida de uma mistura dos dois tecidos foliares ($\boxtimes-\boxtimes$).

FIG. 13



po de decaimento determinado no extrato enzimático da mistura dos tecidos foi de 2,9hs, representando cerca de 76% do valor verificado no 4º dia do desenvolvimento da folha.

4.11. Estudo termo-cinético da redutase de nitrato.

As temperaturas que induziram alterações na estrutura da enzima extraída na presença e na ausência de caseína, a partir de folhas com 4, 6 e 9 dias de idade, estão apresentadas nas Figs. 14, 15 e 16.

As funções entre os logarítmos decimais das atividades enzimáticas, determinadas in vitro, e o inverso das temperaturas absolutas, apresentaram pontos de inflexão semelhantes, independentemente da idade do tecido foliar e da presença de caseína no meio de extração da enzima.

Aparentemente, as temperaturas que induziram alterações na estrutura da redutase de nitrato não diferiram entre si com relação à idade do tecido foliar, bem como em relação ao efeito da caseína. A primeira variou entre 23,0°C a 25,4°C e a segunda de 35,7°C a 38,2°C (Figs. 14, 15 e 16).

As energias de ativação da instabilidade da redutase de nitrato, nos diferentes intervalos de temperatura e nas 3 idades da folha, figuram na Tabela-5. As energias de ativação da enzima, avaliadas sem a presença de caseína no meio de extração, aumentaram linearmente com a idade do tecido foliar.

Por outro lado, aqueles parâmetros diminuíram a partir do 4º dia da emergência da folha, e tenderam a estabilizar nos tratamentos com a caseína.

FIG. 14. Temperaturas que induzem alterações na estrutura da redutase de nitrato, extraída na presença (●—●) e na ausência (○—○) de 3% de caseína no meio de extração da enzima em folhas de 4 dias de idade. As temperaturas foram avaliadas através da relação de Arrhenius.

FIG. 14

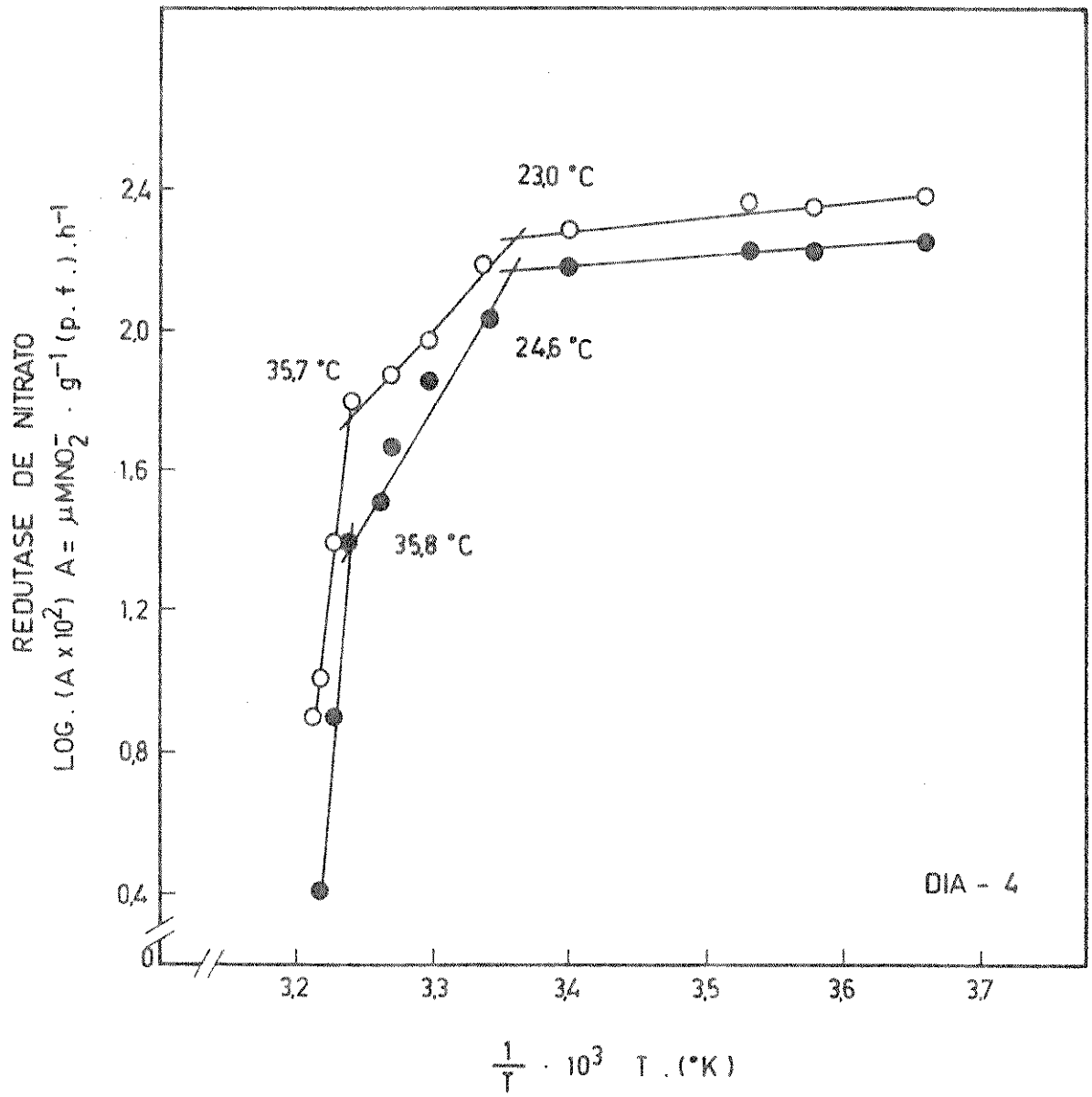


FIG. 15. Temperaturas que induzem alterações na estrutura da redutase de nitrato extraída na presença (●—●) e na ausência (○—○) de 3% de caseína no meio de extração da enzima, em folhas de 6 dias de idade. As temperaturas foram avaliadas através da relação de Arrhenius.

