

MARCIA THEREZA RUSSO

ASPECTOS AUTOECOLÓGICOS DO PROCESSO DE REDUÇÃO DO NITRATO
EM *EICHHORNIA CRASSIPES* (MART) SOLMS. (Aguapé).

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para a
obtenção do grau de Mestre em
Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães

CAMPINAS

-1983-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. ANTONIO CELSO NOVAES DE MAGALHÃES, pela orientação, interesse e apoio constante em todas as etapas desse trabalho.
- Aos Profs. Dr. IVANY F.M. VALIO e LADSLAV SODEK , pela colaboração durante a realização dessa pesquisa.
- Ao Prof. Dr. WILLIAM HENRY STUBBLELINE, pela assistência na análise estatística dos resultados.
- Aos Profs. Dr. GEORGE JOHN SHEPHERD, Dr. LADSLAV SODEK e Dr. MARO SONDAHL, pela leitura do manuscrito, críticas e sugestões.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo concedimento de bolsa de estudo.
- Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp, pelo estímulo, amizade e colaboração direta e indireta.

ÍNDICE DAS FIGURAS

- Figura 1. Efeito da idade da folha na atividade *in vivo* da redutase de nitrato em aguapê. Condições do meio de incubação: 0,1 M KNO_3 ; pH 7,0; Temperatura do banho maria 33°C. Cada ponto representa a média de três repetições; o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto..... 21
- Figura 2. Atividade da enzima, redutase de nitrato *in vivo* em folhas de aguapê durante o período de luz e escuro em ambiente controlado. Condições do meio de incubação: 0,1 M KNO_3 ; pH 7,0; temperatura do banho maria 33°C. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.. 22
- Figura 3. Efeito da concentração do substrato na atividade *in vivo* da redutase de nitrato em folhas de aguapê. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto..... 24
- Figura 4. Efeito do tempo de reação na formação do produto nitrito em folhas de aguapê. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto. 25
- Figura 5. Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo* em folhas de aguapê. Cada ponto representa a média

de três repetições e o erro padrão é indicado
acima e abaixo de cada ponto 26

Figura 6. Efeito da temperatura no meio de incubação so
bre a atividade *in vivo* da redutase de nitra
to em folhas de aguapé. Cada ponto representa
a média de três repetições e o erro padrão é
indicado acima e abaixo de cada ponto 27

Figura 7. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividad
e *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas
de aguapé. Planta adulta (30 dias). A temperar
tura do ar é constante à 20°C e cada ponto re
presenta a média de três repetições e o erro
padrão é indicado acima e abaixo de cada pont
o 29

Figura 8. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividad
e *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas
de aguapé. Planta adulta (30 dias). A temperar
tura do ar é constante à 25°C. Cada ponto re
presenta a média de três repetições e o erro
padrão é indicado acima e abaixo de cada pont
o 30

Figura 9. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividad
e *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas
de aguapé. Planta adulta (30 dias). A temper
atura do ar é constante à 30°C. Cada ponto
representa a média de três repetições e o err
o padrão é indicado acima e abaixo de cada
ponto 31

Figura 10. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé. Planta jovem (20 dias). A temperatura do ar é constante à 25°C. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.. 33

Figura 11. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas raízes de aguapé. A temperatura do ar é constante à 25°C. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto 33

Figura 12. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé dentro de cada conjunto de temperatura do ar. Cada ponto representa a média de três repetições para os conjuntos de 20°C e 30°C e de seis repetições para o conjunto de 25°C do ar.
(- - - - $T_{ar}=20^{\circ}\text{C}$; ——— $T_{ar}=25^{\circ}\text{C}$; -.-.- $T_{ar}=30^{\circ}\text{C}$) ... 34

Figura 13. Efeito da temperatura da raiz na atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé (———). Efeito da temperatura do ar (- - - -) 36

Figura 14. Efeito da diferença de temperatura do ar e da raiz na atividade média da redutase de nitrato nas folhas de aguapé 37

Figura 15. Efeito da temperatura da raiz na atividade máxima da redutase de nitrato nas folhas de aguapé

pé nos três conjuntos de temperatura (A - 20°C no ar; B - 25°C no ar; C - 30°C no ar)

38

Figura 16. Concentração do íon nitrato no tecido foliar de aguapé. A temperatura do ar é constante à 20°C. O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.....

40

Figura 17. Concentração do íon nitrato no foliar de aguapé. A temperatura do ar é constante à 25°C. O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto

40

Figura 18. Concentração do íon nitrato no tecido foliar de aguapé. A temperatura do ar é constante à 30°C. O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.....

41

Figura 19. Concentração do íon nitrato no tecido foliar (—) e radicular (- - -) de aguapé. A temperatura é constante à 25°C. O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto

41

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Descrição do Processo de Redução do Nitrato	5
2.2. Distribuição da Enzima Redutase de Nitrato	8
2.2.1. Localização intracelular	8
2.2.2. Distribuição organográfica	8
2.3. Efeito da Temperatura sobre o Prccesso de Redução de Nitrato	9
2.4. Variabilidade Genética da Redutase de Nitrato	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material	16
3.2. Determinação da atividade da Redutase de Nitrato na Folha	17
3.3. Determinação da Atividade da Redutase de Nitrato na Raiz	17
3.4. Efeito da Temperatura nas Raízes na Atividade da Redu tase de Nitrato	18
3.5. Determinação da Concentração de Nitrato	18
3.6. Análise Estatística	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Padronização do Método para a Determinação da Ativida de da Redutase de Nitrato	20
4.1.1. Atividade em função da idade da folha	20
4.1.2. Padrão da variação da atividade da enzima na luz e no escuro	20
4.1.3. Efeito da concentração do nitrato no meio de incubação	23
4.1.4. Efeito do tempo de reação	23

4.1.5. Efeito do pH	23
4.1.6. Efeito da temperatura no meio de reação	23
4.2. Influência de Diferentes Temperaturas no Meio Radi- cular e na Parte Aérea sobre a Atividade da Reduta- se de Nitrato nas Folhas	28
4.3. Concentração do Íon Nitrato	39
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	48
7. RESUMO	49
8. SUMMARY	51
9. LISTA DE ABREVIATURAS	52
10. BIBLIOGRAFIA	53

1. INTRODUÇÃO

A produtividade vegetal pode ser limitada por vários fatores ambientais. Em plantas terrestres são considerados mais importantes a radiação luminosa, temperatura, disponibilidade de nutrientes, gás carbônico, e de água (LARCHER, 1975 ; LEOPOLD e KRIEDEMANN, 1975). As interações entre esses fatores, com relação aos seus efeitos na produtividade vegetal, podem nem sempre ser lineares (TAMM, 1975), como, por exemplo, a disponibilidade de gás carbônico, que pode ser limitada por falta de água em plantas terrestres (MOONEY e GULMON, 1979).

Normalmente, plantas aquáticas flutuantes se encontram sob condições ótimas em relação a disponibilidade de água e intensidade luminosa. Por isso, os fatores temperatura e disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio, são os mais importantes na limitação do crescimento nesses vegetais (BERRY e BJORKMAN, 1980; CLARKSON e HANSON, 1980). Sendo assim, plantas aquáticas flutuantes são sistemas possuidores de várias vantagens para o estudo das interações entre temperatura, metabolismo de nitrogênio e produtividade vegetal.

O aguapé é uma planta aquática flutuante pertencente à família Pontederiaceae (PENFOUND e EARLE, 1948). Ela é considerada como sendo nativa da Amazônia, mas foi distribuída pelo mundo devido à beleza ornamental de suas flores. Atualmente ela é encontrada em quase todos os países da América Latina e América Central, ocorrendo em climas tropical e sub-tropical (PENFOUND e EARLE, 1948). Devido à sua alta produtividade biológica o aguapé pode infestar cursos d'água e reservatórios, causando problemas para sua utilização. Entretanto, em seu ambiente natural, a América do Sul, o aguapé não é necessariamente prejudicial, pois insetos, vírus e outros inimigos naturais podem controlar seu crescimento (RADY, 1979). Em alguns países ela representa um problema seríssimo (HOLM et al., 1969) e, nestas regiões, a aplicação

de herbicidas tem sido amplamente utilizada (HILDEBRAND, 1946).

Mais recentemente, o aproveitamento econômico do aguapé tem sido muito discutido, e as pesquisas demonstraram sua utilização como fertilizante para o solo (PARRA e HORTENSTINE, 1974, 1976) e alimento para a dieta de peixes (LIANG e LOWELL, 1971). Vários trabalhos tem sugerido que o aguapé pode ser usado como agente despoluidor de lagos e lagoas pela remoção de fenóis (WOLVERTON e MCKNOWN, 1976), diphenamida (BINGHAM e SHAVER, 1971, 1977), metais pesados como zinco, manganês, cobre (JOHNSON e SHEEHAN, 1977) e mercúrio (DINGES, 1976, 1978), presentes nos efluentes industriais ou domésticos, prejudicando a qualidade da água.

A remoção de nitrogênio e fósforo pelo aguapé foi estudada por GOSSET e NORRIS (1971), BOYD (1976), BOYD e SCARSBROOK (1975), DINGES (1976) e WOLVERTON e MCDONALD (1978). Sob condições favoráveis, cada hectare de aguapé pode remover de um efluente poluído 22-24 Kg de nitrogênio, a mesma quantidade de potássio, 18-34 Kg de sódio, 11-22 Kg de cálcio, 8-17 Kg de fósforo e 2-4 Kg de magnésio por dia (RADY, 1979).

Com relação à sua produtividade biológica foram registrados valores de matéria seca de 146 Kg ha⁻¹. dia⁻¹, segundo PENFOUND e EARLE (1948), ou de 194 Kg ha⁻¹. dia⁻¹, de acordo com BOYD (1976).

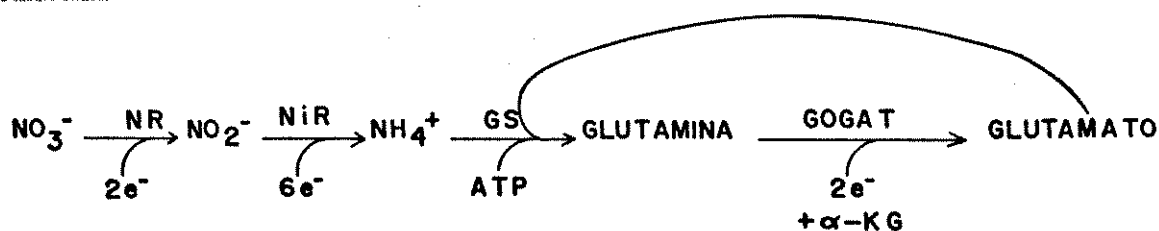
Considerando a importância econômica potencial do aguapé com fonte alternativa de energia proveniente de sua grande biomassa e como alimento animal, além de sua capacidade despoluidora de lagos e cursos d'água, o estudo dos fatores limitantes do crescimento desta espécie se justifica, principalmente em ecossistemas tropicais, regiões de origem do aguapé.

Dentre os fatores limitantes do crescimento dos vegetais, a disponibilidade de nitrogênio pode ser considerado como um dos principais, uma vez que as plantas tem as atividades metabólicas diminuídas sob concentrações sub-ótimas deste nutriente (INGESTAD e LUND, 1979). O nitrogênio é componente fundamental

de muitos processos fisiológicos das plantas tais como síntese de proteínas, nucleotídeos de piridinas, ácidos nucleicos, etc. (ALEEM, 1970).

Baseado em análises aproximadas, GALSTON (1961) estimou que numa escala mundial 10×10^9 toneladas de nitrogênio são anualmente incorporadas às plantas. Grande quantidade de nitrogênio presente nos vegetais é derivada do processo de assimilação do nitrato ou amônia (BEEVERS e HAGEMAN, 1980). Aparte as espécies que possuem associação simbiótica com bactérias fixadoras, a maior quantidade do nitrogênio orgânico é originado da redução enzimática do nitrato nos tecidos. Para a maioria das plantas econômicas, sob condições normais de campo, o anion nitrato é a forma predominante de nitrogênio disponível no solo. (BEEVERS e HAGEMAN, 1969). Embora grandes quantidades de fertilizantes amoniacais sejam correntemente utilizados, a amônia sofre processo de oxidação para nitrato pelos microorganismos nitrificadores no solo (BEEVERS e HAGEMAN, 1980). Tanto na água-doce, como na água do mar, o nitrogênio é encontrado na forma de nitrato, nitrito e amônia, sendo que o primeiro representa a forma iônica mais abundante (SERRA et al., 1978).

A assimilação do nitrato inclui processos redutores e não redutores na conversão do N-nitrato para N-amido, e o esquema abaixo ilustra essa seqüência de reações (SCHRADER e THOMAS, 1981)



A enzima responsável pelo início desse processo é a Redutase de Nitrato (E.C., 1.6.6.1.). O produto dessa primeira reação, o nitrito, é a seguir reduzido, pela Redutase de

Nitrito, produzindo amônia a qual, combinando-se com os esqueletos de carbono, resulta na produção de amino ácidos que, posteriormente entrarão na composição de proteínas (SCHRADER e THOMAS, 1981).

O nitrato pode ser reduzido nas folhas e raízes das plantas, mas a eficiência relativa desses processos varia entre as espécies e com fatores ambientais (MAGALHÃES, 1975).

Outro fator limitante no crescimento e desenvolvimento das plantas é a temperatura. A temperatura afeta, primordialmente, as reações químicas catalizadas por enzimas. Dentro de certos limites, a velocidade das reações aumenta com a temperatura até um valor acima do qual as enzimas envolvidas poderão sofrer inibição ou, dependendo das condições, induzir desnaturação (LENNINGER, 1977).

O efeito da temperatura sobre a atividade da Redutase de Nitrato tem sido estudada *in vivo* e *in vitro*, em várias espécies e em vários tecidos das plantas e entre seus órgãos. Temperaturas altas, provavelmente responsáveis pela inibição da atividade da enzima Redutase de Nitrato, foram estudadas por MAGALHÃES et al., (1976). Por outro lado, ONWEME et al., (1971) verificaram que temperaturas baixas no período de escuro protegeram a enzima contra a inativação.