FIG. 15

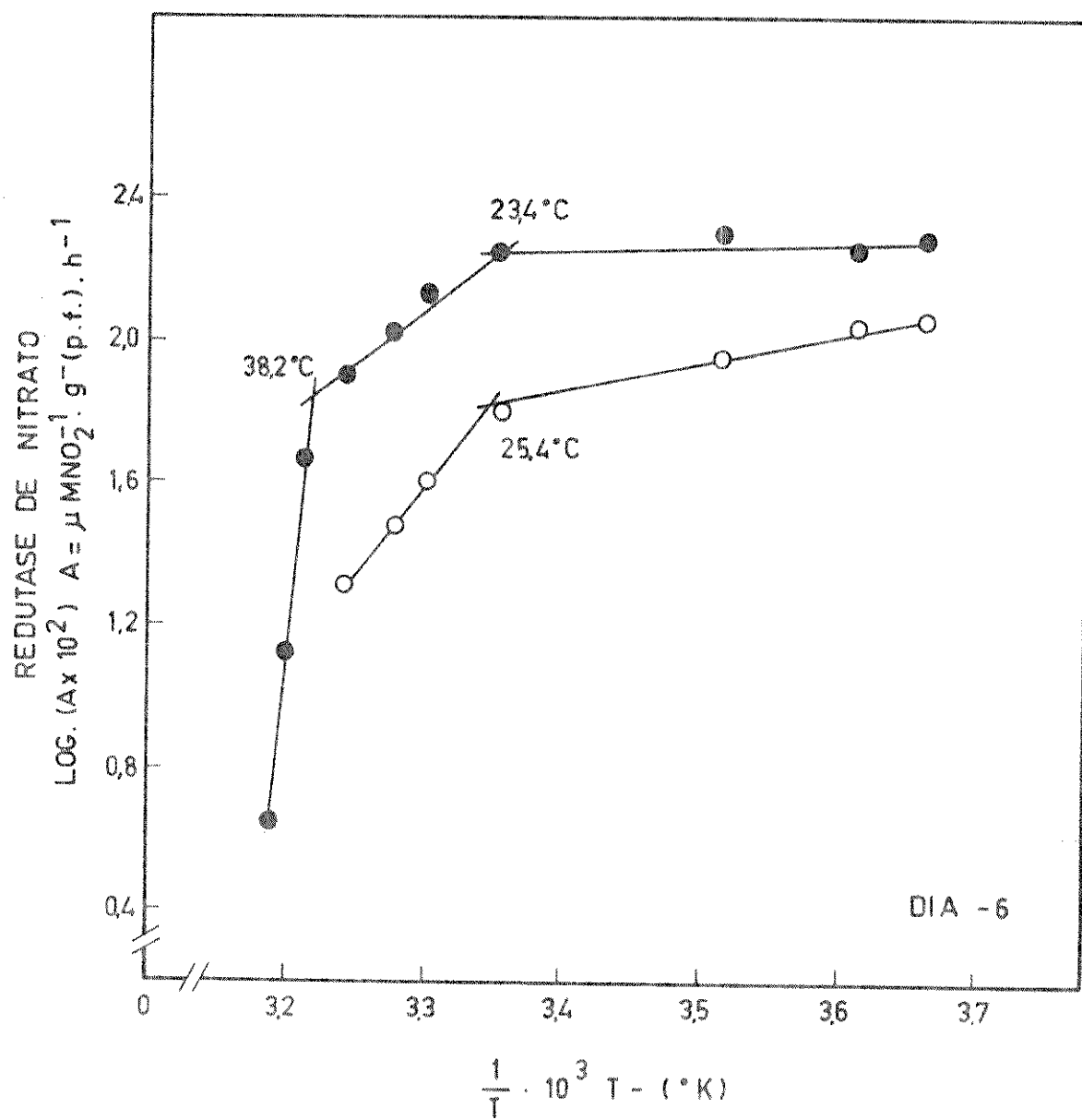
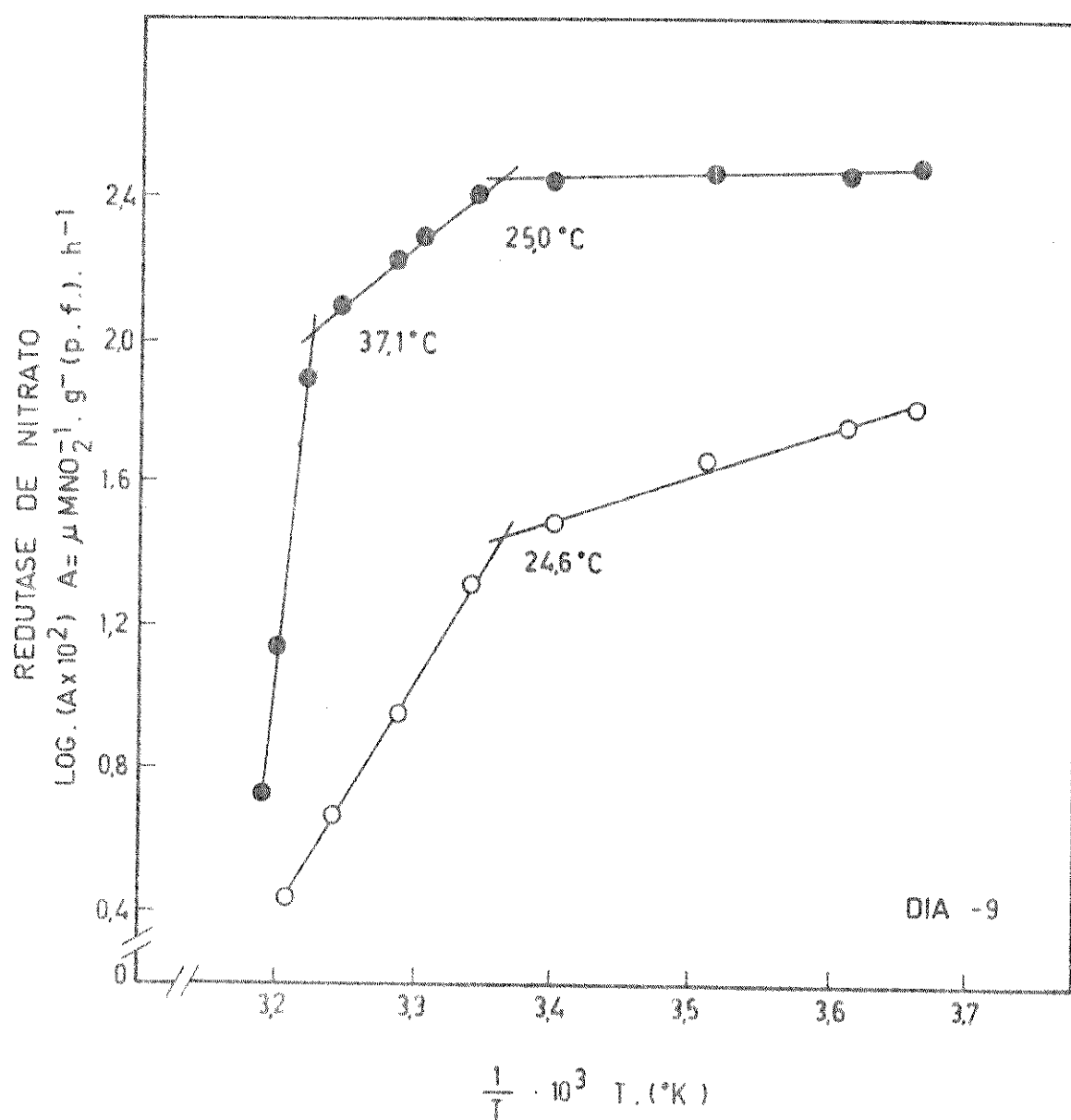


FIG. 16. Temperaturas que induzem alterações na estrutura da redutase de nitrato extraída na presença (●—●) e na ausência (○—○) de 3% de caseína no meio de extração da enzima, em folhas de 9 dias de idade. As temperaturas foram avaliadas através da relação de Arrhenius.

FIG. 16



IDADE (dias)	TRATAMENTO	INTERVALO DE TEMPERATURA (°C)	ENERGIA DE ATI- VAÇÃO (Kcal/mol)
4	s/ caseína	(0,0 - 23,0)	2,06
		(23,0- 35,7)	19,65
		(+ 35,7)	141,36
	c/ caseína	(0,0 - 24,6)	1,03
		(24,6- 35,8)	28,36
		(+ 35,8)	223,44
6	s/ caseína	(0,0 - 23,4)	3,42
		(+ 23,4)	20,71
	c/ caseína	(0,0 - 25,4)	0,50
		(25,4- 38,2)	13,48
		(+ 38,2)	230,28
9	s/ caseína	(0,0 - 24,6)	5,52
		(+ 24,6)	31,35
	c/ caseína	(0,0 - 25,0)	0,50
		(25,0- 37,1)	14,46
		(+ 37,1)	172,30

Tabela - 5. Energias de ativação (Kcal/mol) da instabilidade da redutase de nitrato (com e sem caseína no meio de extração), nos diferentes intervalos de temperatura que induzem alterações estruturais na enzima, em diferentes idades da folha.

4.12. Atividade de protease durante a ontogênese da folha.

As Figs. 17 e 18 apresentam as variações na atividade da protease em função da temperatura e do pH do meio de rea-

FIG. 17. Variações na atividade de protease da primeira folha trifoliolada, em função da temperatura da reação, quando se utilizou hemoglobina como substrato.

FIG. 18. Variações na atividade de protease da primeira folha trifoliolada, em função do pH da reação, quando se utilizou hemoglobina como substrato.

FIG. 17

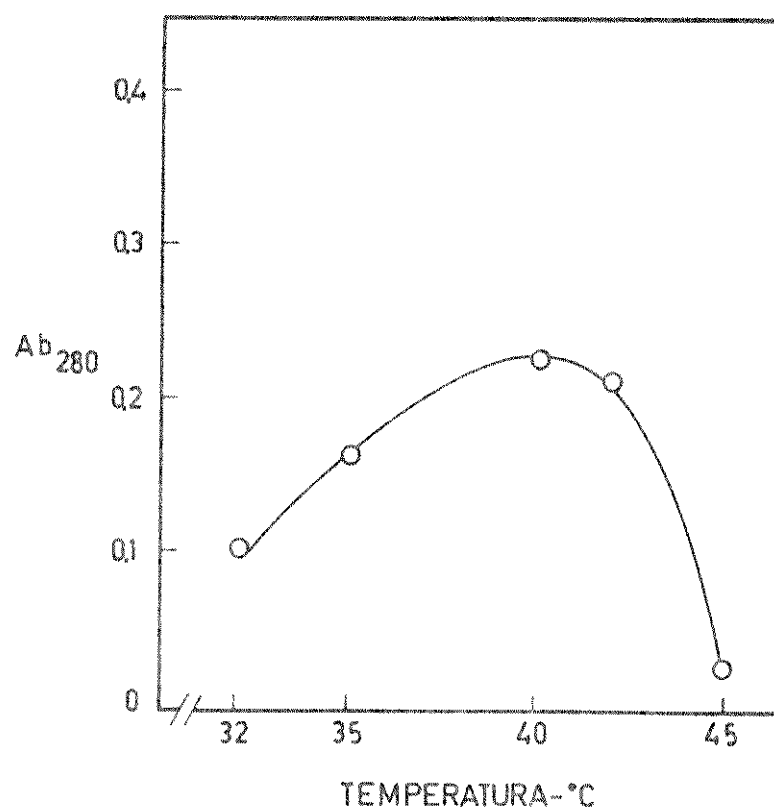
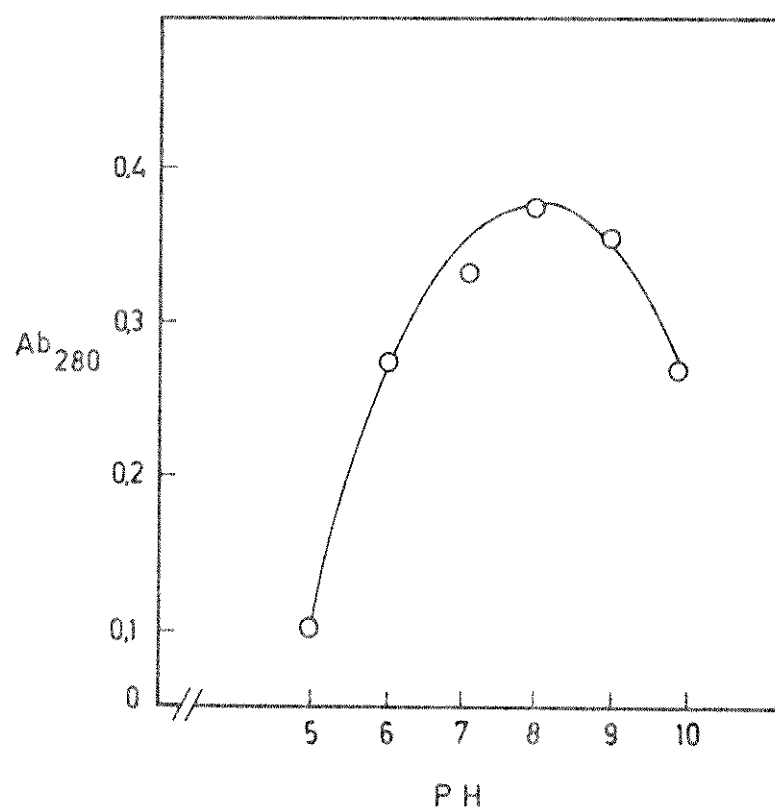


FIG. 18



ção. Nota-se que a temperatura ótima da atividade proteolítica foi de aproximadamente 40,0°C, enquanto o pH ótimo foi cerca de 8,0.

A atividade da protease, determinada na primeira folha trifoliolada durante o desenvolvimento, está apresentada na Fig. 19. No segundo dia da ontogênese, a atividade enzimática foi igual a 7,5 ug de Tri.g⁻¹.h⁻¹. A atividade decresceu com a idade do tecido, apresentando um valor mínimo ao redor do 9º dia, equivalente a 0,3 ug de Tri.g⁻¹.h⁻¹. No 13º dia após a emergência foliar, a atividade enzimática foi igual a 2,3 ug de Tri.g⁻¹.h⁻¹.

4.13. Absorção de nitrato pela folha.

A absorção de íons nitrato por folhas com 4, 7 e 13 dias de idade está apresentada na Fig. 20. Comparando-se os coeficientes angulares das equações de regressão das funções entre o processo de absorção e as concentrações de nitrato na solução externa, verificou-se que o processo foi exponencial e inversamente proporcional à idade da folha.

A capacidade de absorver nitrato, de folhas com quatro dias de idade foi cerca de duas vezes a capacidade verificada no tecido foliar com seis dias, e cerca de sete vezes aquela apresentada pela folha com idade correspondente ao 13º dia após a emergência.

4.14. Efeito da absorção de nitrato na atividade in vivo da redutase de nitrato.

O efeito da absorção de íons nitrato pelas folhas

FIG. 19. Variações da atividade de protease na primeira fo
lha trifoliolada ($\mu\text{g Tri.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) durante a onto-
gênese.

FIG. 19

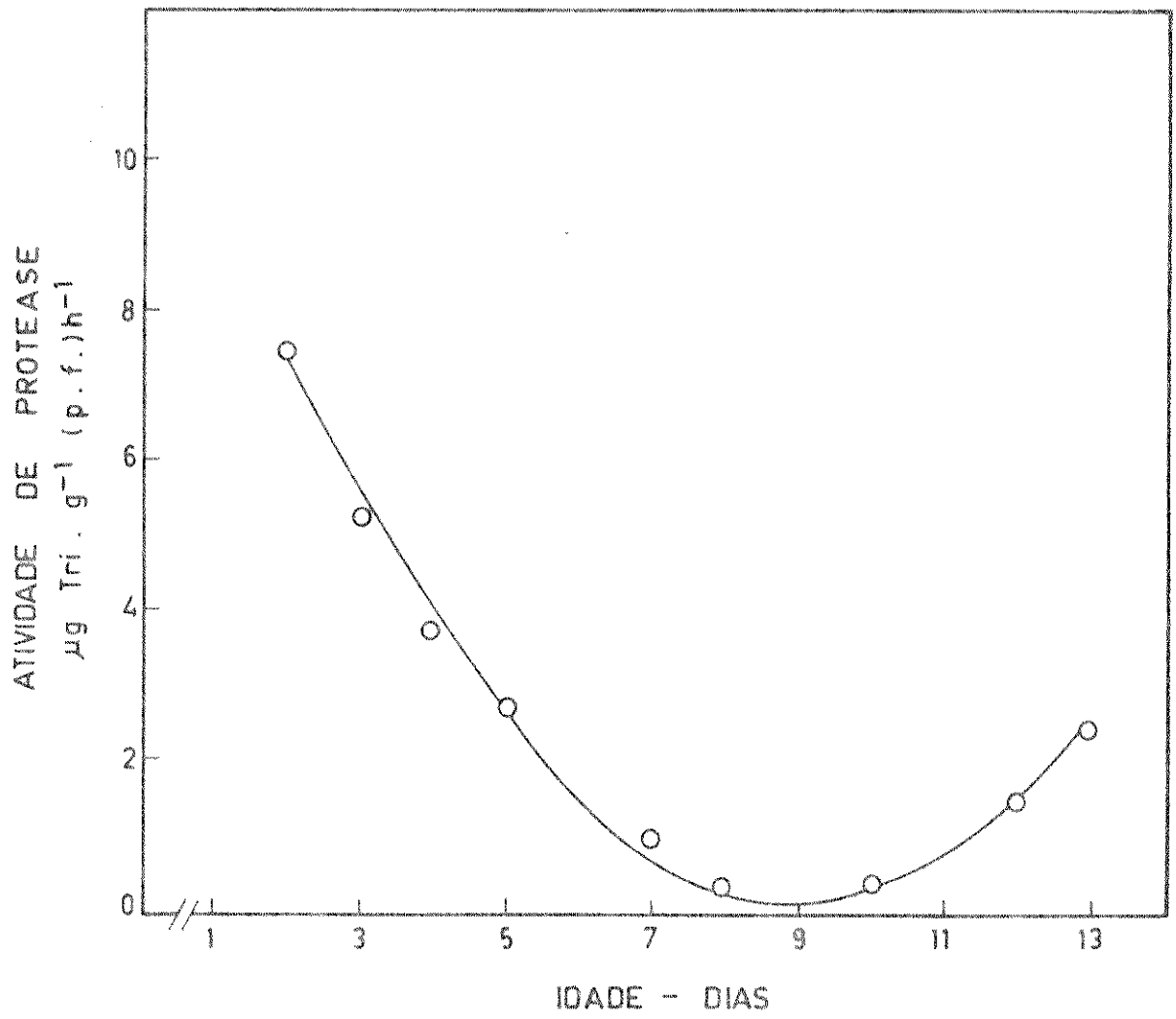
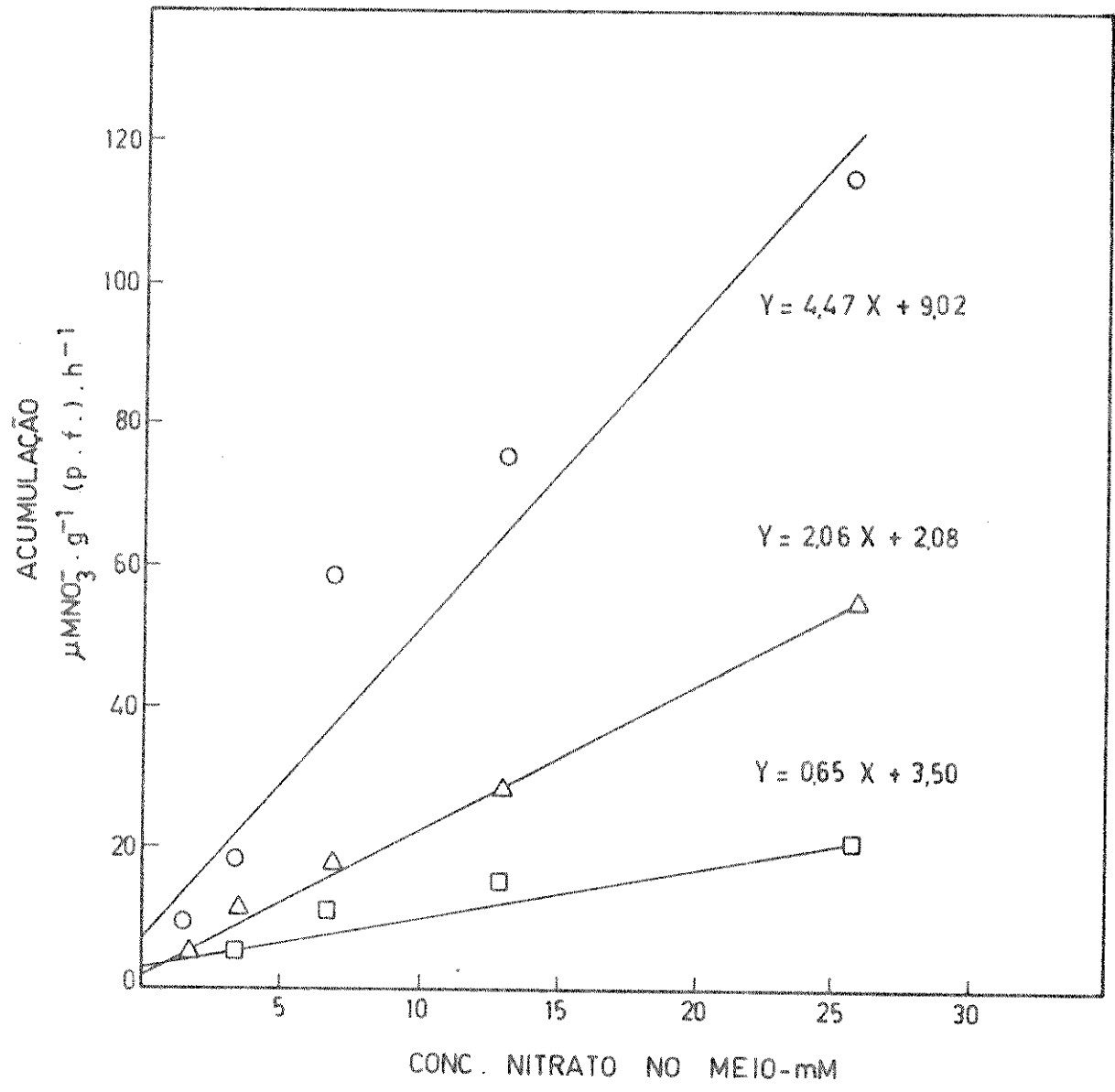


FIG. 20. Absorção de íons nitrato por folhas intactas de três idades distintas: 4 dias (O—O), 7 dias (Δ — Δ) e 13 dias ($\square$ — $\square$).