A temperatura do meio radicular pode afetar o crescimento dos vegetais através da alteração nas taxas de absorção de nutrientes e produção e translocação dos hormônios reguladores do crescimento (WATTS, 1972).

Considerando que a enzima Redutase de Nitrato cataliza uma importante reação do aproveitamento do nitrogênio mineral durante sua transformação em nitrogênio orgânico, e que sua atividade é fortemente modulada por fatores ambientais e da própria planta, este parâmetro fisiológico foi prioritariamente utilizado para a avaliação do comportamento da planta sob influência das temperaturas do ar e da água.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Descrição do Processo de Redução do Nitrato

A redução do nitrato nas plantas clorofiladas é catalizada pela enzima Redutase de Nitrato (E.C. 1.6.6.1.), que é uma molibdenoflavoproteína, a primeira enzima que atua no sistema de incorporação do nitrogênio mineral em compostos orgânicos nitrogenados (KUO et al., 1980). Essa enzima tem sido encontrada em algas, fungos e plantas superiores (HEWITT, 1975), sendo que nessas, sua presença foi verificada na maioria dos tecidos, incluindo folhas, raízes, embriões, escutelo e células de aleurona (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

A redutase de Nitrato é regulada e induzida por seu substrato, o nitrato, e a ausência deste pode ser um dos fatores limitantes da sua atividade.

A enzima é prontamente induzida pelo nitrato em camadas de aleurona (FERRARI e VARNER, 1970), folhas de cevada (BJERANO e LIPS, 1973; ASLAM et al., 1976), tecidos de milho (SCHRADER et al., 1968; STEVENS e OAKS, 1973; ASLAM e OAKS, 1975) plântulas de arroz (SHEN, 1972) e cotilédones de abóbora (JONES e SHEARD, 1975).

Estudos com inibidores da síntese de proteínas e ácidos nucleicos indicaram que o nitrato induz a síntese da enzima, ao invés de ativar algum precursor inerte (BEEVERS e HAGEMAN, 1969; SMITH e THOMPSON, 1971; ZIELKE e FILNER, 1971; JONES et al., 1978; CARELLI e MAGALHÃES, 1981).

A ciclagem da Redutase de Nitrato, em resposta à adição de nitrato, foi constatada em raízes de milho por STEVENS e OAKS (1973) que concluíram que a enzima é formada e degradada simultaneamente na presença de RNA-mensageiro (OAKS et al., 1972). Por sua vez, a adição de inibidores de RNA e síntese proteica inibem o aumento da atividade da Redutase de Nitrato induzida pelo substrato (CLE

MENTS et al., (1978).

A Redutase de Nitrato, em linhagens de *Neurospora*, possui mecanismos de auto-regulação, sendo sintetizada constitutivamente à níveis baixos na ausência de nitrato, e induzida a níveis mais altos na sua presença (NOTTON et al., 1974, citado por BEEVERS e HAGEMAN, 1980). O fluxo contínuo de nitrato através da corrente transpiratória é necessário para a ocorrência do processo de indução e formação da enzima na folha (BEEVERS et al., 1965; JACKSON et al., 1973; NEYRA e HAGEMAN, 1975; SHANER e BOYER, 1976a).

A absorção de nitrato pelas raízes segue a cinética de Michaelis-Menten. Em raízes de milho, os valores de K_m para o processo de absorção variam entre 0,2 e 0,8 m mol. litro⁻¹ (HEIMER e FILNER, 1971).

A absorção de nitrato através de dois sistemas, um apresentando alta afinidade pelo ion (0 - 0,5M) e outro baixa afinidade ($> 0,5M$), foram demonstrados em *Arabidopsis thaliana* por DODDEMA e TELKAMP (1979). Em plântulas de cevada, foi verificado que a absorção de nitrato também poderia operar com dois mecanismos diferentes, um em baixa concentração (0,05 à 0,5 mM) e outro acima de 0,5 mM de nitrato (RAO e RAINS, 1976a).

A absorção do nitrato dependente de sistemas de 'permeases' induzidas pelo nitrato, foram demonstradas em trigo, milho e cevada (JACKSON et al., 1973; NEYRA e HAGEMAN, 1975; ASHLEY et al., 1975; CHANTAROTWONG et al., 1976; RAO e RAINS, 1976a).

A existência de níveis diferentes de nitrato para o ótimo de indução da Redutase de Nitrato entre as espécies, indicam que existe, provavelmente, uma diferença no processo de absorção nas diferentes plantas (BEEVERS et al., 1965).

A relação entre a concentração do nitrato e a atividade da enzima foi verificada em raízes de milho por STEVENS e OAKS (1973). Com relação a idade da raiz, aqueles autores demonstraram que, no ápice, a atividade aumentou em concentrações entre 0 e 10 mM de nitrato, porém, em seções mais maduras, o processo de indução da enzima não saturou em concentrações de nitrato até 100 mM.

O nitrato precisa ser transportado do compartimento ar mazenador para o sítio metabólico, uma vez que o influxo do íon para o sítio de indução é o fator principal que controla os ní-veis da atividade da enzima (BEEVERS et al., 1965).

Com relação ao tempo de indução, foi constatado que a atividade enzimática cresce linearmente com o tempo, chegando a seu máximo após 3 ou 4 horas em raízes de milho (STEVENS e OAKS, 1973), plântulas de milho (JACKSON et al., 1973) e trigo (JACKSON et al., 1976). Em feijões anões, a indução da atividade da enzima *in vivo* ocorre durante as primeiras 6 horas (BRETELER et al., 1979). A existência de um padrão de indução da atividade da enzima, constituído de uma fase "de espera" seguida de taxas crescentes, foi demonstrado por HEIMER e FILNER (1971); JACKSON et al., (1972); OAKS et al., (1972); JACKSON et al., (1973) ; STEVENS e OAKS (1973); ASHLEY et al., (1975); NEYRA e HAGEMAN (1975); JACKSON et al., (1976) e RAO e RAINS (1976b).

Considerando a energia necessária para a absorção do nitrato, foi verificado que um mecanismo regulador da absorção ativa de íons poderia estar associado ao transporte de açúcares para as raízes (MINOTTI e JACKSON, 1970; PITMAN et al., 1971; JACKSON et al., 1976). HANSEN (1980) sugeriu que a oxidação de carboidratos, ou a atividade respiratória nas raízes, está associado com a absorção de nitrato. SAHULKA e LISÁ (1978) verificaram que os açúcares fornecem energia para o transporte de nitrato para as células e mesmo dentro da célula.

Em plântulas de cevada, usando-se antimetabólitos, foi verificado que o ATP e outros intermediários ricos em energia são responsáveis pela absorção de íons (RAO e RAINS, 1976a). Provavelmente pelos mesmos motivos a taxa de transporte do nitrato e a atividade da enzima Redutase de Nitrato são aumentadas pela adição de glicose e sacarose (ASLAM e OAKS, 1975).

Em raízes destacadas de feijão anão a absorção do nitrato foi semelhante às raízes intactas, demonstrando que a absorção é um processo determinado pela fisiologia do tecido (BRETE-

LER et al., 1979). Resultados semelhantes foram obtidos por NEYRA e HAGEMAN (1975) com segmentos de raízes destacadas de milho.

2.2. Distribuição da enzima Redutase de Nitrato

2.2.1. Localização intracelular

Apesar da controvérsia com respeito à localização intracelular da Redutase de Nitrato, estudos com raízes tem demonstrado a presença da enzima na fração solúvel dos extratos (MIFLIN, 1967; RITTENOUR, 1967; TRAVIS et al., 1969; HEWITT, et al., 1976; EMES e FOWLER, 1979a e SUZUKI, 1981).

MIFLIN (1970) verificou que a Redutase de Nitrato estava localizada em 2 sistemas diferentes, uma parte na fração solúvel, e outra ligada à organelas.

DALLING et al., (1972), trabalhando com raízes de trigo, verificaram que 15% da enzima estava distribuída em protoplastídeos e o restante presente no sobrenadante, representado pelo citossol. SCHRADER et al., (1968) observaram que a Redutase de Nitrato estava localizada no citoplasma das folhas de milho, espinafre e *Ghonnphrena globosa*, e MAGALHÃES et al., (1974) concluíram que a enzima estava concentrada principalmente na fração solúvel dos extratos de folhas de soja.

Em milho, uma planta C_4 , NEYRA e HAGEMAN (1978) verificaram que a Redutase de Nitrato estava presente no citoplasma das células do mesófilo.

2.2.2. Distribuição organográfica

A distribuição da Redutase de Nitrato tem sido estudada em quase todos os órgãos e tecidos das plantas, em diferentes fases ontogenéticas. Em raízes de *Xanthium*, PATE, (1973) concluiu pela ausência da enzima devido ao fato que 95% do nitrogênio total do xilema encontrava-se na forma de nitrato e que não foi en

contrada atividade da enzima naquele órgão. Aquele mesmo autor, trabalhando com ervilha e *Lupinus*, verificou que a maioria do nitrato era reduzido nas raízes dessas espécies. A atividade da Redutase de Nitrato foi encontrada em raízes de trigo (MINOTTI et al., 1968), maçã (FRITH, 1974), cevada (LEE, 1978), camadas de aleurona de sementes de cevada (FERRARI e VARNER, 1970) e fumo (FERRARI et al., 1973).

Em plantas de couve-flor, milho, soja e cana de açúcar, 10 a 30% da atividade total de Redutase de Nitrato na planta foi encontrada nas raízes (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

Os vários estudos tem indicado que, nas plantas superiores, a maior parte do nitrato é reduzida nas folhas, exceto na fase de plântula (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

SRIVASTAVA (1975) verificou que, em plântulas de feijão em fase inicial de desenvolvimento, a atividade da Redutase de Nitrato nas folhas e raízes aumentou, enquanto que permaneceu constante no caule. A atividade nas folhas sempre foi mais alta do que nos outros órgãos, sendo que o mesmo padrão foi verificado em trigo (BLEVINS et al., 1978) e girassol (KAISER e LEWIS, 1980). A enzima também foi encontrada em cotilédones de soja (CARELLI e MAGALHÃES, 1981).

Em plântulas de trigo, POKHRIVAL et al., (1980) verificaram que a atividade da enzima nas raízes diminuiu com o decorrer do desenvolvimento das primeiras folhas.

WALLACE (1973) demonstrou a existência de 20% da Redutase de Nitrato na raiz de milho, sendo que a maior parte da atividade foi encontrada na folha e, antes da expansão foliar, presente no escutelo.

2.3. Efeito da Temperatura sobre o Processo de Redução de Nitrato

A temperatura exerce um papel muito importante no metabolismo de nitrogênio, uma vez que afeta sensivelmente os pro

cessos de absorção e redução de nitrato (HALLMARK e HUFFAKER, 1978).

Temperaturas extremas inibem a atividade da Redutase de Nitrato em diferentes graus nas várias espécies (SCHRADER et al., 1968; ALOFE et al., 1973; MAGALHAES et al., 1974; AMOS e SCHOLL, 1977).

Um efeito primário da temperatura sobre a assimilação do nitrogênio é exercido no processo de absorção do nitrato, que apresenta, em plântulas de milho, valores de Q_{10} de 2,74 em temperaturas entre 20 e 30°C (EZETA e JACKSON, 1975). Os mesmos autores verificaram que o valor de Q_{10} para o processo de redução do nitrato *in vivo* foi de 2,38. Em sorgo, a redução do nitrato foi maior à temperaturas mais altas, tendo sido observados valores de Q_{10} para absorção de 1,99 e de 2,15 para o processo de redução entre 15 e 25°C (HALLMARK e HUFFAKER, 1978). Em plantas de alfafa, foi verificado que temperaturas no ambiente das raízes afetava a absorção do nitrato, e que o aumento era proporcional à elevação da temperatura do ar e da raiz no intervalo entre 8 e 23°C (FROTA e TUCKER, 1972). Também em folhas de sorgo ocorreu um aumento das taxas de absorção do nitrato com o aumento da temperatura (HALLMARK e HUFFAKER, 1978).

CLARKSON et al., (1974) demonstraram que plantas destacadas de cevada, crescidas a 20°C, eram induzidas para absorver íons mais rapidamente do que quando cultivadas por um ou mais dias a 8°C.

BASSIONI (1971), usando raízes de cevada, observou um aumento na absorção do nitrato quando a temperatura variou de 5 a 35°C, e sugeriu o envolvimento de transportadores iônicos no processo de entrada do nitrato nas células.

Em ápices de plantas de milho, MORAGHAM e PORTER (1975) observaram um aumento na concentração de nitrato com aumento da temperatura. Por outro lado, altas temperaturas durante o crescimento podem inibir a atividade da Redutase de Nitrato. Plântulas de milho crescidas em regimes de temperatura diurna e noturna

de 20°C/15°C; 25°C/20°C e 30°C/25°C, mostraram um efeito negativo sobre a atividade da Redutase de Nitrato associado aos incrementos da temperatura, ocorrendo, paralelamente, um acúmulo de nitrato nos tecidos (YOUNIS et al., 1965).

SCHRADER et al., (1968) verificaram uma diminuição na atividade da Redutase de Nitrato em lâminas foliares de milho em temperaturas de 29°C/18°C, em comparação com temperaturas de 24°C/13°C ou 18°C/7°C.

Estudos com híbridos de milho, em regimes de temperatura de 35°C/25°C e 40°C/28°C, mostraram uma redução de 35% na atividade enzimática em temperaturas mais altas e pouca variabilidade genética para a estabilidade da enzima associada à temperatura (AMOS e SCHOOL, 1977).

Em genótipos de milho, temperaturas noturnas de 35°C e diurnas de 24, 16 e 7°C, induziram uma diminuição da atividade enzimática nas temperaturas noturnas mais altas (ALOFÉ et al., 1973).

A perda da atividade enzimática *in vivo* nas folhas de soja foi mais acentuada em temperaturas de 40°C do que a 20°C (NICHOLAS et al., 1976a). O efeito da temperatura sobre a atividade da Redutase de Nitrato *in vivo* e *in vitro* em seis linhagens puras de milho, foi estudada por PAL et al., (1976), no intervalo de 30 a 40°C. Os resultados obtidos revelaram que a enzima das linhagens susceptíveis a temperatura elevada era mais termolábil do que nas linhagens tolerantes. Ocorreu perda da atividade enzimática a 45°C, independentemente do genótipo e da idade da plântula.

BENZIONI e HEIMER (1977) demonstraram o efeito da temperatura na atividade da Redutase de Nitrato *in vivo* nas folhas de cevada, no intervalo de 5 a 60°C. Acima de 20°C, houve um estímulo na atividade da enzima, que atingiu seu máximo na temperatura de 45°C. Acima deste valor ocorreu diminuição na atividade, e os autores sugeriram a alteração da relação de enzima ativa versus inativa como um possível efeito causado pela alta temperatura. A proposta da existência de duas formas interconvertíveis da en

zima em plantas superiores foi também sugerida por WALLACE (1975).

Plantas de soja expostas por 12 horas a temperaturas de 30, 40 e 45°C mostraram uma inibição progressiva na atividade da Redutase de Nitrato nas temperaturas mais altas, ocorrendo, paralelamente, uma diminuição do conteúdo do nitrato foliar. Possivelmente a temperatura alta de 45°C provocou uma diminuição da absorção iônica e do transporte do nitrato para os sítios de redução, ao mesmo tempo que causou a desnaturação irreversível da enzima (MAGALHÃES e HAGEMAN, 1978).

Além do efeito das temperaturas altas, também tem sido demonstrado que temperaturas baixas afetam o processo de assimilação de nitrogênio em várias plantas.

A absorção do nitrato pelas raízes é normalmente reduzida sob efeito de temperaturas baixas, principalmente nos períodos mais frios que antecedem o inverno (WILLIAMS e VLAMIS, 1962 citado por MORAGHAN e PORTER, 1975), o que poderia explicar as deficiências de nitrogênio encontradas no campo que se evidenciam naquelas épocas do ano (MORAGHAN e PORTER, 1975).

A temperatura radicular pode afetar o crescimento dos vegetais através de uma alteração nas taxas de absorção de nutrientes e fluxo de água, bem como na produção e translocação de reguladores de crescimento (WATTS, 1972).

Em cereais, por exemplo, a absorção de nitrato é dependente da atividade das permeases, que podem ser afetadas por temperaturas sub-ótimas (JACKSON *et al.*, 1972; 1973).

NEYRA e HAGEMAN (1975) verificaram, em raízes destacadas de milho, que a absorção do nitrato é marcadamente inibida por temperaturas mais baixas.

A baixa taxa de absorção de íons nitrato em temperaturas baixas pode ser devido à uma mudança física na conformação da membrana celular (CLARKSON e WARNER, 1979).

SHANER e BOYER (1976a) constataram que o esfriamento prolongado das raízes resultou numa diminuição do fluxo de nitrato, com o conseqüente decréscimo da atividade da

enzima Redutase de Nitrato nas folhas.

OSMOND e RAPER (1981) estudaram o efeito de temperaturas radiculares e das partes aéreas no crescimento e acumulação do nitrogênio em plantas de tabaco, sendo que as temperaturas no ambiente das raízes tiveram um efeito muito mais pronunciado no crescimento das plantas do que as temperaturas do ar e/ou concentração do nitrato. O peso seco da planta, área foliar e comprimento do caule foi menor a temperaturas radiculares de 16°C do que 24 ou 32°C.

MAGALHÃES (1977) constatou o efeito da temperatura das raízes na redução do nitrato em soja, sendo que a atividade da enzima Redutase de Nitrato foi máxima com temperatura radicular de 30°C e diminuída a 25°C. Concluiu-se que temperatura das raízes próximas e do ar induzem a atividade máxima da enzima.

A taxa de absorção de ions nitrato em aveia e centeio foi 20% mais baixa a temperatura de 25°C do que a 30°C, não havendo praticamente absorção entre 5 e 15°C (CHEN e RIES, 1969). Por outro lado, também foi verificado que temperaturas mais baixas nas raízes do que nos caules podem, às vezes, favorecer a atividade da Redutase de Nitrato.

Em extratos de raízes de cevada, o fluxo de amino ácidos, nitrato e potássio para o xilema, e a atividade de Redutase de Nitrato, foi 3 vezes mais mais intensa quando a temperatura das raízes era 10°C abaixo da temperatura das partes aéreas do caule (CLARKSON, 1976). O autor sugeriu que uma adaptação para ambientes radiculares mais frios pode ser devido a um aumento do número de transportadores iônicos.

SAHULKA e LISÁ (1979) verificaram a influência da temperatura de cultivo em raízes isoladas de ervilha, e demonstraram que os efeitos da temperatura são mais marcantes nas raízes cultivadas em ausência da sacarose. DRUMOND et al., (1980) verificaram, em raízes de cevada tratadas a 10°C, que o fluxo de K⁺, nitrato e amino ácidos no xilema foi maior do que em raízes crescidas a 20°C. A atividade da Redutase de Nitrato *in vivo* e *in vi*

ção foi maior sob as condições acima descritas. Paralelamente foi encontrada uma quantidade maior de malato nos tecidos de raízes resfriadas, que seria resultante de uma maior diminuição da utilização metabólica do malato do que seu envio via floema.

Estudos sobre o efeito da temperatura na translocação de compostos orgânicos tem indicado que a diminuição ou aumento da temperatura da planta, ou de um órgão particular, tais como raízes ou folhas, causa uma mudança no padrão geral do transporte de substâncias orgânicas, dos sítios de produção para os sítios de consumo de metabólitos. Por exemplo, a diminuição da temperatura ao redor das raízes leva a uma alteração na translocação de compostos produzidos pela atividade assimilatória (LANGRIDGE e MACWILLIAM, 1967).

FUJIWARA e SUZUKI (1961), citado por LANGRIDGE e MCWILLIAM (1967), demonstraram que a taxa de translocação em cevada atingiu seu máximo quando os ápices das plantas foram mantidos a uma temperatura ótima para a respiração.

2.4. Variabilidade Genética da Redutase de Nitrato

A atividade da enzima está sujeita a efeitos de vários genes. Vários autores tem procurado, através de seleção, identificar fatores genéticos que promovam o aumento na eficiência de redução do nitrato em trigo (AUSTIN et al., 1978) e outros cereais (BEEVERS e HAGEMAN, 1980).

A variação sazonal da atividade da Redutase de Nitrato *in vitro* está bem correlacionada com a produtividade e o conteúdo total de nitrogênio em diferentes genótipos de trigo (ELRICH e HAGEMAN, 1973) e entre variedades de couve-flor (CROY, 1967 citado em BEEVERS e HAGEMAN, 1980).

CHEVALIER e SCHRADER (1977) verificaram, em milho, que os genótipos estudados variavam na sua habilidade de absorver nitrato, reduzi-lo e transportá-lo para as diferentes partes do vegetal. A concentração da Redutase de Nitrato em caules e lâmi

nas foliares foi mais alta em plantas retro-cruzadas do que em híbridos. Os autores sugerem que genótipos capazes de utilizar mais eficientemente o nitrogênio absorvido são desejáveis, pois o nitrato acumulado nas partes vegetais, e lixiviados para o solo, poderiam ser fonte poluidora de nitrato.

Uma vez que o nitrato é a forma principal de nitrogênio disponível para as plantas sob condições de campo, a possibilidade de incluir a atividade da Redutase de Nitrato em programas de seleção de variedades superiores em relação a utilização de nutrientes, tem sido muito enfatizada (ROSARIO e SOOKSATHAN, 1977).

AUSTIN et al., (1978) sugerem que uma seleção para alta atividade da Redutase de Nitrato poderia ser usada para revelar genótipos capazes de sintetizar quantidades maiores de proteína e outros compostos reduzidos de nitrogênio e que a partir de tais genótipos seria possível a obtenção de tipos fornecedores de uma alta produção de grãos com alto conteúdo proteico. O mesmo autor, em 1976 mostrou que a quantidade de nitrato produzido por planta, estava relacionado com a variação genética que governa a produção de matéria seca entre genótipos de trigo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Plantas adultas de aguapé foram coletadas em uma represa no município de Americana, SP. e a seguir foram colocadas num reservatório com água. O aguapé se reproduz através da emissão de estolões e expansão de gemas axilares, seguida do alongamento do pecíolo. As plantas usadas nos experimentos foram todas originárias de uma geração parental uniforme, reproduzida vegetativamente nas condições já descritas. Os exemplares daí provenientes foram transferidos para recipientes com 10 litros de capacidade, com solução nutritiva de HOAGLAND 0,5N e colocados em casa de vegetação. A composição da solução é:

Macronutrientes	Concentração mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	590
KNO_3	253
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246
$\text{K H}_2 \text{PO}_4$	68
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12,5
EDTA	16,6
Micronutrientes	Concentração mg/l
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	1.43
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.95
$\text{H}_2\text{MO} \cdot 04\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04

As plantas foram colocadas em câmara de crescimento, 48 horas antes do início da determinação da atividade enzimática, com fotoperíodo de 12 horas, temperatura diurna de 25°C e noturna de

20°C. A intensidade luminosa foi fornecida por oito pares de lâmpadas fluorescentes de 80 watts cada, totalizando $184 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de energia medida no altura do topo das partes aéreas.

3.2. Determinação da atividade da Redutase de Nitrato na Folha

A atividade da enzima foi determinada pelo método *in vivo* descrito por KLEPPER *et al.*, 1971 e posteriormente modificado por HARPER e HAGEMAN (1972).

Tecidos foliares pesando 0,4g foram incubados em tubos de vidro de 25 ml contendo 6 ml da seguinte solução: 0,1M de nitrato de potássio, n-propanol 1% em tampão fosfato pH 7.0. O tecido foi mantido imerso na solução de incubação por meio de suporte de polietileno. O material vegetal foi submetido a infiltração a vácuo por 1 min., repetido 3 vezes, seguido de reentrada de ar.

O ensaio foi realizado em banho-maria agitador a temperatura de 33°C e as alíquotas de 0,2 ml foram retiradas após 15 e 45 minutos para a determinação da concentração de nitrito no meio de incubação. A determinação da concentração do nitrito que se difundiu do tecido para o meio externo foi feita através da reação com N-2-naftil-etileno-diamino-di HCl 0,02% e sulfanilamida 1% em ácido HCl 1,5N (v/v). A concentração de nitrito foi determinada colorimetricamente pela medida da absorbância a 550 nm. A atividade da enzima foi expressa em micromoles de nitrito por grama de peso fresco por hora ($\mu\text{moles NO}_2^- \text{gpf}^{-1}.\text{h}^{-1}$). As determinações foram feitas com três repetições, e cada experimento foi repetido no mínimo três vezes.

3.3. Determinação da atividade da Redutase de Nitrato na raiz

A atividade da Redutase de Nitrato *in vivo* nas raízes de plantas jovens de aguapé foi estudada pelo método já padronizado para as folhas. As raízes inteiras foram cortadas em segmen

tos de 1 cm, tomando-se amostras de 0,5g , em frascos de 25 ml contendo 10 ml de meio de incubação conforme descrito em 3.2.

3.4. Efeito da Temperatura nas raízes na atividade da Redutase de Nitrato

Três plantas jovens foram colocadas em câmaras de crescimento em recipientes de 0,5 litro com água destilada 16 horas antes do início dos experimentos. A superfície superior livre da água dos recipientes foi recoberta com placa de isopor, a fim de manter temperaturas estáveis no ambiente radicular. Os tratamentos de temperatura no meio radicular foram feitos por meio de circulação de água através de uma serpentina acoplada a um banho de água refrigerada com controle termostático de temperatura.

As plantas permaneceram por um período de 10 horas no escuro antes do início dos tratamentos, após o qual foram iluminadas. Depois de 1 hora do início do período de iluminação, foi adicionado 20 mM de nitrato de potássio para a indução da atividade da Redutase de Nitrato.

A atividade enzimática foi determinada no início de período luminoso e após 1, 2, 3 e 5 horas de iluminação de acordo com o planejamento experimental.

Paralelamente a determinação da atividade da enzima , os tecidos foram preparados para a determinação da concentração de nitrato, utilizando o método descrito por GALLO e SCOTT (1965).

3.5. Determinação da Concentração de Nitrato

Amostras de 1,0g de tecido foram colocadas em uma solução contendo 5 mM de tampão fosfato, pH 7,0, maceradas em homogenizador Polytron PT35 (BRINKMAN, Instr. N.J.) e, em seguida, o material foi centrifugado por 15 min., a 12.000g, em centrífuga refrigerada à 15°C. Do sobrenadante foram retiradas amostras de 1 ml, às quais foram adicionadas 4 ml de água destilada, 1 ml de

peróxido de hidrogênio, 120 volumes, e 1 ml de carbonato de cálcio 0,5%. Os recipientes foram envolvidos com folha de papel alumínio e colocados em banho-maria, em ebulição, até a evaporação total do líquido. Após o resfriamento, foi adicionado 1 ml de ácido fenoldissulfônico 1M após 10 min., foram acrescentados 25 ml de solução de hidróxido de amônia 1:9, garantindo-se a mistura a cor amarelo-ouro por meio de agitação com um bastonete de vidro.

A determinação da concentração de nitrato foi feita colorimetricamente, e as leituras feitas em espectrofotômetro a 420 nm. A prova em branco, em duplicata, constou de água destilada sem peróxido de hidrogênio e o valor da quantidade de nitrato foi subtraído das amostras. Foram feitas 3 repetições para cada determinação.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas das médias da atividade da enzima *in vivo*, foram feitas usando o método GT-2 para comparações não planejadas (SOKAL e ROHLF, 1981). Esse método tem, como primeira etapa, a análise de variância (ANOVA). Anovas de dois fatores foram feitas em computador, usando o pacote STP (HOUGHARD, 1974) e a de três fatores usando o pacote SPSS (NIE et al., 1975). As análises foram repetidas com dados não transformados, que foram convertidos para $y = \ln(y+1)$ e com a transformação de Box-Cox (SOKAL e ROHLF, 1981). Todas as repetições das análises deram os mesmos resultados nos testes GT-2.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do Método para a Determinação da Atividade da Redutase de Nitrato

4.1.1. Atividade em função da idade da folha

Os resultados mostrados na Figura 1 indicam que a atividade da Redutase de Nitrato quadruplicou no intervalo entre o 5º e 30º dia, sendo que a idade foi determinada a partir do aparecimento da pseudo-lâmina ao redor do pecíolo de uma outra folha. Observações visuais indicaram que a atividade da Redutase de Nitrato atingiu o valor máximo no período de tempo coincidente com a fase de expansão máxima da pseudo-lâmina.