FIG. 20

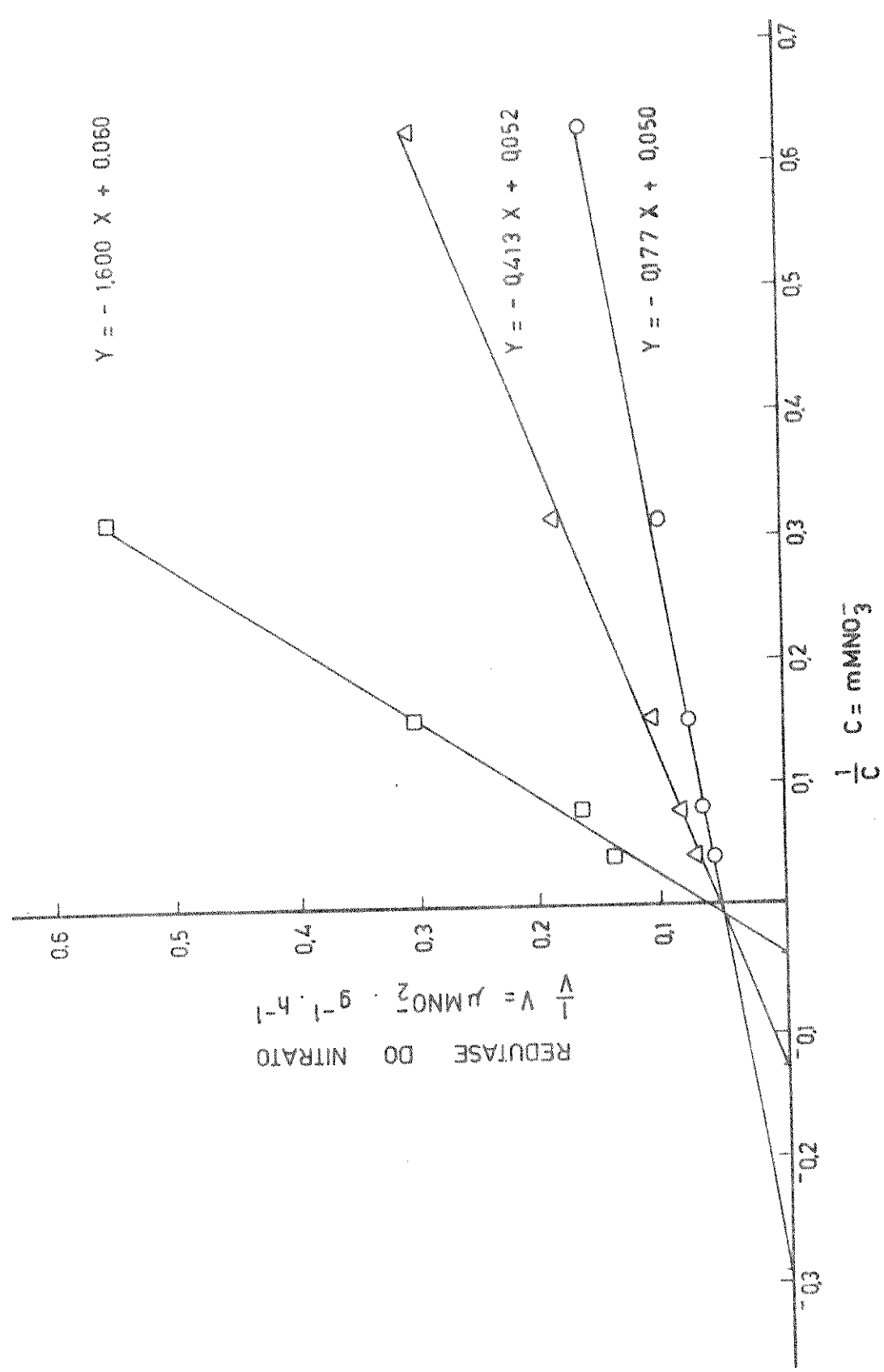


trifoliolada com 4, 7 e 13 dias de idade, sobre a redução do nitrato, está apresentado na Fig. 21.

Os valores de K_m do processo de indução da atividade da redutase de nitrato avaliados no 4º, 7º e 13º dias após a emergência foliar, foram respectivamente iguais a 3,5, 8,0 e 27,0 mM de nitrato. As velocidades máximas obtidas foram idênticas e corresponderam a 20,0uM de $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (nas duas primeiras idades) e 16uM de $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no tecido mais velho.

FIG. 21. Efeito da absorção de nitrato por folhas intactas (primeira trifoliolada) de 4 dias (○—○), 7 dias (△—△) e 13 dias de idade (□—□) sobre a atividade in vivo da redutase de nitrato.

FIG. 21



5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade in vivo e in vitro da redutase de nitrato.

As variações na atividade da redutase de nitrato, determinada in vivo e in vitro durante o desenvolvimento da folha, mostraram um pico de máxima atividade coincidente com a total abertura dos folíolos que compõem a trifoliolada, ou seja, no 4º dia após a emergência da folha (Fig. 1). Esse fato é semelhante àqueles observados por Harper e Hageman, 1972, em folhas de idades fisiológicas distintas, em plantas de soja, e aos observados por Wallace e Pate, 1965, em plantas de ervilha, que mostraram que tecidos mais velhos têm menor capacidade de redução de nitrato do que a dos tecidos jovens.

As variações na atividade da redutase de nitrato, quando avaliadas in vivo, têm sido consideradas como reflexos das variações in situ, e portanto, tem sido interpretadas como expressando a atividade enzimática real (Harper e Hageman, 1972, Streeter e Bosler, 1972, Radin, 1975, Brunetti e Hageman, 1976). Outros autores (Janiesch, 1973, Jones e Sheard, 1977) demonstraram que a determinação da atividade da redutase de nitrato in vivo, não representa a capacidade de redução de nitrato pelo tecido.

A linearidade existente entre as atividades determinadas in vivo, com NO_3^- no meio de incubação, e as avaliadas in vitro (Fig. 2), sugere que as variações observadas na atividade da enzima, pelo menos durante a fase do desenvolvimento investigado, não estão correlacionadas com as variações nos níveis endógenos

de nucleótidos de piridina reduzido, e de nitrato, como substratos para a enzima, principalmente levando-se em conta que os dois fatores não são limitantes para o processo durante os ensaios in vitro e in vivo. A disponibilidade de nitrato como agente estabilizador da enzima será discutido mais adiante.

Pelo menos o aspecto estritamente relacionado com a disponibilidade de NADH para a redutase de nitrato fica evidenciado no ensaio in vivo da enzima, realizado com meio de infiltração contendo glicose. Foi observado que a curva representativa das variações da atividade da enzima na presença do carboidrato não diferiu daquela obtida sem a hexose no meio de infiltração (Fig. 8). Por outro lado, os ensaios representados nas Figs. 7A e 7B mostraram que a glicose pode ativar a redutase de nitrato em condições de baixa disponibilidade de NADH decorrente da permanência da planta na ausência de luz, durante 40 horas. A penetração do carboidrato nas células foi independente da idade do tecido foliar. O aumento da disponibilidade de cofator reduzido, nos tecidos que haviam sido mantidos no escuro, se deu, provavelmente através da oxidação do gliceraldeído formado, pela reação catalizada pela enzima triose fosfato desidrogenase (Klepper, et al., 1971).

Esses aspectos corroboram a idéia proposta anteriormente de que as variações na atividade da redutase de nitrato in vivo, não estariam associadas com as variações na disponibilidade daquele cofator, durante o período do desenvolvimento investigado.

Se, por um lado, a glicose pode ativar a triose fosfato desidrogenase, o mesmo parece não ter ocorrido com tecido

foliar submetido à infiltração com malato (Figs. 7A e 7B). Não seria razoável admitir a não penetração desse composto para o citoplasma das células da folha, em se considerando que a infiltração foi realizada a vácuo, e o meio de infiltração continha propanol, que proporciona um aumento da permeabilidade celular, bem como uma diminuição da tensão superficial do meio de incubação (Jones e Sheard, 1976). Uma hipótese a ser admitida, seria a falta de acoplamento entre a redutase de nitrato e a NADH-malato desidrogenase. Klepper, et al., 1971 mostraram que malato era o responsável pela ativação de apenas 10% da atividade da redutase de nitrato, in vivo, em comparação com hexoses, em plantas de metabolismo " C_3 ". Neyra e Hageman, 1976 e 1978 sugeriram que a redutase de nitrato e a NADH-malato desidrogenase se acoplam em plantas de metabolismo " C_4 ".

Se, os resultados obtidos sugerem, também, que as variações na atividade da redutase de nitrato durante o período do desenvolvimento foliar investigado não estão associadas com as variações na disponibilidade de nitrato, os dados da Fig. 3 mostram que a atividade enzimática in vivo, avaliada com nitrato no meio de infiltração, foi mais elevada do que a determinada na ausência de nitrato exógeno.

Esse fato poderia estar relacionado com a estabilização parcial da redutase de nitrato induzida pelo substrato. O efeito do nitrato como agente estabilizador da redutase de nitrato tem sido sugerido por diversos autores (Subramanian e Sorger, 1972, Sorger, et al., 1974, Aslam e Oaks, 1975 e 1976). Recentemente, Aslam, et al., 1978 verificaram que L-canavanina, um análogo da arginina, tinha propriedade de aumentar a instabilidade da re

redutase de nitrato, processo este, reversível na presença de nitrato. Hewitt, 1977 sugeriu que aquele íon estaria relacionado com a incorporação de FAD em uma das sub-unidades da molécula da enzima.

Os resultados do experimento representados na Fig. 3 sugerem que as concentrações endógenas de nitrato no tecido foliar não estão relacionadas com as variações na atividade da enzima, pelo menos durante o período do desenvolvimento da folha considerado. Esse fato poderia ter como causa provável uma compartimentalização daquele íon no interior do vacúolo, tornando-o não disponível para a redutase de nitrato. Heimer e Filner, 1971, postularam que o nitrato metabolizável (no citoplasma) é o responsável pelo processo de ativação enzimática. Dessa maneira, a infiltração do tecido foliar com meio contendo nitrato poderia ter aumentado a concentração daquele íon no sítio de redução, proporcionando um efeito positivo na atividade da enzima avaliada in vivo.

Resultados semelhantes foram obtidos com relação às variações na atividade total (por folha) da redutase de nitrato (Fig. 4). O ensaio sugere que o padrão descendente das variações da atividade da redutase de nitrato, em termos de peso fresco de tecido, avaliada in vivo (e ou in vitro), verificado após o pico de máxima redução, não se associa a um efeito de diluição da atividade enzimática devido ao aumento de volume das células da folha, durante seu crescimento.

Por outro lado, o acúmulo de nitrato no tecido foliar em função da diminuição da atividade da redutase de nitrato após o pico de máxima redução, ficou evidenciado no ensaio onde

os teores totais, e não em termos de peso fresco de tecido, foram determinados. Um efeito de diluição da concentração de nitrato, em face de um aumento do volume celular, poderia se associar com essa observação.

5.2. Absorção de nitrato pelas folhas e o efeito na atividade in vivo da redutase de nitrato.

O ensaio de absorção de íons nitrato, através do pétiolo de folhas destacadas de três idades diferentes (Fig. 20), mostrou que o processo se deu passivamente, uma vez que a função existente entre o acúmulo de nitrato no tecido e a concentração do íon no meio externo foi linear.

O menor acúmulo de nitrato nas folhas com 7 e 13 dias de idade, em comparação com o verificado na folha trifoliolada de 4 dias, poderia residir numa menor taxa de transpiração nos tecidos mais velhos. A transformação de Lineweaver-Burk mostrou que as concentrações de nitrato que proporcionaram metade das velocidades máximas, cresceram exponencialmente com a idade do tecido foliar. Este fato poderia estar associado com maior resistência ao transporte de nitrato, resultando em concentrações proporcionalmente menores nos tecidos mais velhos.

A semelhança existente entre os valores das velocidades máximas da redução do nitrato pelas folhas poderia ter como causa a síntese da enzima ou a melhor estruturação da proteína induzida pelo substrato transportado para o citoplasma das células (Shaner e Boyer, 1976-a e 1976-b), durante as 4 horas de absorção. Nicholas, et al., 1976-a e 1976-b mostraram, em folhas

de plantas de soja, que a indução máxima da atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, foi observada após cerca de 4 horas do início do processo de absorção.

A semelhança entre os valores das velocidades máximas comparada com os valores de atividade enzimática avaliada na presença de caseína (Fig. 11), sugere que o nível de redutase de nitrato deve permanecer constante durante o período da ontogênese investigado.

5.3. Aspectos relacionados com a instabilidade da redutase de nitrato.

Os valores apresentados na Fig. 9 mostram que a instabilidade da redutase de nitrato, in vitro, foi proporcional à idade do tecido foliar a partir do ponto de máxima atividade enzimática. O aumento da instabilidade dessa enzima tem sido verificado por outros autores (Oaks,et al.,1972, Schrader,et al., 1974). Esse aspecto poderia estar associado com fatores responsáveis por alterações da atividade enzimática (in situ e ou in vitro).

Durante a fase do desenvolvimento em estudo, foi verificado que a adição de caseína no meio de extração da enzima, causa estabilização da atividade da redutase de nitrato em tecidos mais velhos (Fig. 10). Essa propriedade poderia estar associada com o efeito protetor da caseína sobre a ação de substâncias inibidoras, ou com atividade proteolítica. Além disso, não pode ser descartada uma ação protetora da caseína contra a dissociação da enzima em suas sub-unidades. Esse fenômeno seria irrever-

sível, pois a adição de da proteína após a extração da enzima não tem efeito estabilizador da atividade enzimática. Resultados semelhantes foram obtidos por Schrader,et al.,1974 e Purvis e Tischler,1976, utilizando albumina de soro bovino no meio de extração da enzima.

Por outro lado, Carmelo e Violante,1972 mostraram em Cyanidium caldarium, uma alga unicelular, que a redutase de nitrato poderia se apresentar em duas formas distintas, uma ativa e outra inativa. Essa última poderia ser ativada em condições de baixa temperatura (0°C). Semelhantemente, a presença de caseína no meio de extração da enzima poderia ativar uma forma inativa da redutase de nitrato. Esse fato poderia se associar com os maiores níveis de atividade observados quando a redutase de nitrato foi extraída na presença de caseína. Em continuidade, as variações da atividade específica da enzima poderiam residir num desbalanço entre as formas inativa e ativa da redutase de nitrato.

Os resultados sumariados na Fig. 13, onde as taxas de decaimento da atividade in vitro, em folhas de duas idades diferentes foram comparadas com aquelas provenientes da mistura dos dois tecidos, sugere que o extrato obtido de tecidos mais novos poderia exercer efeito protetor sobre a enzima de tecidos mais velhos, em relação aos fatores inativantes mencionados anteriormente.

Por outro lado, Dalling,et al.,1972 mostraram que o uso de proteína durante a homogeneização do tecido poderia induzir maior eficiência na extração da redutase de nitrato, especialmente em tecidos mais velhos, por prevenir ligações das moléculas

da proteína com sedimentos membranosos de organelas que se rompem durante aquele tratamento.

Se, por um lado, a caseína poderia proporcionar uma maior extração da enzima, as variações na atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento da folha não devem estar relacionados com a maior ou menor recuperação da enzima durante o preparo do extrato, uma vez que ficou evidenciado a existência de uma função linear entre as atividades determinadas in vivo e in vitro.

Por outro lado, as variações da atividade proteolítica do extrato enzimático não se associam com as variações da atividade da redutase de nitrato, uma vez que a atividade da protease apresentou um padrão decrescente, pelo menos até o 9º dia do desenvolvimento da folha, em concordância com os padrões apresentados, tanto das variações do conteúdo protéico, quanto das variações da atividade da redutase de nitrato (Fig. 19).

Anderson e Rowan, 1965 verificaram, em folhas de fumo, que a atividade proteolítica não era proporcional à idade do tecido. Mais recentemente, Kannangara e Woolhouse, 1968, De Jong, 1972 e Chang, 1973, trabalhando respectivamente com Perilla, Nicotiana e Phaseolus, mostraram uma diminuição na atividade de enzimas proteolíticas associada com a idade dos tecidos foliares.

A influência de enzimas proteolíticas na atividade da redutase de nitrato foi sugerida por diversos autores (Wallace, 1974 e 1975, Kadan, et al., 1974, Pan e Marsh, 1972). Contrariamente, Tischler, et al., 1978 não conseguiram associar a instabilidade da redutase de nitrato com proteases específicas contendo grupos sulfidrilos.

Os resultados representados nas Fig. 14, 15 e 16,

sobre o efeito de temperatura na atividade in vitro da redutase de nitrato, sugerem que a instabilidade da enzima, em função da idade da folha, não se associa com as alterações na estruturação da proteína, uma vez que as temperaturas que induziram modificações na molécula não se relacionaram com as idades dos tecidos. Este fato dificultou, sobremaneira, uma verificação quanto a uma possível participação da caseína como agente indutor da estruturação da enzima, uma vez que as temperaturas permaneceram inalteradas sob o efeito da proteína.

Carmelo e Violante, 1972 mostraram que, em Cyanidium caldarium, a redutase de nitrato apresentou alterações estruturais ao redor de 24°C, enquanto Magalhães, 1973, em folhas de soja, mostrou que aquela enzima apresentava modificações ao redor de 36°C.

No presente trabalho foram detectadas, simultaneamente, dois valores de temperatura que não diferiram praticamente dos obtidos por aqueles autores. Nos tecidos foliares com 6 e 9 dias de idade, apenas o menor valor foi observado, no tratamento sem a caseína, devido a atividades extremamente baixas encontradas a temperaturas acima de 36°C.

Recentemente, Sherrard e Dalling, 1979, trabalhando com enzima altamente purificada de folhas de trigo, mostraram a existência de um ponto de inflexão na relação de Arrhenius ao redor de 30°C.

Os dados das energias de ativação do processo de inativação da redutase de nitrato não permitiram uma interpretação razoável que pudesse relacionar o aumento verificado desse parâmetro com a idade da folha. Uma vez que a instabilidade dessa en

zima foi proporcional à idade da folha, seria de se esperar que os valores das energias de ativação daquele processo diminuíssem com a idade do tecido.

6. CONCLUSÕES

A atividade da redutase de nitrato determinada in vivo ou in vitro é maior em tecidos mais novos e diminui com o desenvolvimento da folha.

O decréscimo da atividade enzimática após o estágio de máxima redução é relativamente rápido e se inicia ainda durante a fase do crescimento exponencial da folha.