4.1.2. Padrão da variação da atividade da enzima na luz e no escuro

Uma vez que todos os ensaios foram conduzidos com plantas mantidas sob condições controladas, em câmaras de crescimento, foi considerado importante verificar o padrão da atividade da enzima durante os períodos de luz e escuro estabelecidos nos experimentos.

A Figura 2 mostra que a atividade da Redutase de Nitrato aumenta rapidamente durante as primeiras horas de iluminação, atingindo o máximo após 4 horas de luz, e caindo acentuadamente, até após 10 horas nesse regime. No escuro, a atividade foi variável, atingindo um outro pico máximo após 4 horas, caindo novamente até ser quase nula ao final desse período.

Baseado nesse comportamento das plantas todos os ensaios foram conduzidos de modo a se determinar a atividade enzimática após 4 horas de exposição à luz.

Figura 1. Efeito da idade da folha na atividade *in vivo* da redutase de nitrato em aguapé. Condições do meio de incubação: 0,1 M KNO_3 ; pH 7,0; Temperatura do banho maria 33°C . Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

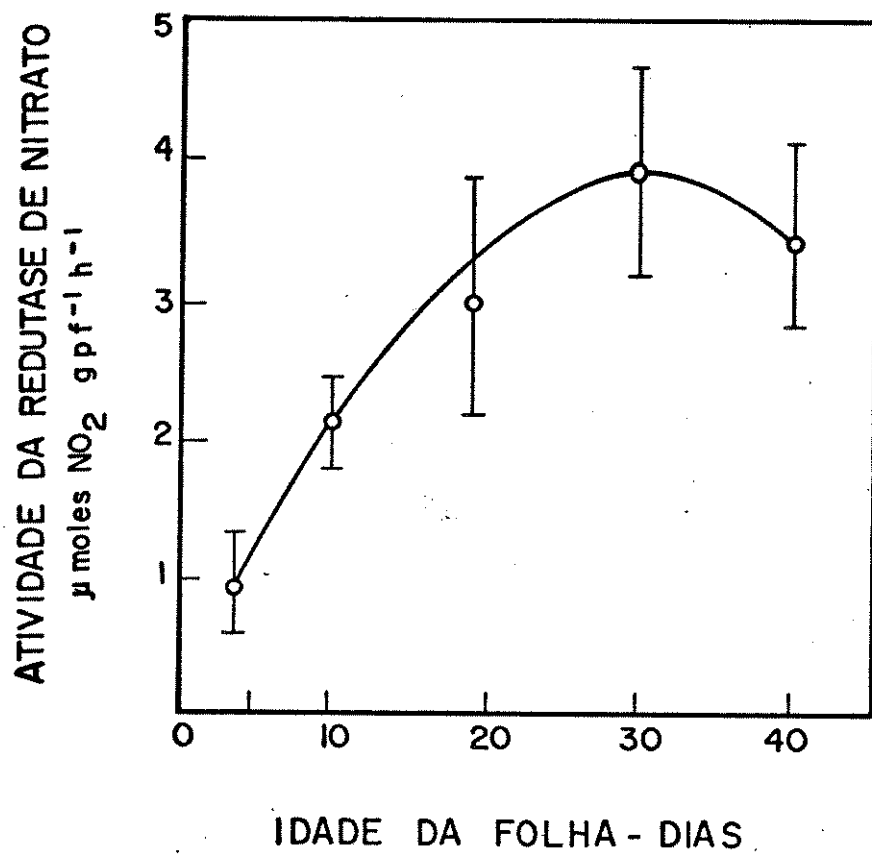
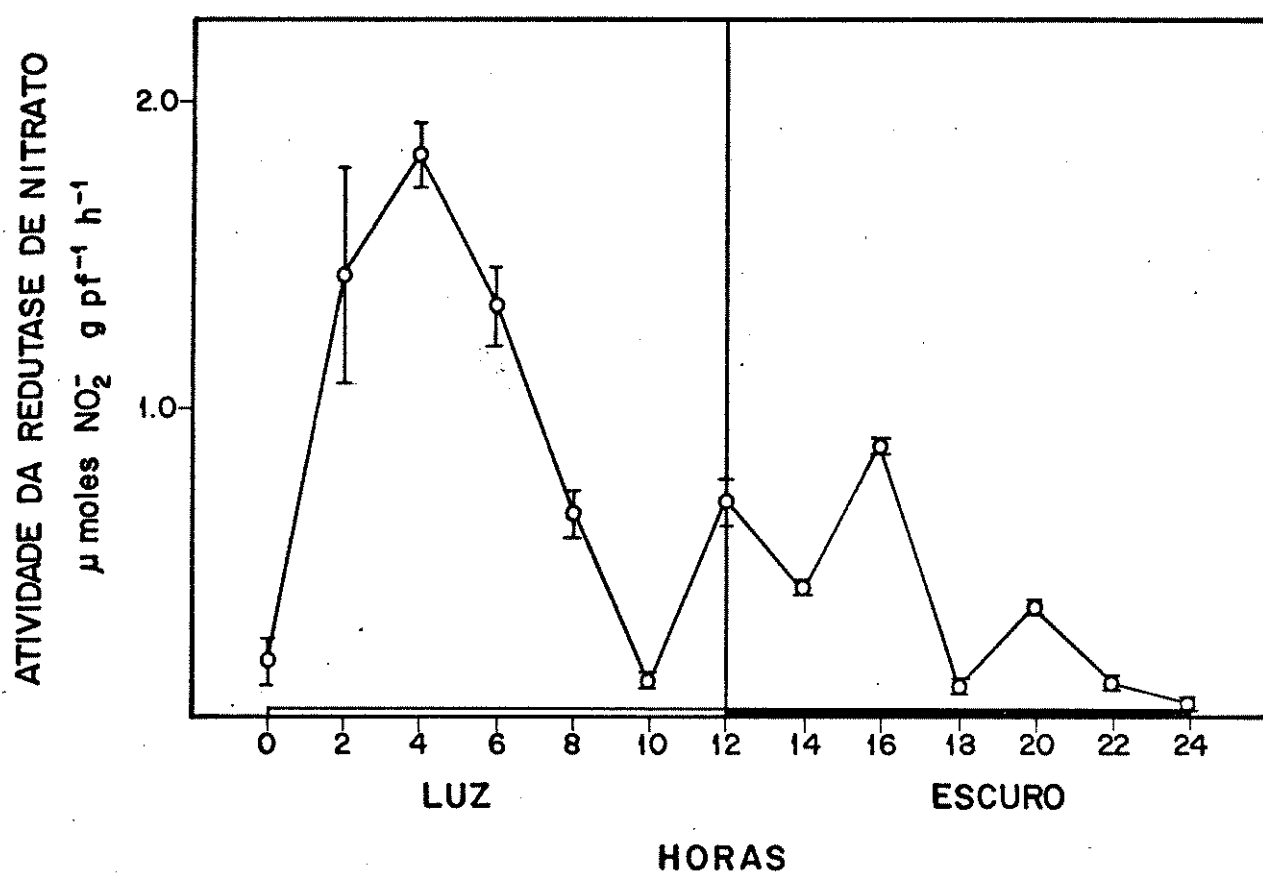


Figura 2. Atividade da enzima, redutase de nitrato *in vivo* em folhas de aguapé durante o período de luz e escuro em ambiente controlado. Condições do meio de incubação : 0,1 M KNO_3 ; pH 7,0; temperatura do banho maria 33°C . Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.



4.1.3. Efeito da concentração do Nitrato no meio da incubação

A atividade de Redutase de Nitrato, *in vivo*, cresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrato de potássio adicionado ao meio de incubação, atingindo um máximo ao redor de 0,1 M de KNO_3 . O aumento da concentração de nitrato acima de 0,1 M provocou uma queda da atividade até 0,2 M, e a partir desta concentração permaneceu constante até 0,4 M (Figura 3). Esses resultados foram utilizados para definir a concentração de nitrato no meio de incubação nos experimentos posteriores de determinação da atividade enzimática.

4.1.4. Efeito do tempo de reação

Os valores mostrados na Figura 4 indicam que a formação de produto (NO_2^-) aumentou durante o tempo de incubação em banho-maria com agitação, apresentando um padrão aproximadamente linear durante o período de 15 a 60 minutos.

Visando a padronização do método, foi estabelecida a retirada de alíquotas para a determinação da concentração de nitrrito no meio, após 15 e 45 minutos de reação.

4.1.5. Efeito do pH

O efeito da variação do pH do tampão fosfato no meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato, *in vivo*, é mostrado na Figura 5. Foi verificado que o pH apropriado para o ensaio da enzima situa-se ao redor do valor 7,0, embora a atividade não mostrasse grande variação na faixa entre 6 a 7,5.

4.1.6. Efeito da temperatura do meio de reação

Dentro do intervalo de temperatura utilizado no experi-

Figura 3. Efeito da concentração do substrato na atividade *in vivo* da redutase de nitrato em folhas de aguapé. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

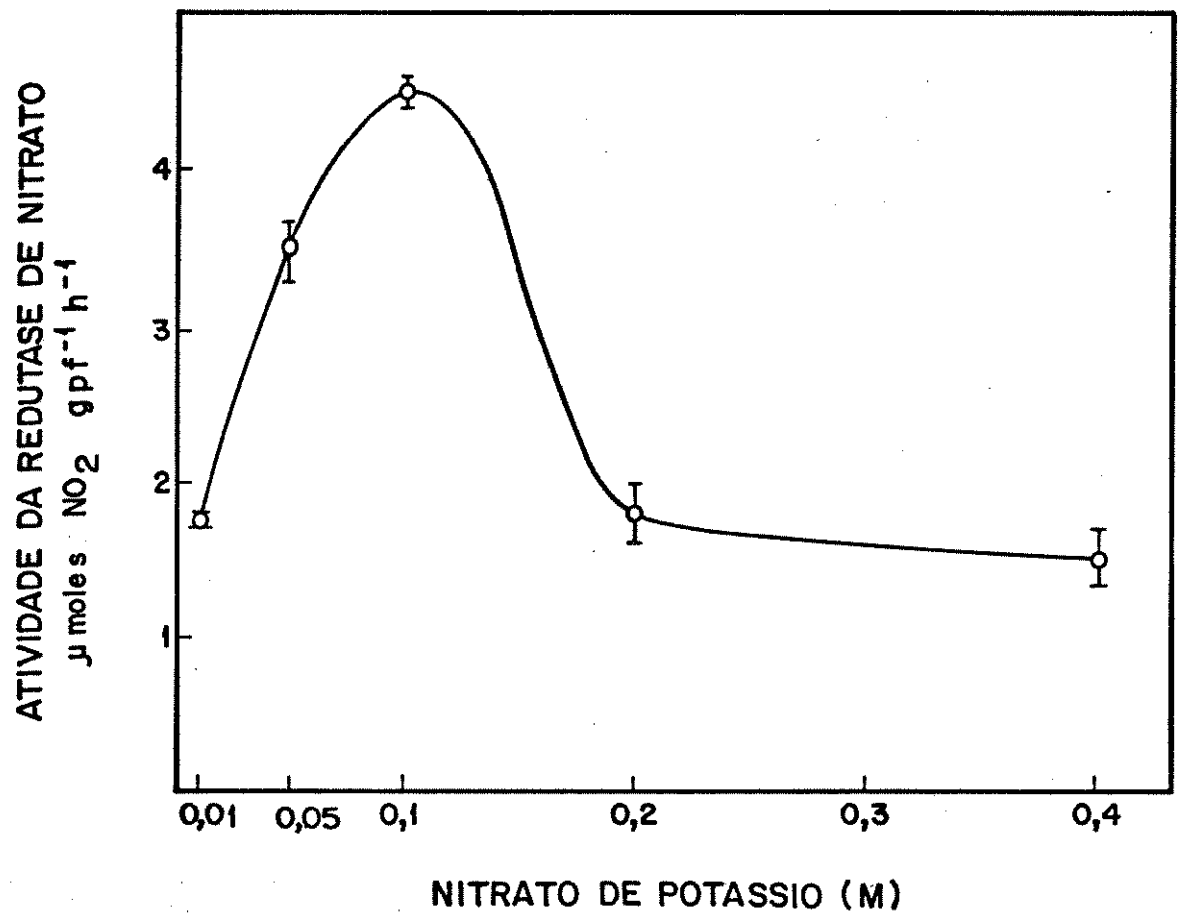


Figura 4. Efeito do tempo de reação na formação do produto nitrito em folhas de aguapé. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