Dentro do período ontogenético investigado, a atividade dessa enzima in vitro pode ser avaliada indiretamente através dos valores obtidos na determinação in vivo contendo nitrato no meio de incubação do tecido. Dessa forma, pelo menos durante o período do desenvolvimento investigado, a avaliação da atividade de in vivo não deve ser considerada como estritamente representativa da redução de nitrato in situ.

As variações na atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento da folha trifoliolada deve se associar a fatores de natureza distinta, tais como estabilidade da enzima pelo substrato presente no sítio de redução, presença de algum agente protetor da molécula da proteína, presente nos tecidos menos desenvolvidos, bem como a quantidade de enzima ativa presente na folha.

Por outro lado, a concentração de nitrato presente no tecido foliar não pode ser considerado como um parâmetro relacionado com a quantidade de substrato disponível para o processo de redução e, portanto, não é proporcional à atividade da redutase de nitrato in situ.

A presença de caseína no meio de extração da redutase de nitrato proporciona alta atividade enzimática durante praticamente todo o período ontogenético investigado.

Se, o efeito dessa proteína reside na ativação de uma forma inativa da redutase de nitrato, a atividade enzimática determinada in vitro na presença de caseína seria artificiosa, no sentido de que ela não seria representativa da taxa de redução in situ, uma vez que as determinações in vivo (com nitrato no meio de incubação do tecido) se relacionam de maneira direta.

Nesse caso, seria conveniente admitir como representativas da redução de nitrato, in situ, as avaliações desse processo realizadas in vivo, na ausência de nitrato exógeno, ou in vitro, na ausência de caseína.

Embora tenha ficado evidente, que tecidos mais velhos não devem conter algum agente protetor da redutase de nitrato, uma hipótese sobre a presença de substâncias inibidoras nesses tecidos, não deve ser inteiramente descartada.

7. RESUMO

A atividade da enzima redutase de nitrato, determinada in vivo e in vitro foi investigada na primeira folha trifoliolada de plantas de soja (Glycine max L. Merr.), durante um período ontogenético compreendido entre o 2º e 13º dia após a emergência da lâmina foliar.

A máxima taxa de redução de nitrato foi observada a os 4 dias após a emergência da folha, através da avaliação in vivo (com e sem nitrato no meio de incubação do tecido foliar), e in vitro da atividade enzimática. Os picos de máxima atividade corresponderam a cerca de $25,0 \text{ } \mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (in vivo, c/ NO_3^-), $15,0 \text{ } \mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (in vivo s/ NO_3^-) e $11,0 \text{ } \mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (in vitro).

A linearidade observada entre as atividades da redutase de nitrato determinadas in vitro e in vivo contendo 100mM de nitrato no meio de incubação do tecido foliar sugere que, pelo menos durante o período do desenvolvimento investigado, as variações da atividade in vivo não são estritamente representativas das variações da redução de nitrato, in situ.

Durante o período do desenvolvimento da folha compreendido entre o 4º e 13º dia após a emergência da folha, a concentração de nitrato no tecido foliar permaneceu constante e cerca de $60,0 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$, e não se relacionou com as variações da atividade da redutase de nitrato observadas nesse mesmo período.

O padrão decrescente apresentado pelas variações da atividade da enzima após o estágio de máxima taxa de redução de

nitrato foi observado também quando se avaliou a atividade total da enzima, bem como quando determinada em termos de proteína.

A linearidade entre as avaliações in vivo e in vitro sugere também que as variações da atividade enzimática não devem estar associadas com as variações da disponibilidade de nitrato como substrato, bem como de cofator reduzido. Em concordância, foi verificado que as curvas representativas das variações da atividade enzimática, in vivo, quando determinada na presença e na ausência de glicose, foram idênticas.

Se, a redutase de nitrato pode se acoplar com a trio se fosfato desidrogenase, o mesmo parece não ter ocorrido em relação à NADH-malato desidrogenase.

A instabilidade da redutase de nitrato foi avaliada em folhas com 3, 4, 6, 10 e 13 dias de idade, através da taxa de decaimento determinada in vitro. Esses valores corresponderam respectivamente a 3,8h, 4,6h, 0,9h, 0,7h e 0,7h. Redutase de nitrato extraída de folhas com 4 dias de idade (estágio de máxima atividade enzimática) apresentou a menor instabilidade, quando comparada com os valores do decaimento da atividade enzimática determinada em folhas mais velhas.

Foi verificado que a presença de 3% de caseína no meio de extração da redutase de nitrato tem o efeito de diminuir a instabilidade da enzima, e manter alta atividade enzimática durante o período do desenvolvimento do tecido compreendido entre o 4º e o 13º dia após a emergência da folha.

O efeito da caseína, seja sobre a instabilidade da redutase de nitrato, quanto sobre o nível de atividade enzimática não foi verificado no caso da proteína ser adicionada somente

no meio de reação. Nesse caso, enzimas provenientes de folhas com 5 e 11 dias de idade apresentaram taxas de decaimento respectivamente iguais a 1,5h e 0,6h na ausência de caseína e 1,3h e 0,6h na presença da proteína.

A taxa de decaimento da redutase de nitrato extraída de uma mistura de tecidos foliares com 4 e 9 dias de idade (2,9h) foi semelhante aquela verificada em folhas de 4 dias (3,8h) sugerindo a existência nos tecidos jovens de um sistema protetor da enzima, contra agentes inibidores.

Um estudo termo-cinético da redutase de nitrato realizado através da relação de Arrhenius, mostrou alterações estruturais na molécula da proteína, praticamente idênticas, em função das idades dos tecidos foliares (4, 6 e 9 dias). Essas alterações corresponderam a temperaturas que variaram entre 23°C a 25,4°C e 35,7°C a 38,2°C. Concomitantemente foi verificado que a presença de caseína no meio de extração da enzima não teve efeito sobre esses parâmetros.

Foi também investigada a atividade proteolítica do extrato enzimático durante o desenvolvimento foliar, utilizando-se hemoglobina como substrato. A maior atividade de protease foi observada nos tecidos com 2 dias de idade, e correspondeu a 7,5 ug Tri.g⁻¹.h⁻¹. A atividade proteolítica diminuiu com a idade do tecido até o 9º dia após a emergência da folha (0,3 ug Tri.g⁻¹.h⁻¹).

A absorção de nitrato através dos pecíolos de folhas destacadas mostrou que esse processo, em folhas com 4 dias de idade foi cerca de duas vezes e sete vezes aqueles apresentados por folhas com 7 e 13 dias de idade, respectivamente.

O efeito da absorção de nitrato sobre a atividade

in vivo da redutase de nitrato, verificado através da transformação de Lineweaver-Burk, mostrou que folhas com 4, 7 e 13 dias de idade apresentaram Km iguais a 3,5, 8,0 e 27,0 mM de nitrato contido no meio de absorção do tecido. As velocidades máximas do processo foram praticamente idênticas nas três idades ($20,0 \mu\text{M de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em folhas com 4 e 7 dias e $16,0 \mu\text{M de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em folhas com 13 dias de idade).

8. SUMMARY

The in vivo and in vitro nitrate reductase activities were determined during the ontogeny of the first trifoliolate leaf of soybean.

The highest nitrate reductase activity (in vivo and in vitro) was observed on the 4th day after leaf emergence. The maximum in vivo enzyme activities as determined with and without nitrate in the leaf incubation medium were $25,0 \mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $15,0 \mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectively, whereas the in vitro nitrate reductase activity was equivalent to $11,0 \mu\text{MNO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

The linear correlation observed when in vitro activity was plotted against the in vivo nitrate reductase activity determined with 100 mM of nitrate in the incubation medium suggests that the changes in the in vivo enzyme activity are not strictly dependent on the rate of in situ nitrate reduction. It is also apparent that the changes in nitrate reductase activity (in vivo or in vitro) are not dependent on substrate and co-factor availabilities. In addition, it was observed that the changes in the in vivo enzyme activity determined with 100mM of glucose in the incubation medium were similar to those evaluated without the hexose.

On other hand, it was demonstrated from an experiment carried out to investigate the effect of glucose and malate on the induction of the enzyme activity, in vivo, that nitrate reductase could be induced by the hexose, but not by malate. This fact could be interpreted as a lack of coupling between the

nitrate reductase and NADH-malate dehydrogenase enzymes.

It was also shown that, from the 4th day after leaf emergence, the nitrate content of leaf blade ($60,0 \mu\text{M.g}^{-1}$) remained constant up to the 13th day. This fact could not account for the changes in nitrate reductase activity during the leaf development.

The nitrate reductase specific activity ($\mu\text{M NO}_2^-. \text{mg Protein}^{-1} . \text{h}^{-1}$), as well as the total activity ($\mu\text{MNO}_2^-. \text{leaf}^{-1} . \text{h}^{-1}$) showed similar pattern as those observed in vivo or in vitro.

The instability of the enzyme as evaluated by the in vitro decay rate of enzyme activity were determined on the 3, 4, 6, 10 and 13th day after leaf emergence, and were equivalent to 3,8h; 4,6h; 0,9h; 0,7h and 0,7h respectively.

The enzyme extracted on the 4th day after leaf emergence showed to be 8 fold more stable than that extracted from older tissues. In addition, it was demonstrated that the use of 3% casein in the nitrate reductase extraction medium led to a low degree of enzyme instability, as well as a maintenance of a high level of enzyme activity, from the 4th up to the 13th day after leaf emergence.