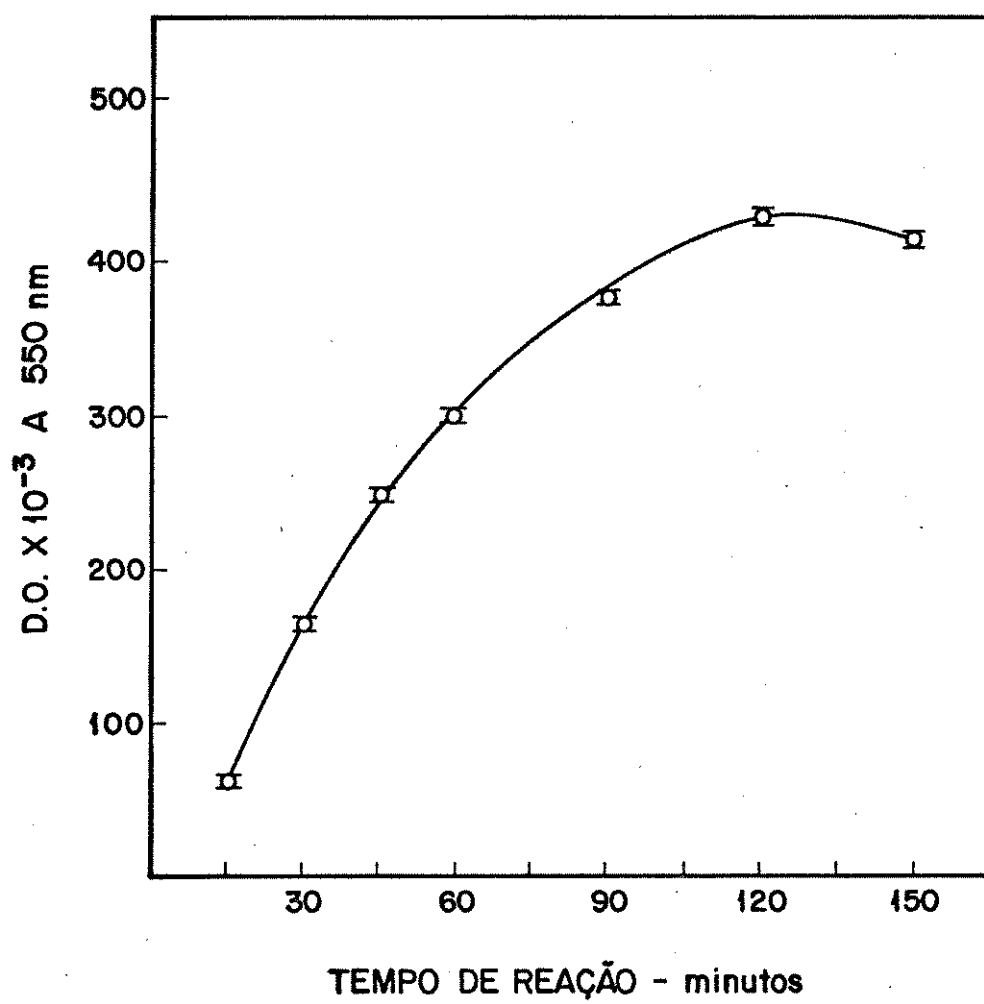


Figura 5. Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo* em folhas de aguapé. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

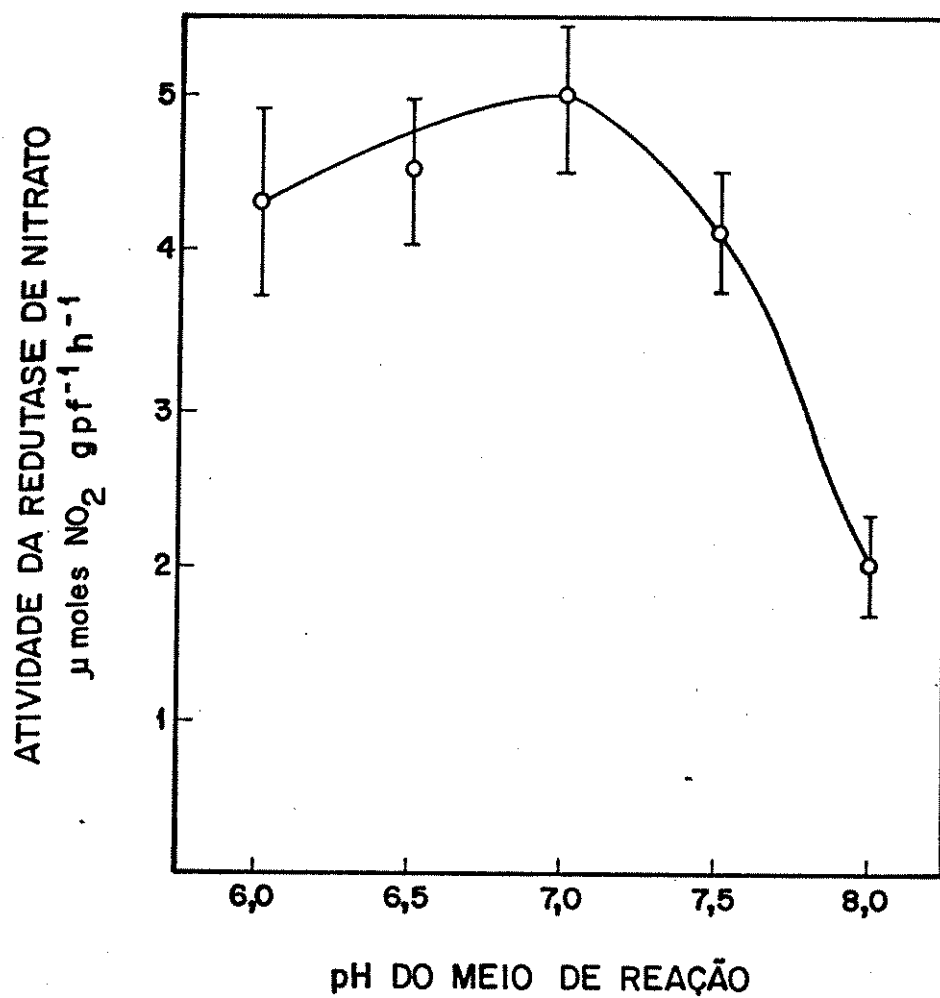
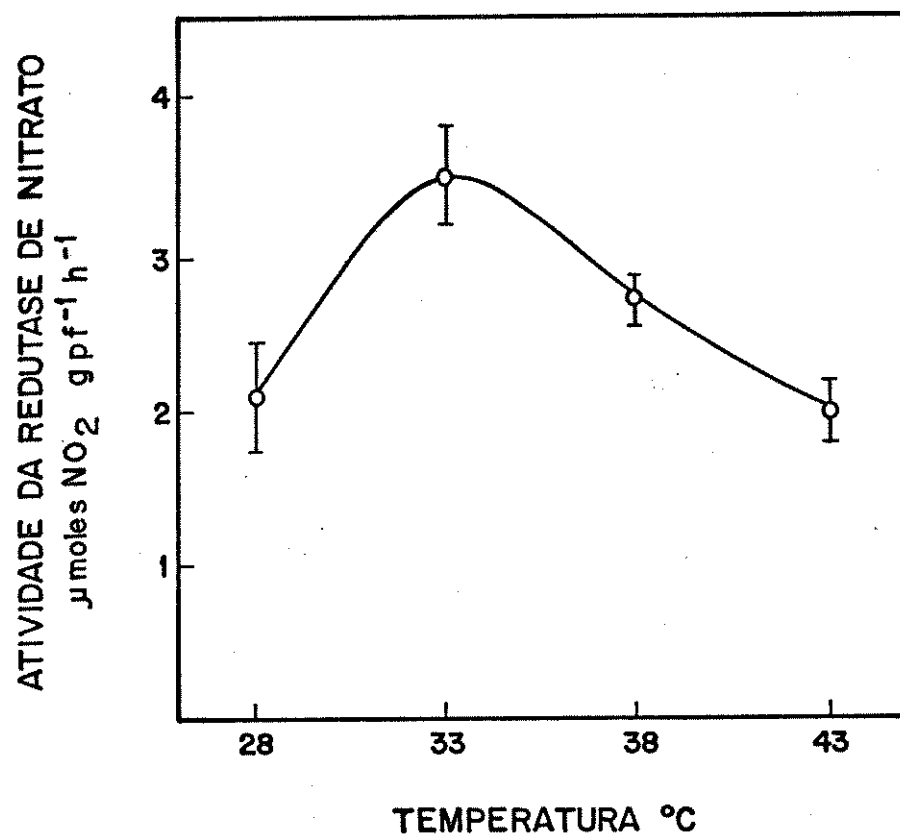


Figura 6. Efeito da temperatura no meio de incubação sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato em folhas de aguapê. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.



mento, foi observado que a atividade da Redutase de Nitrato, aumentou com a elevação da temperatura do meio de incubação até 33°C, caindo a seguir (Figura 6).

Os ensaios posteriores foram conduzidos rotineiramente a 33°C no meio de reação.

4.2. Influência de Diferentes Temperaturas no meio Radicular e na Parte Aérea sobre a Atividade da Redutase de Nitrato nas Folhas.

Os experimentos foram conduzidos de modo a investigar o efeito da temperatura do ar e do meio radicular sobre a atividade enzimática induzida pela exposição das plantas à luz.

A seqüência experimental incluiu combinações de temperaturas constantes do ar associadas a temperaturas variáveis das raízes, com amplitudes de 5 e 10°C entre as duas temperaturas, além do tratamento de temperaturas iguais do ar e do ambiente radicular durante o período de 5 horas de exposição.

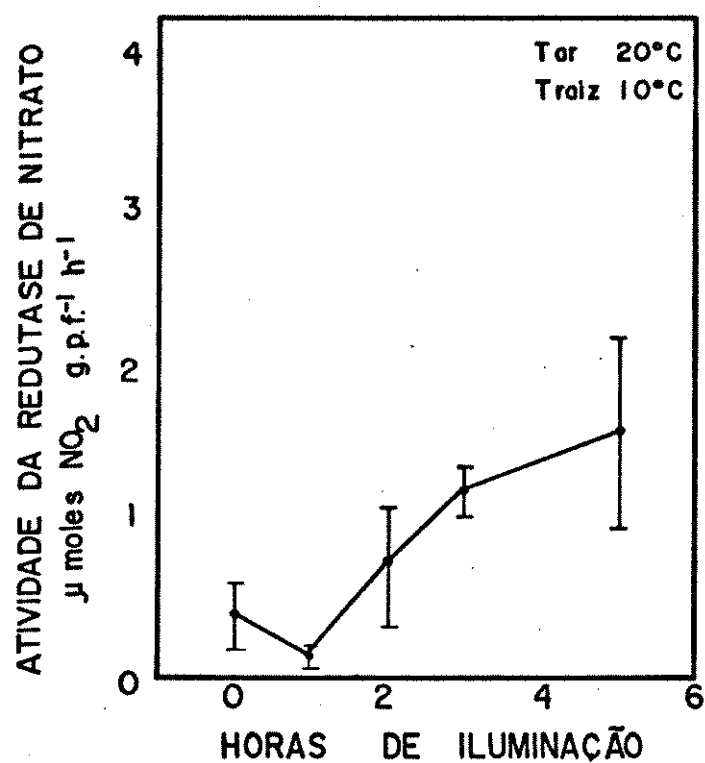
Assim, sob condições de 20°C no ar e temperaturas de 10, 15 ou 20°C nas raízes observou-se que a atividade da enzima aumentou com o acréscimo na temperatura das raízes (Figura 7a, b, c).

Utilizando temperatura do ar de 25°C, e das raízes de 15, 20 ou 25°C (Figura 8a, b, c), foi observado a mesma tendência na atividade da Redutase de Nitrato, ou seja, conforme a temperatura do meio das raízes se aproxima da temperatura da parte aérea, a atividade da enzima também é maior.

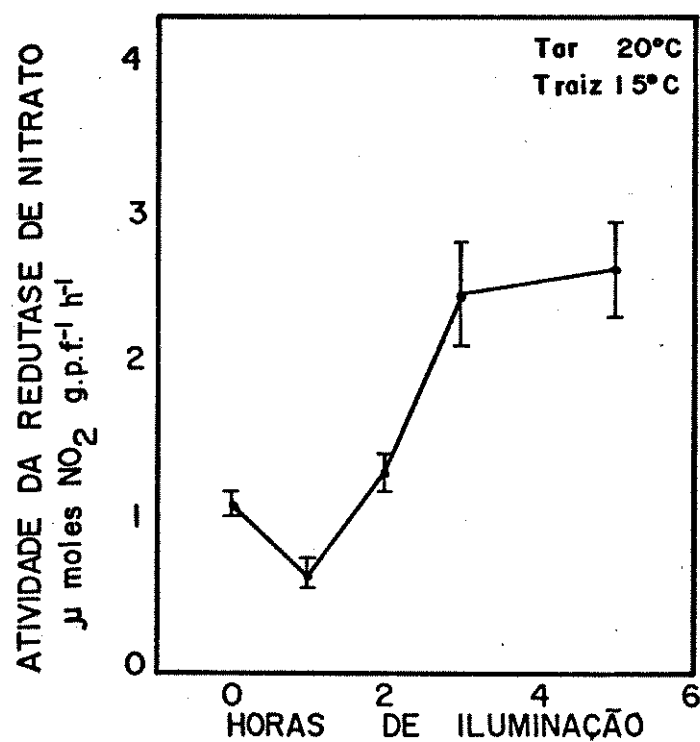
Porém, esse padrão não foi obtido quando a temperatura do ar foi mantida constante em 30°C e a temperatura das raízes variou entre 20, 25 e 30°C, verificando-se que o padrão da atividade enzimática foi diferente dos tratamentos anteriores, principalmente no que se refere à queda da atividade, quando as temperaturas do meio das raízes aumentaram até igualar a temperatura do ar (Figura 9a, b, c).

Figura 7. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé. Planta adulta (30 dias). A temperatura do ar é constante à 20°C e cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

a



b



c

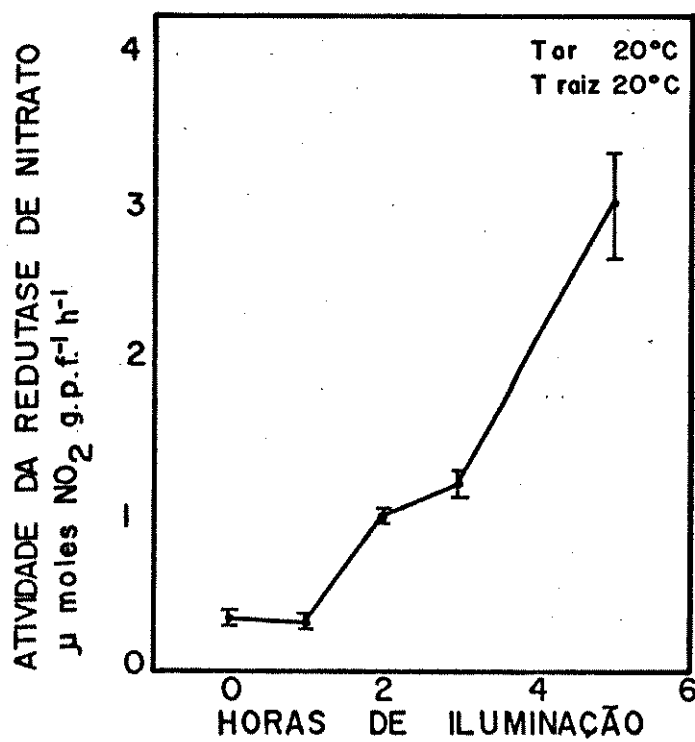
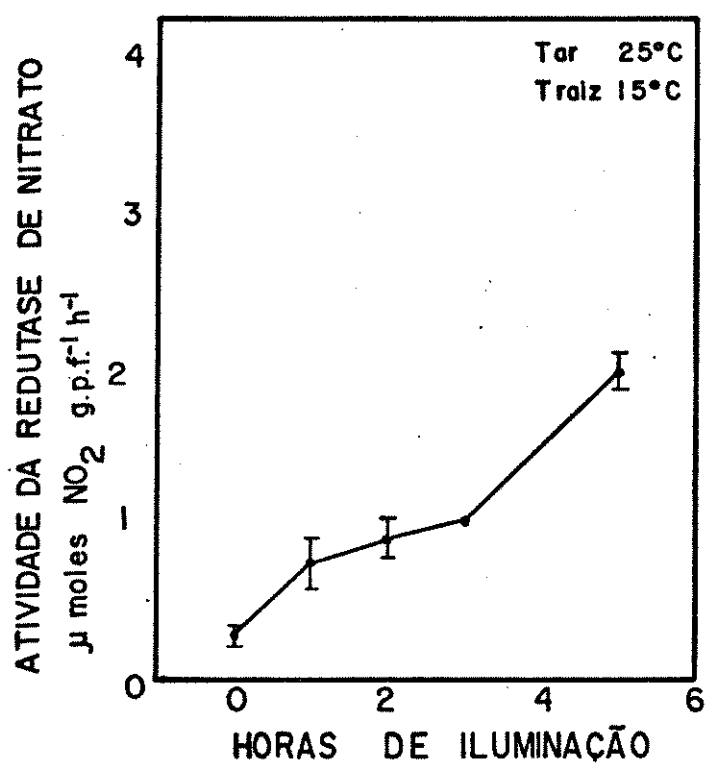
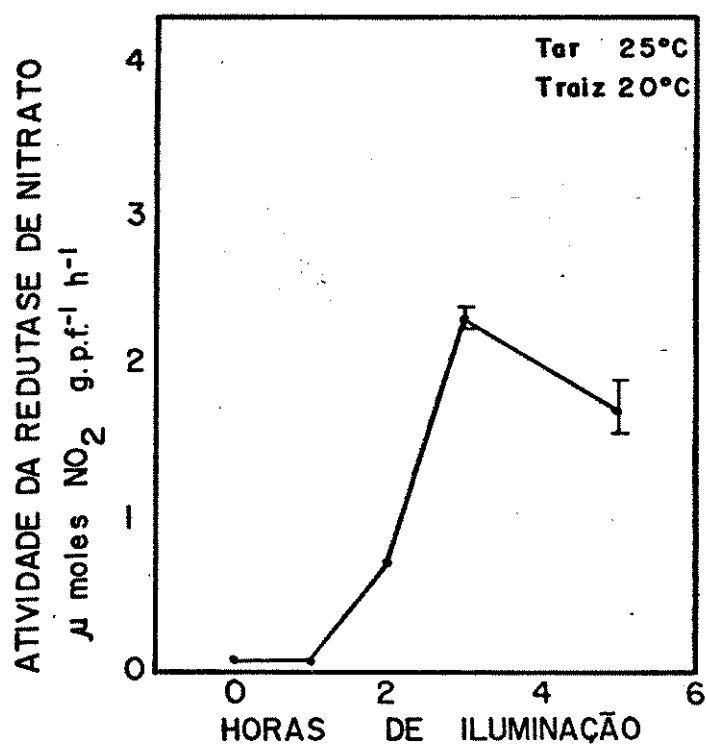


Figura 8. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé. Planta adulta (30 dias). A temperatura do ar é constante à 25°C. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

a



b



c

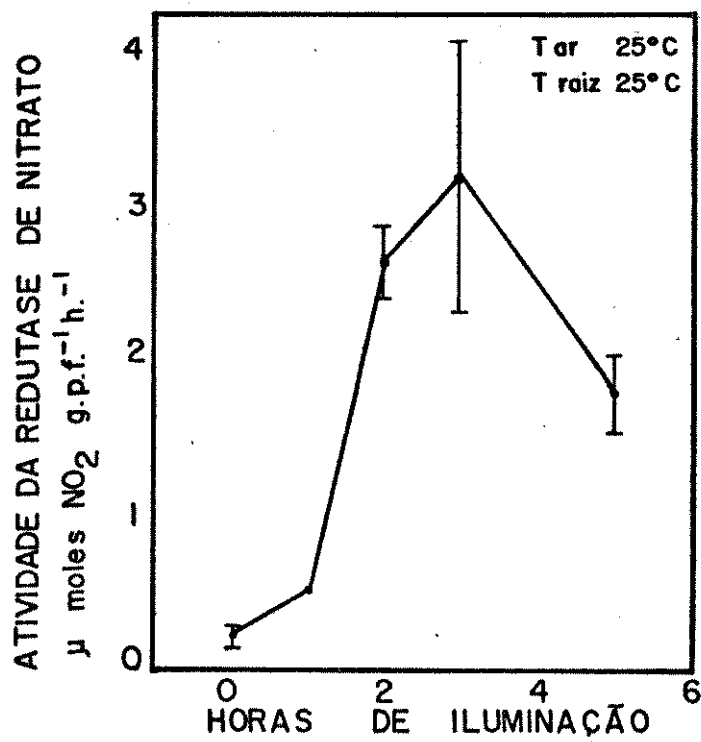
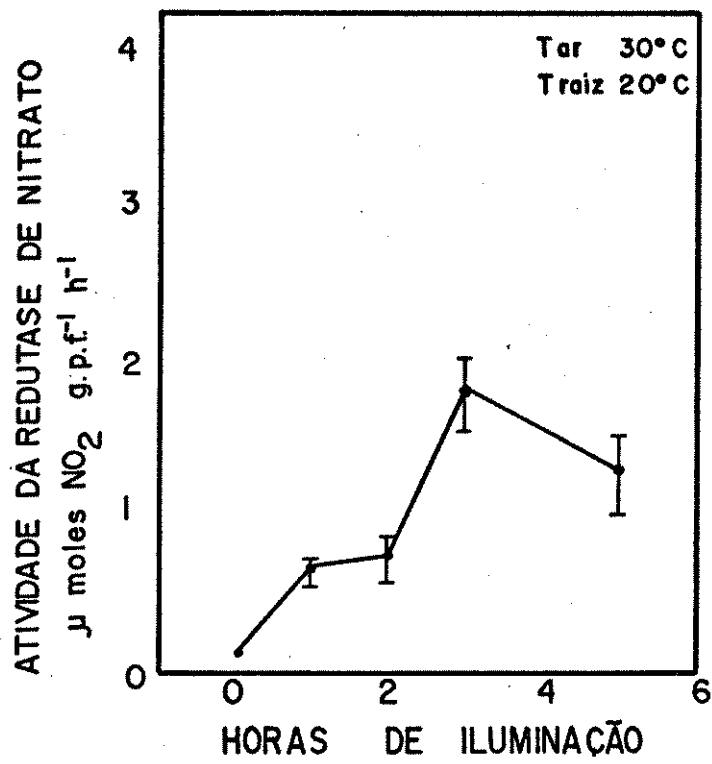
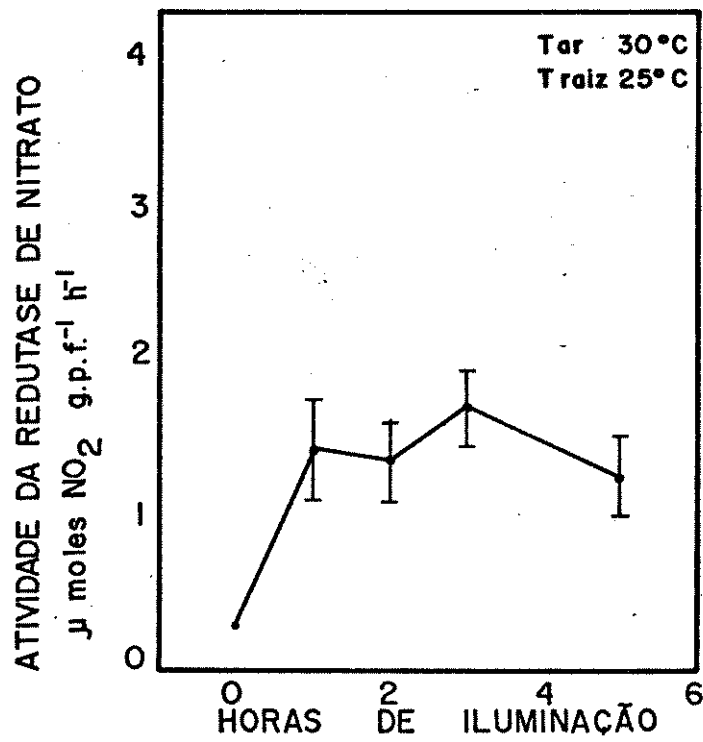


Figura 9. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé. Planta adulta (30 dias). A temperatura do ar é constante à 30°C. Cada ponto representa a média de três repetições e o erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

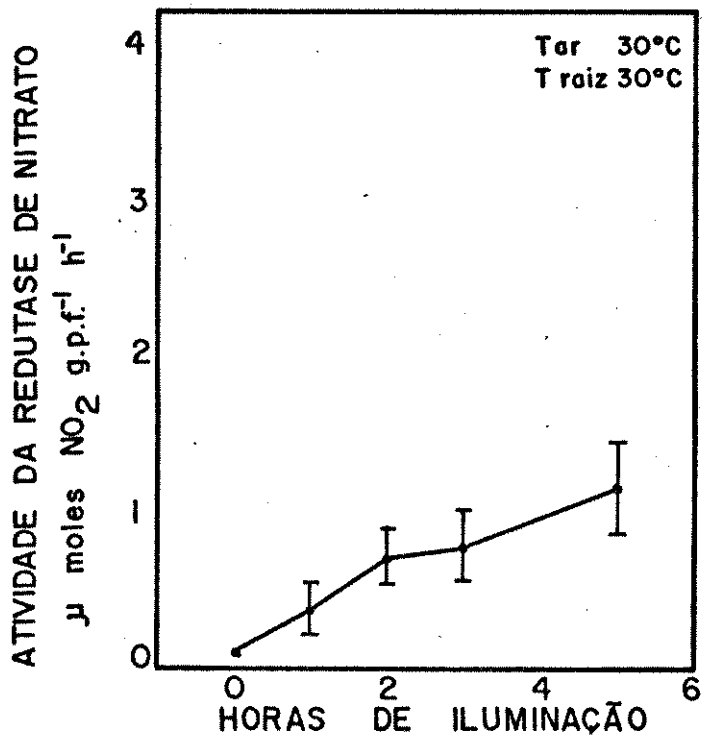
a



b



c



Considerando que a temperatura de 25°C no ar mostrou atividade enzimática mais alta, em todas as temperaturas das raízes investigadas, foi planejado outro grupo de experimentos objetivando estudar o efeito da temperatura do meio radicular sobre a atividade da Redutase de Nitrato, nas partes aéreas e nas raízes.

Os resultados obtidos nas comparações entre atividades na folha e raiz sob condições de 25°C no ar (Figura 10 e 11a, b, c) indicam uma certa consistência com o experimento prévio, pois, da mesma forma, conforme houve uma proximidade entre as temperaturas da água e do ar, ocorreu o aumento da atividade enzimática tanto nas folhas quanto nas raízes.

Analisando os valores incluídos nas Figuras 12 pode-se observar que as atividades médias, para cada conjunto de condições de temperatura apresentam uma interação complexa entre os efeitos da temperatura do ar e os da temperatura da raiz. Sob condições de 20°C no ar, a baixa temperatura nas raízes, (10°C), está associada a uma baixa atividade média e uma atividade maior ocorre em temperatura do ar igual a 20°C . De uma forma geral, a atividade média nas folhas aumenta com elevação da temperatura na raiz, porém, a análise da regressão da atividade média contra temperatura da raiz não foi significativa ao nível de 5% ($b = 0.204$ $P = 0.0737$). Esse resultado parece ser devido a queda da atividade máxima entre 15 e 20°C da temperatura na raiz.

Em temperatura de 25°C no ar, a relação entre atividade média nas folhas e a temperatura na raiz foi mais clara (Figura 12), e a regressão foi altamente significativa ($b = 0.579$, $P < 0,001$).

O tratamento com 30°C no ar mostrou a ocorrência de uma queda significativa na atividade média nas folhas, nas temperaturas de 25 a 30°C na raiz (Figura 12). Essa queda fez com que a relação geral entre atividade média nas folhas e temperatura na raiz fosse negativa ($b = - 0.189$, $P = 0.0508$) em temperatura do ar de 30°C , embora a regressão não tenha sido significativa.

Figura 10. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vi*
vo da redutase de nitrato nas folhas de aguapé. Plan-
ta jovem (20 dias). A temperatura do ar é constante
à 25°C. Cada ponto representa a média de três repeti-
ções e o erro padrão é indicado acima e abaixo de ca-
da ponto.

Figura 11. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in vi*
vo da redutase de nitrato nas raízes de aguapé. A tem-
peratura do ar é constante à 25°C. Cada ponto repre-
senta a média de três repetições e o erro padrão é in-
dicado acima e abaixo de cada ponto.