It was also observed that the inclusion of 3% casein in the assay medium of the enzyme extracted from leaves with 5 and 11 days failed to promote a high level of enzyme activity as well as maintain the stability of the enzyme. The decay rates of nitrate reductase as determined without casein in the assay medium, on the 5th and 11th day after leaf emergence were 1,5h and 0,6h respectively, whereas those determined in the presence of the protein were 1,3h and 0,6h.

The decay rate of nitrate reductase activity extracted from mixture of tissues with different ages (4 and 9 days) were similar (2,9h) to that obtained from the younger tissue (3,8h). This fact suggests that leaf extracts from young tissues could protect the enzyme extracted from old ones, against inactivating agent (s) present in the older leaves.

The nitrate reductase temperature kinetic studies from leaves with 4, 6 and 9 days showed that the temperatures inducing structural changes in the enzyme molecule ranged from 23°C to 25,4°C and from 35,7°C to 38,2°C. The addition of 3% casein in the enzyme extraction medium did not alter these values.

The proteolytic activity of enzyme extracts during the leaf development was also investigated by using hemoglobin as substrate.

The highest protease activity was found on the 2nd day after leaf emergence ($7,5 \mu\text{g Tri.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) declining up to the 9th day ($0,3 \mu\text{g Tri.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

The nitrate uptake by 4 day old excised leaves was 2 and 7 fold higher than that observed for 7 and 13 day old leaves, respectively.

The effect of nitrate uptake on the in vivo nitrate reductase activation of leaves with 4, 7 and 13 days was also investigated. The K_m values as determined by a Lineweaver - Burk plot were 3,5, 8,0 and 27,0 mM of nitrate (concentration in the incubation medium) respectively. The values for the nitrate reduction process determined in 4, 7 and 13 day old leaves were equivalent ($20,0 \mu\text{M NO}_2^-. \text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ on 4th and 7th day and $16,0 \mu\text{M NO}_2^-. \text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ on 13th day).

9. APÊNDICE

Solução nutritiva:

COMPOSTO QUÍMICO	mm
1. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,0
2. KNO_3	5,0
3. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0
4. KH_2PO_4	1,0
5. Quelato de Ferro	0,1
6. H_3BO_3	0,026
7. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,050
8. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,016
9. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002
10. $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,001

10. ABREVIATURAS

1. NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido.
2. FAD - Flavina adenina dinucleotídeo.
3. PVP - Polivinilpirrolidona.
4. EDTA - Etileno diamino tetra acetato (sódio)

11. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alofe, C. O., L. E. Schrader, e R. R. Smith. 1973. Influence of high day and variable night temperatures on nitrate reductase activity of young corn (Zea mays L.) plants. Crop Sci. 13:625-629.
- Anderson, J. W., e K. S. Rowan. 1965. Activity of peptidase in tobacco leaf tissue in relation to senescence. Biochem. J. 97:741-746.
- Aslam, M. 1977. Presence of heat-inducible nitrate reductase inhibitor(s) in corn root tip. Plant Sci. Lett. 9:89-92.
- Aslam, M., e A. Oaks. 1975. Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. Plant Physiol. 56:634-639.
- Aslam, M., e A. Oaks. 1976. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. Plant Physiol. 57:522-576.
- Aslam, M., A. Oaks, e I. Boesel. 1978. Effect of L-canavanine on nitrate reductase in corn roots. Plant Physiol. 62:693-695.
- Bardzik, J. M., H. V. Marsh, Jr., e J. R. Havis. 1971. Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. Plant Physiol. 47:828-831.
- Beevers, L., D. Flesher, e R. H. Hageman. 1964. Studies on the pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants, and its relationship of sulphydryl level. Biochem. Biophys. Acta 89:453-464.

- Seevers, L., L. E. Schrader, D. Flesher, e R. H. Hageman. 1965. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiol.*, Lancaster 40:691-695.
- Beevers, L., e R. H. Hageman. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physio.* 20:495-522.
- Beevers, L., e R. H. Hageman. 1972. The role of light in nitrate metabolism in higher plants. *Em: Photophysiology*, vol.VII, A. P. Inc. N. Y. and London.
- Benzioni, E., e Y. M. Heimer. 1977. Temperature effect on nitrate reductase activity in vivo. *Plant Sci. Lett.* 9:225-231.
- Blevins, D. G., R. H. Lowe, e L. Staples. 1976. Nitrate reductase in barley roots under sterile, low oxygen conditions. *Plant Physiol.* 57:458-459.
- Brunetti, N., e R. H. Hageman. 1976. Comparison of in vivo and in vitro assays of nitrate reductase in wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. *Plant Physiol.* 58:583-587.
- Candella, M. I., E. G. Fisher, e E. J. Hewitt. 1957. Molybdenum as a plant nutrient. X. Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand culture. *Plant Physiol.* 32:280-288.
- Canvin, D. T., e C. A. Atkins. 1974. Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves, effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta* 116:207-224.
- Carmelo, R., e U. Violante. 1972. Effect of heat treatment on the activity in vitro of nitrate reductase from Cyanidium caldarium. *Biochem. Biophys. Acta* 256:524-532.

- Cheniae, G., e H. L. Evans. 1956. Nitrate reductase from the nodules of leguminous plants. Em: Inorganic Nitrogen Metabolism. W. D. Mc Elroy e D. Glass ed. John Hopkins Press, Baltimore.
- Dalling, M. J., N. E. Tolbert, e R. H. Hageman. 1972. Intracellular location of nitrate reductase. I. Spinash and tobacco leaves. Biochem. Biophys. Acta 283:502-512.
- De Jong, D. W. 1972. Detergent extration of enzymes from tobacco leaves varying in maturity. Plant Physiol., Lancaster 50: 733-737.
- Evans, H. J., e A. Nason. 1953. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiol. 28: 233-254.
- Ferrari, T. E., e J. E. Warner. 1969. Substrate induction of nitrate reductase in barley aleurone layers. Plant Physiol. 44:85-88.
- Franco, A. A., J. C. Pereira, e C. A. Neyra. 1979. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol. 63:421-424.
- Gallo, J. R., e W. L. Lott. 1965. Método simplificado para determinação de nitrato nas folhas, com o ácido fenoldissulfônico. Bragantia 24:III-VII.
- Galston, A. W. 1961. The Life of Green Plants. Prentice Hall, Englewood Cliffs, ed. N. J.
- Givan, C. F., A. Givan, e R. M. Leech. 1970. Photoreduction of alpha-ketoglutarate to glutamate by Vicia faba chloroplasts. Plant Physiol. 45:624-630.
- Goodman, P. J., D. M. Hughes, M. Foghergill, e P. B. Ellis. 1974. Genetic variation in the acitivity of nitrate reductase

in Lolium. Plant and Soil 41:453-443.

Hageman, R. H., e D. Flesher. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. Plant Physiol. 35:700-708.

Hageman, R. H., D. Flesher, e A. Gitter. 1961. Diurnal variation and other light effects influencing the acitivity of nitrate reductase and nitrogem metabolism in corn. Crop Sci. 1:201-204.

Hageman, R. H., e D. P. Hucklesby. 1971. Nitrate reductase from higher plants. Em: Methods in Enzymology. XXIII. A. San Pietro ed.

Hageman, R. H., J. F. Zieserl, e E. R. Leng. 1963. Level of nitrate reductase activity in inbred lines and F_1 hybrids in maize. Nature 197:263-265.

Hardy, R. W. F., e U. D. Havelka. 1975. Photosynthate as a major factor limiting N_2 fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. Em: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Vol. 7. P. S. Nutman ed., Cambridge U. P., London, England.

Harper, J. E. 1974. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. Crop Sci. 14:255-260.

Harper, J. E. 1976. Contribution of Dinitrogen and Soil or Fertilizer Nitrogen to Soybean (Glycine max L. Merr.) Production. Em: World Soybean Research. Lowell D. Hill. Proceedings of the World Soubean Research Conference. The Interstate Printers and Publishers, Inc., Danville, Illinois.

Harper, J. E., e R. H. Hageman. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (Glycine max L. Merr.) Plant Physiol. 49:146-154.

- Harvey, B. M. R., e A. Oaks. 1974. The hydrolysis of endosperm protein in Zea mays. Plant Physiol. 53:453-457.
- Heimer, Y. M., e P. Filner. 1971. Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. Biochem. Biophys. Acta 230:362-372.
- Hewitt, E. J. 1977. Comunicação pessoal de L. Sodek: International Symposium on Nitrogen Assimilation in Plants. Long Ashton. England.
- Huffaker, R. C., T. Radin, G. E. Kleinkopf, e E. L. Cox. 1970. Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. Crop Sci. 10:471-473.
- Janiesch, P. 1973. Contribution on the physiology of nitrophytes nitrate accumulation and nitrate assimilation of Anthriscus sylvestris Hoffm. Flora 162:479-491.
- Jones, R. W. e R. W. Sheard. 1976. Conditions affecting in vivo nitrate reductase activity en chlorophyllous tissues. Can. J. Bot. 55:896-901.
- Jones, R. W., e R. W. Sheard. 1977. Differential effect of irradiance and nitrate nutrient on the relationship of in vivo and in vitro nitrate reductase assay in chlorophyllous tissues. Plant Physiol. 59:535-359.
- Jordan, W. R., e R. C. Huffaker. 1972. Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in greening barley leaves. Physiol. Plant. 26:296-301.
- Kadam, S. S., A. P. Gandhi, S. K. Sawheney, e M. S. Naik. 1974. Inhibitor of nitrate reductase in the roots of rice seedlings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH. Biochem. Biophys. Acta 350:162-170.

- Kannangara, C. G., e H. W. Woolhouse. 1967. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of Perilla frutescens New Phytol. 66:533-539.
- Kannangara, C. G., e H. W. Woolhouse. 1968. Changes in the enzyme activity of soluble protein fraction in the course of foliar senescence in Perilla frutescens (L.) Britt. New Phytol. 67:533-542.
- Kende, H., H. Hahn, e S. E. Kays. 1971. Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in Agrostemma githago. Plant Physiol. 48:702-706.
- Kinsky, S. C. 1961. Induction and repression of nitrate reductase in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 82:898-904.
- Klepper, L., D. Flesher, e R. H. Hageman. 1971. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. Plant Physiol. 48:580-590.
- Klepper, L., e R. H. Hageman. 1969. The occurrence of nitrate reductase in apple leaves. Plant Physiol. 44:110-114.
- Lips, S. H., e N. Roth-Bejerano. 1969. Light and hormones: interchangeability in the induction of nitrate reductase. Sci. N. Y. 66:109.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, e R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-675.
- Magalhães, A. C. 1973. Nitrogen metabolism in soybean plants under conditions of temperature stress. Tese de Ph. D. University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Magalhães, A. C., C. A. Neyra, e R. H. Hageman. 1974. Nitrite assi

- milation and amino nitrogen synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 53:411-415.
- Mattas, R. E., e A. W. Pauli. 1965. Trends in nitrate reduction and nitrogen fractions in young corn (Zea mays L.) plants during heat and moisture stress. *Crop Sci.* 5:181-184.
- Mifflin, B. J., e P. J. Lea. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem.* 15:873-885.
- Morilla, C. A., J. S. Boyer, e R. H. Hageman. 1973. Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (Zea mays L.) having low leaf water potentials. *Plant Physiol.* 51:817-824.
- Nason, A. 1956. Enzymatic steps in the assimilation of nitrate and nitrite in fungi and green plants. Em: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. W. D. Mc Elroy and B. Glass ed. John Hopkins Press, Baltimore.
- Neyra, C. A., e R. H. Hageman. 1976. Relationships between carbon dioxide, malate, and nitrate accumulation and reduction in corn (Zea mays L.) seedlings. *Plant Physiol.* 58:726-730.
- Neyra, C. A., e R. H. Hageman. 1978. Pathway for nitrate assimilation in corn (Zea mays L.) leaves. Celular distribution of enzymes and energy sources for nitrate reduction. *Plant Physiol.* 62:618-621.
- Nicholas, D. J. D., e H. M. Stevens. 1956. The role of molybdenum in oxidation-reduction process in Neurospora and Azoto-bacter. Em: *Inorganic Nitrogen Metabolism*. W. D. Mc Elroy and B. Glass. ed. John Hopkins Press, Baltimore.
- Nicholas, J. C., J. E. Harper, e R. H. Hageman. 1976-a. Nitrate reductase activity in soybeans (Glycine max L. Merr.) I. Effects of light and temperature. *Plant Physiol.* 58:731 - 735.

- Nicholas, J. C., J. E. Harper, e R. H. Hageman. 1976-b. Nitrate reductase activity in soybeans (Glycine max L. Merr.) II. Energy limitations. Plant Physiol. 58:736-739.
- Oaks, A., W. Wallace, e D. Stevens. 1972. Synthesis and turnover of nitrate reductase in corn roots. Plant Physiol. 50:649-654.
- Obendorf, R. L., e R. C. Huffaker. 1970. Influence of age and illu~~min~~ination on distribution of several Calvin cycle enzymes in greening barley leaves. Plant Physiol. 45:579-582.
- Onwueme, I. C., H. M. Laude, e R. C. Huffaker. 1971. Nitrate reductase activity in relation to heat stress in barley see~~dl~~ings. Crop Sci. 11:195-200.
- Pal, U. R., R. R. Johnson, e R. H. Hageman. 1976. Nitrate reductase activity in heat (drought) tolerant and intolerant maize genotypes. Crop Sci. 16:775-779.
- Pan, Y. T., e H. V. Marsh Jr. 1972. An investigation of the nitrate reductase inhibitor(s) in the root of Zea mays. Plant Physiol. 49:S-49.
- Purvis, A. C., e C. R. Tischler. 1976. In vitro studies of nitrate reductase activity in cotton cotyledons. Effects of dow~~ex~~ 1-Cl and BSA. Plant Physiol. 58:95-99.
- Purvis, A. C., D. B. Peters, e R. H. Hageman. 1974. Effect of carbon dioxide on nitrate accumulation and nitrate reductase induction in corn seedlings. Plant Physiol. 53:934-941.
- Radin, J. W. 1975. Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. Plant Physiol. 55:178-182.
- Rhodes, M. J. C., e E. W. Yemm. 1963. Development of chloroplasts

- and the synthesis of proteins in leaves. *Nature* 200:1077-1080.
- Ritenour, G., e R. C. Huffaker. 1964. The effect of light, nitro-nutrition and temperature on the nitrate reductase activity of barley seedlings. *Plant Physiol.* 39(Supp):XX-XXL.
- Roth-Bejerano, N., e S. H. Lips. 1970. Hormonal regulation of nitrate reductase activity in leaves. *New Phytol.* 69:165-169.
- Roth-Bejerano, e S. H. Lips. 1973. Induction of nitrate reductase in leaves of barley in the dark. *New Phytol.* 72: 253-257.
- Sahulka, J. 1972. The effect of exogenous IAA and kinetin on nitrate reductase, nitrite reductase and glutamate dehydrogenase activities in excised pes roots. *Biol. Plant.* 14: 330-336.
- Schrader, L. E., D. A. Cataldo, e D. M. Peterson. 1974. Use of protein in extraction and stabilization of nitrate reductase. *Plant Physiol.* 53:688-690.
- Schrader, L. E., G. L. Ritenour, G. L. Eilrich, e R. H. Hageman. 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.* 43:930-940.
- Shaner, D. L., e J. S. Boyer. 1976-a. Nitrate reductase activity in maize (Zea mays L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.* 58:499-504.
- Shaner, D. L., e J. S. Boyer. 1976-b. Nitrate reductase activity in maize (Zea mays L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.* 58:505-509.
- Sherrard, J. H., e M. J. Dalling. 1979. In vitro stability of nitrate reductase from weat leaves. I. Stability of highly

- purified enzyme and its component activities. *Plant Physiol.* 63:346-353.
- Sorger, G. J., M. J. Debanne, e J. Davies. 1974. Effect of nitrate on the synthesis and decay of nitrate reductase of Neurospora. *Biochem. J.* 140:395-403.
- Stewart, G. R. 1972. The regulation of nitrate reductase level in Lemna minor L. *J. Esp. Bot.* 23:171-183.
- Streeter, J. G., e M. E. Bosler. 1972. Comparison of in vitro and in vivo assays for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiol.* 49:448-450.
- Stulen, I., T. Koch-Bosma, e A. Koster. 1971. An endogenous inhibitor of nitrate reductase in radish cotyledons. *Acta Bot. Neerl.* 20:389-396.
- Stulen, I., T. Koch-Bosma, e A. Koster. 1973. The influence of light and nitrate on the induction of nitrate reductase in dark-grown seedlings of Raphanus sativus. *Acta Bot. Neerl.* 22:581-588.
- Subramanian, K. N., e G. J. Sorger. 1972. Regulation of nitrate reductase in Neurospora crassa: stability in vivo. *J. Bacteriol.* 110:538-546.
- Thibodeau, P. S., e E. G. Jaworsky. 1975. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. *Planta* 127:133-147.
- Tischler, C. R., A. C. Purvis, e W. R. Jordan. 1978. Factors involved in in vitro stabilization of nitrate reductase from cotton (Gossypium hirsutum L.) cotyledons. *Plant Physiol.* 61:714-717.
- Travis, R. L., e J. L. Key. 1971. Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase in

- dark-grown corn seedlings. *Plant Physiol.* 48:617-620.
- Travis, R. L., R. C. Huffaker, e J. L. Key. 1970-a. Light-induced development of polyribosomes and the induction of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.* 46:800-805.
- Travis, R. L., W. R. Jordan, e R. C. Huffaker. 1970-b. Light and nitrate requirement for induction of nitrate reductase activity in Hordeum vulgare. *Plant Physiol.* 23:678-685.
- Tsukamoto, A. 1970. Reductive carboxylation and amination of ketoacids by spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 11:221-230.
- Wallace, W. 1973. A nitrate reductase inactivating enzyme from maize root. *Plant Physiol.* 52:197-201.
- Wallace, W. 1974. Purification and properties of a nitrate reductase inactivating enzyme. *Biochem. Biophys. Acta* 341:265-276.
- Wallace, W. 1975. Effects of a nitrate reductase-inactivating enzyme and NAD(P)H on the nitrate reductase from higher plants and Neurospora. *Biochem. Biophys. Acta* 377:239-259.
- Wallace, W., e J. D. Pate. 1965. Nitrate reductase in field pea (Pisum arvense L.). *Ann. Bot.* 29:655-671.
- Wallace, W., e J. S. Pate. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cockebur (Xanthium pennsylvanicum Wallr.). *Ann. Bot.* 31:213-228.
- Warner, R. L., R. H. Hageman, J. W. Dudley, e R. J. Lambert. 1969. Inheritance of nitrate reductase activity in Zea mays L. *Nac. Acad. Sci.* 62:785-792.
- Younis, M. A., A. W. Pauli, H. L. Mitchell, e F. C. Sighler. 1965.

Temperature and its interaction with light and moisture in nitrogen metabolism of corn (Zea mays L.) seedlings. Crop Sci. 5:321-326.

Zielke, R. H., e P. Filner. 1971. Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. J. Biol. Chem. 246:1772-1779.