FIGURA 10

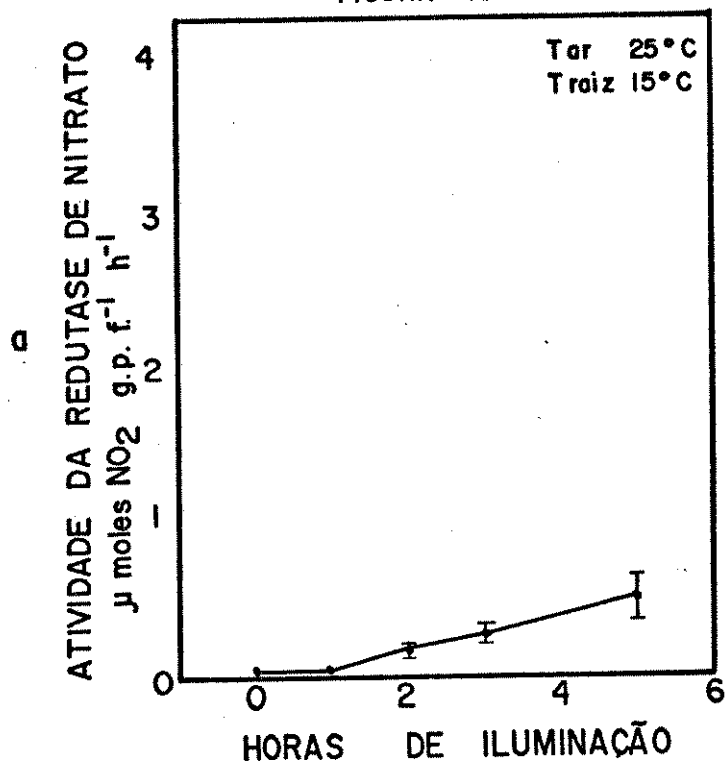


FIGURA 11

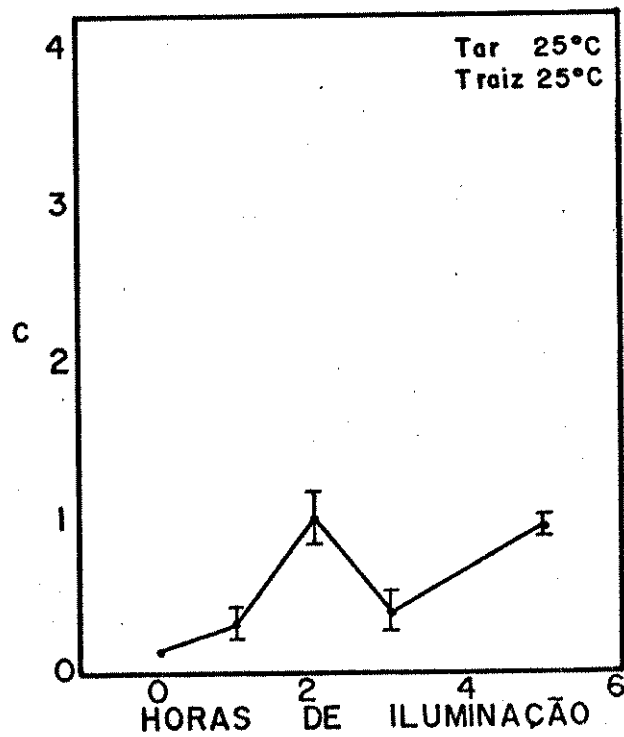
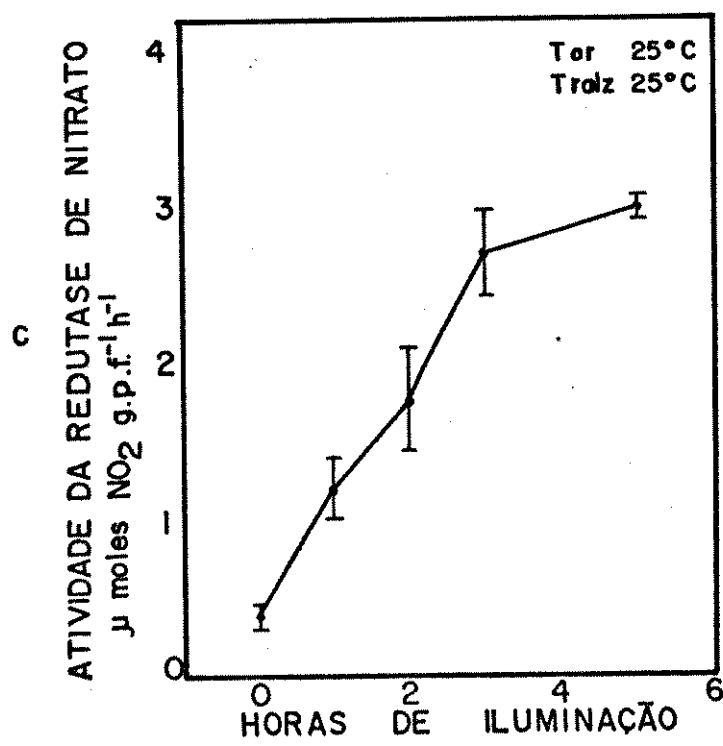
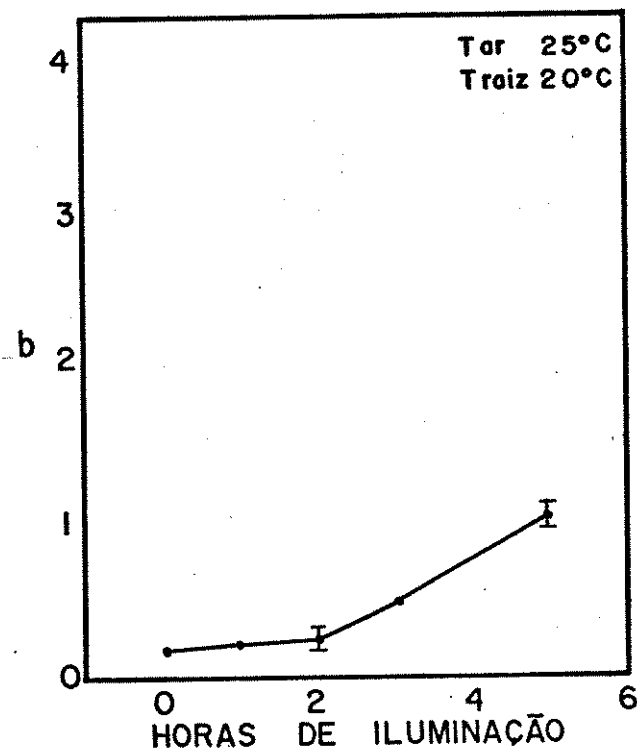
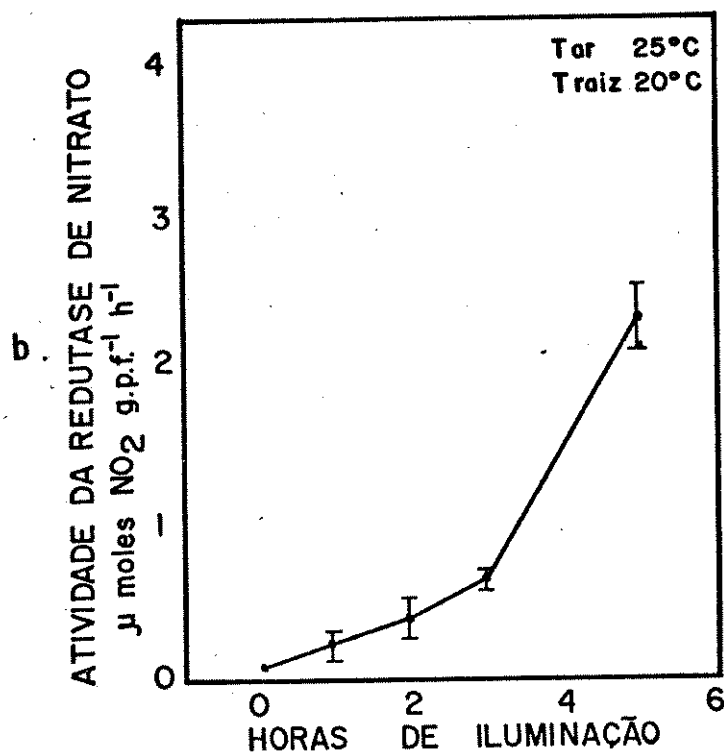
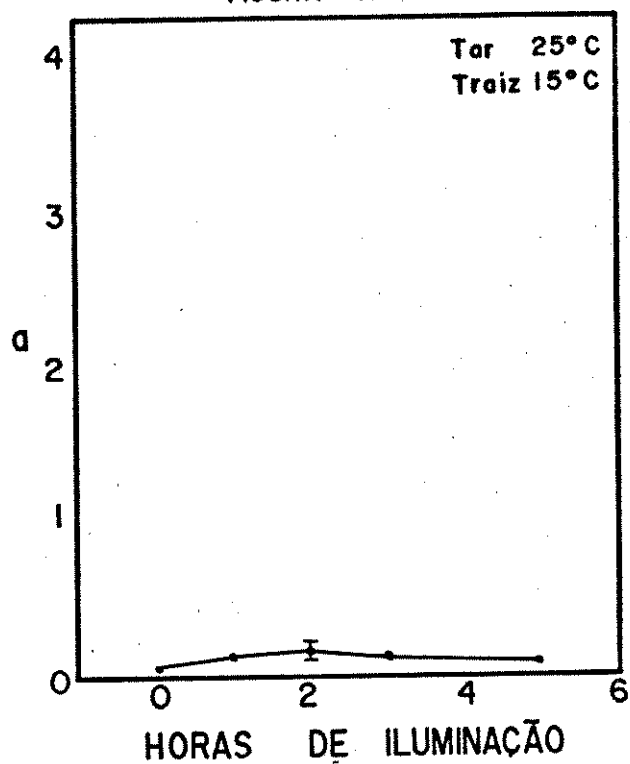
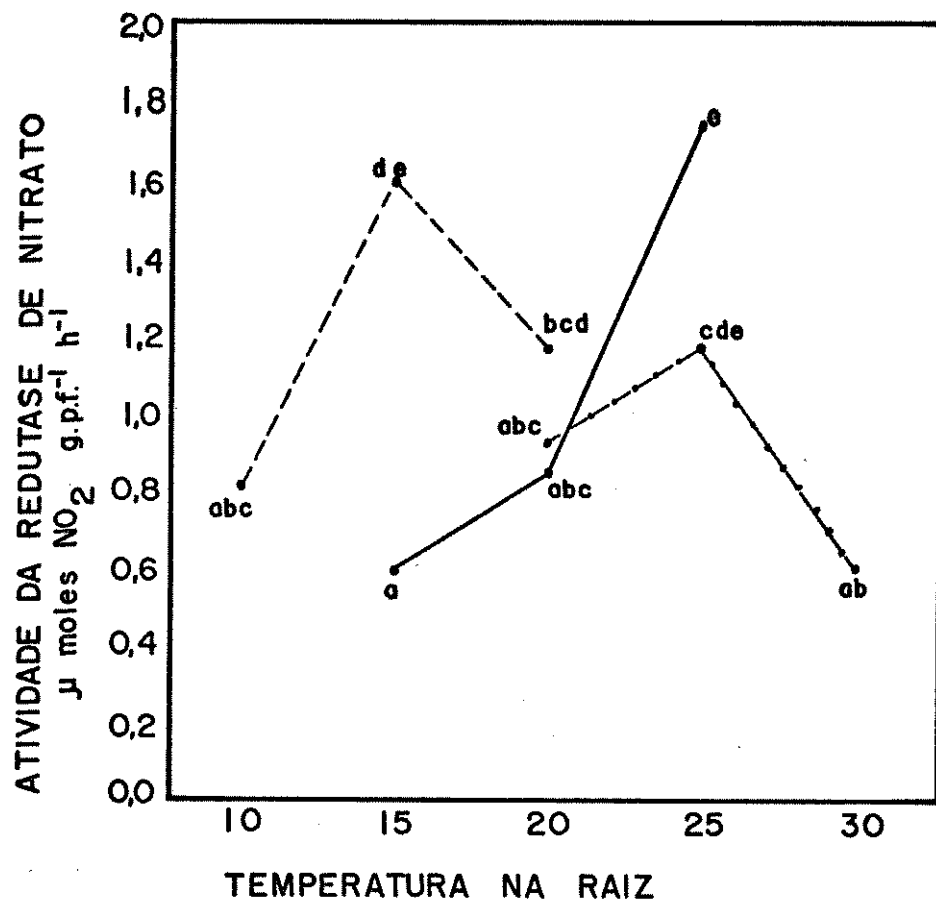


Figura 12. Efeito da temperatura da raiz sobre a atividade *in ví*vo da redutase de nitrato nas folhas de aguapé dentro de cada conjunto de temperatura do ar. Cada ponto representa a média de três repetições para os conjuntos de 20°C e 30°C e de seis repetições para o conjunto de 25°C do ar.

(- - - - $T_{ar}=20^{\circ}\text{C}$; — $T_{ar}=25^{\circ}\text{C}$; -.-.- $T_{ar}=30^{\circ}\text{C}$).

Os resultados do teste SNK estão apresentados com letras em cada ponto. Dois pontos que não tenham letras em comum são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.



33

A dependência da atividade média nas folhas sobre a temperatura da raiz é significativa (Figura 13). No intervalo compreendido entre 10 e 25°C verificou-se um aumento da atividade da Redutase de Nitrato na folha com o aumento da temperatura da raiz, e também, uma queda marcante entre 25°C e 30°C (Figura 13).

A tendência da atividade enzimática aumentar entre 10 e 25°C é indicada pela regressão onde se verifica a existência de uma relação positiva e significativa entre a atividade e temperatura na raiz para a faixa de temperaturas de 10°C à 30°C ($b = 0.293$, $P < 0.001$).

A queda entre 25 e 30°C também é significativa segundo as análises de variância e de GT-2 (Figura 13). O efeito da temperatura (T_{ar}) sobre a atividade da Redutase de Nitrato também foi significativa (Figura 13). A relação é linear e negativa com a temperatura do ar ($b_{ar} = -0.411$, $P < 0.001$).

Outra maneira de verificar os efeitos da temperatura é examinar o efeito da diferença entre a temperatura do ar e temperatura da raiz, ou seja ΔT . O efeito de ΔT na atividade média da Redutase de Nitrato nas folhas também foi linear e significativa (Figura 14), observando-se uma relação negativa com ΔT ($b = -0.294$, $P < 0.001$).

Um outro aspecto a ser considerado é a análise da atividade máxima em cada conjunto de condições de temperatura. Os efeitos da temperatura da raiz sobre as atividades máximas da enzima foram consistentes com algumas das relações encontradas nas análises de temperatura média, porém, de uma forma geral, estes efeitos nas atividades máximas não foram significativos. (Figura 15). Tal fato pode ter sido devido ao pequeno número de amostras utilizadas nestas análises. A curva que mostrou significância (25°C no ar) é a curva na qual cada ponto representa uma média de seis medidas, enquanto nas outras duas, cada ponto representa uma média de três medidas.

Figura 13. Efeito da temperatura da raiz na atividade *in vivo* da redutase de nitrato nas folhas de aguapé (——). Efeito da temperatura do ar (- - - -).

Os resultados do teste SNK estão apresentados com letras em cada ponto. Dois pontos que não tenham letras em comum são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

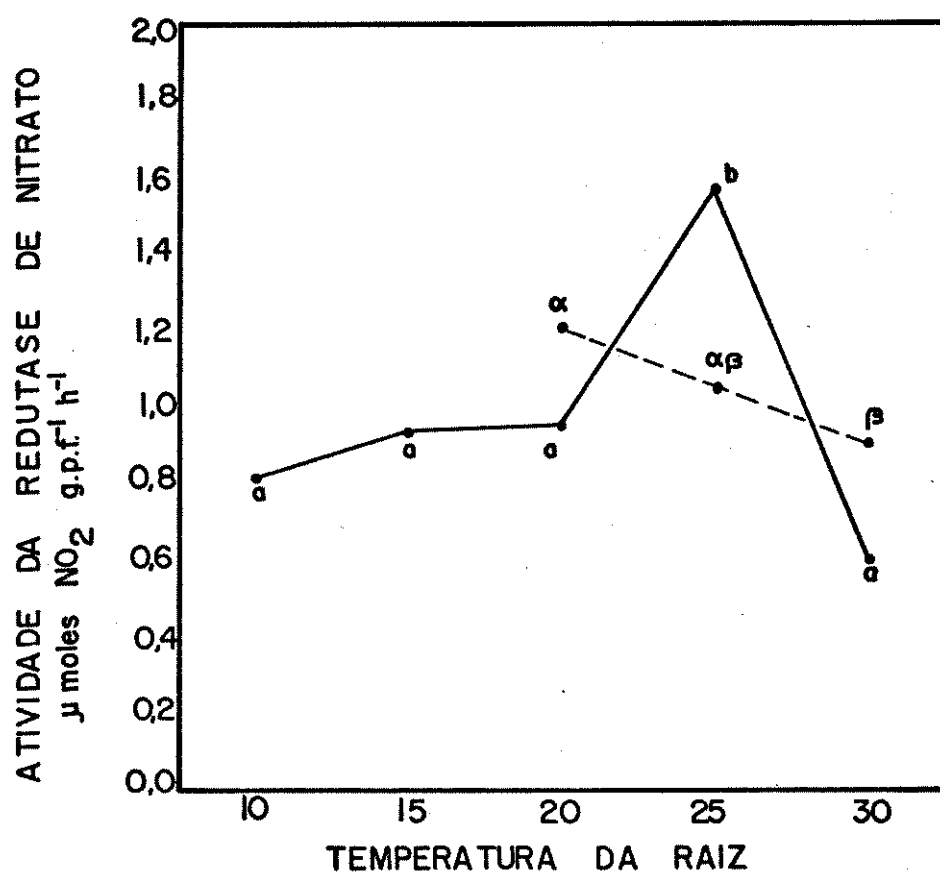


Figura 14. Efeito da diferença de temperatura do ar e da raiz na atividade média da redutase de nitrato nas folhas de aguapé.

Os resultados do teste SNK estão apresentados com letras em cada ponto. Dois pontos que não tenham letras em comum são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.

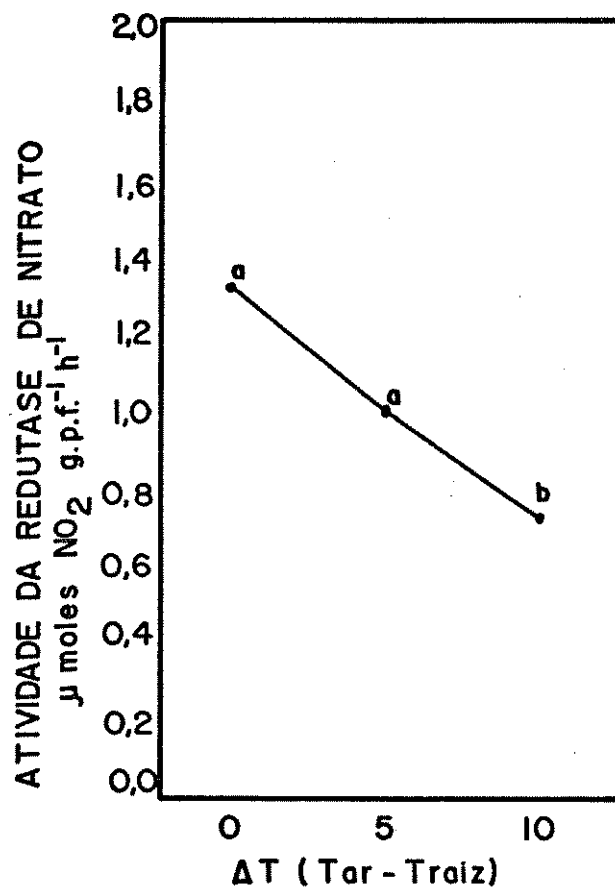
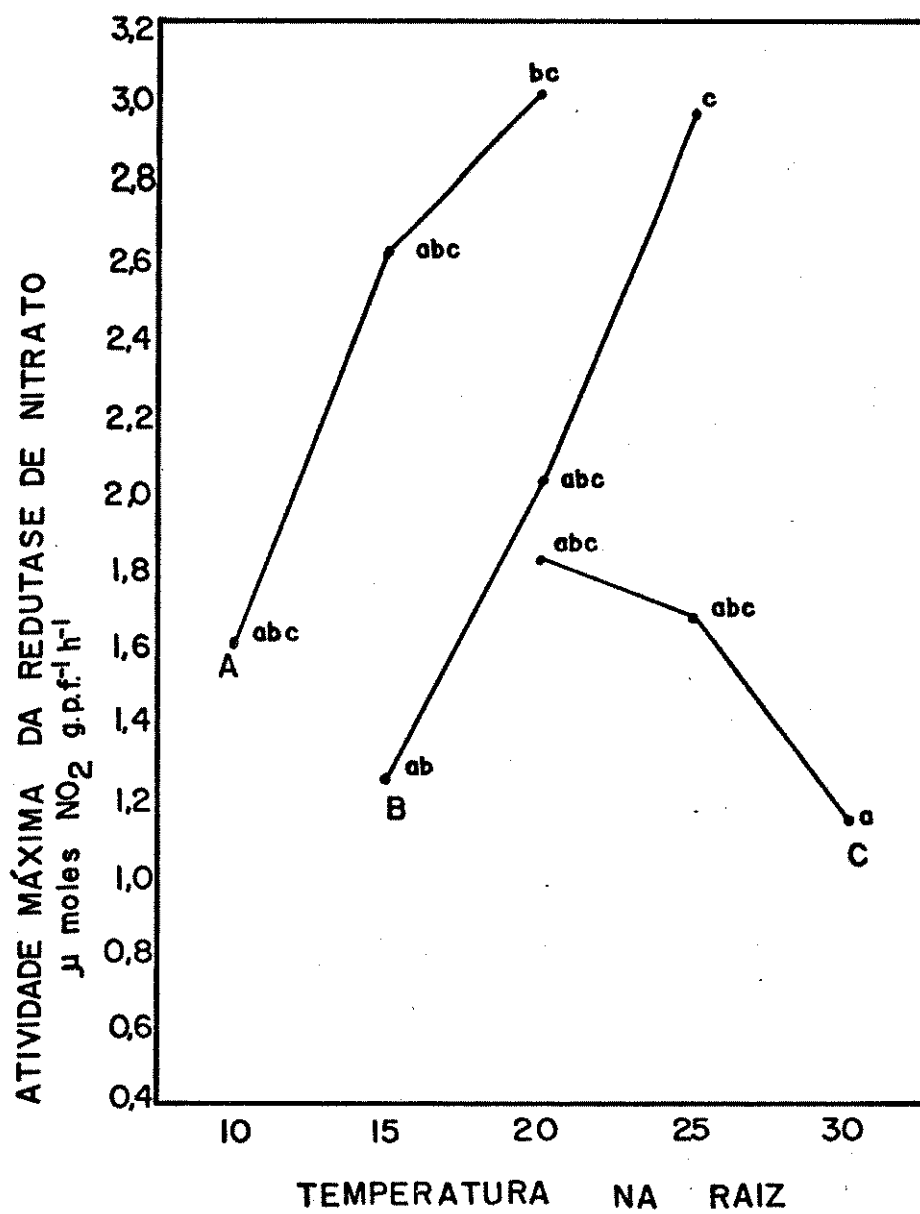


Figura 15. Efeito da temperatura da raiz na atividade máxima da redutase de nitrato nas folhas de aguapé nos três conjuntos de temperatura (A - 20°C no ar; B - 25°C no ar; C - 30°C no ar).

Os resultados do teste SNK estão apresentados com letras em cada ponto. Dois pontos que não tenham letras em comum são estatisticamente diferentes ao nível de 5%.



Apesar de que duas das três regressões não foram significativas, uma comparação entre os três coeficientes mostrou que, usando o teste SNK, a curva para 30°C no ar é diferente das outras, e que estas (20°C e 25°C no ar) não diferem entre si (Figura 15).

4.3. Concentração do Íon Nitrato

Os dados referentes a concentração do íon nitrato estão representados nas Figuras 16, 17, 18 e 19. No regime de 20°C no ar, a concentração do íon nitrato na parte aérea apresentou variações, com valores entre 5 e 17 μ moles por grama de peso fresco (Figura 16a, b, e c). Da mesma forma, no regime de 30°C no ar os níveis do íon nitrato também foram bastante variáveis (Figura 18a, b e c), com valores entre 5 e 24 μ moles por grama de peso fresco.

Por outro lado, no regime de 25°C, houve uma menor variação no conteúdo do nitrato durante o período de iluminação, sendo que ocorreu um aumento proporcional conforme a temperatura das raízes se situou próxima da temperatura do ar (Figura 17 a, b, c).

Conforme ilustrado na Figura 19a, o conteúdo do íon nitrato foi relativamente maior na parte radicular do que na parte aérea, situou-se em valores próximos em temperatura do ar de 25°C e 20°C na raiz (Figura 19b), e ficou ligeiramente abaixo quando a temperatura do ar e raiz foi de 25°C (Figura 19c).

De uma maneira geral, ocorreu uma falta de correlação entre a atividade da Redutase de Nitrato e a concentração de nitrato presente nos tecidos foliares e/ou radiculares.

Figura 16. Concentração do íon nitrato no tecido foliar de aguapé. A temperatura do ar é constante à 20°C. O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

Figura 17. Concentração do íon nitrato no foliar de aguapé. A temperatura do ar é constante à 25°C. O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

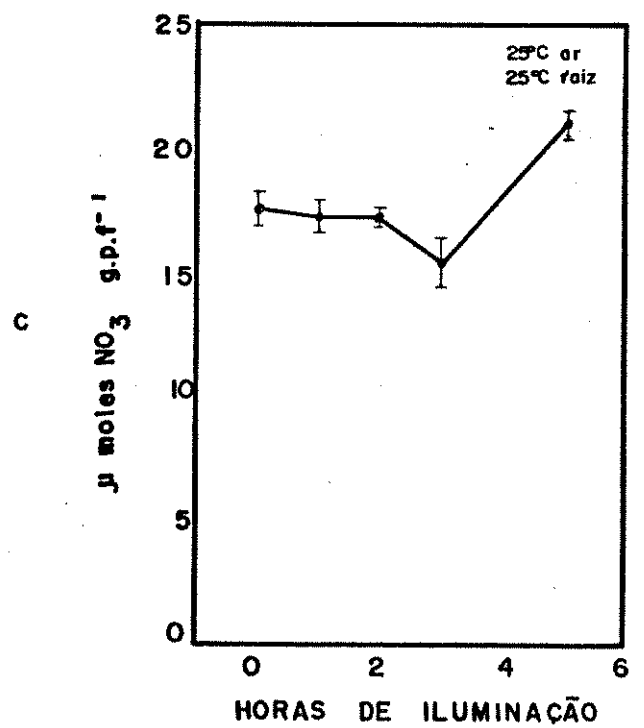
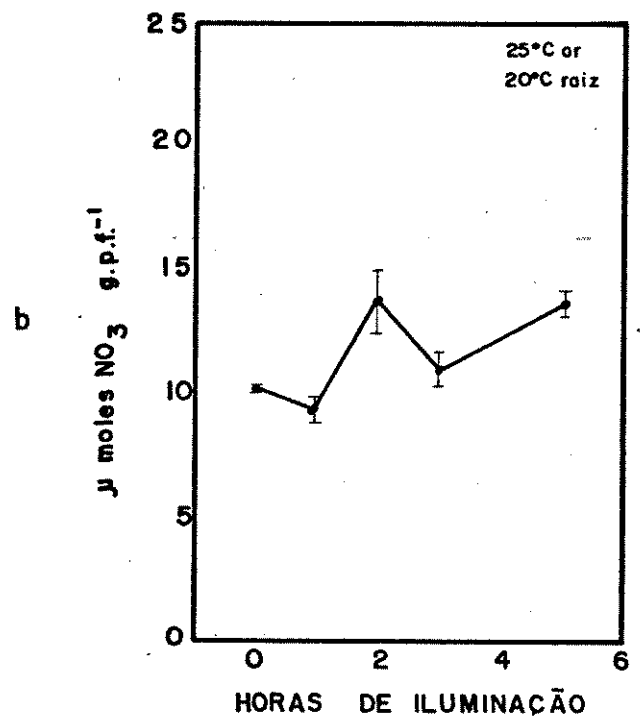
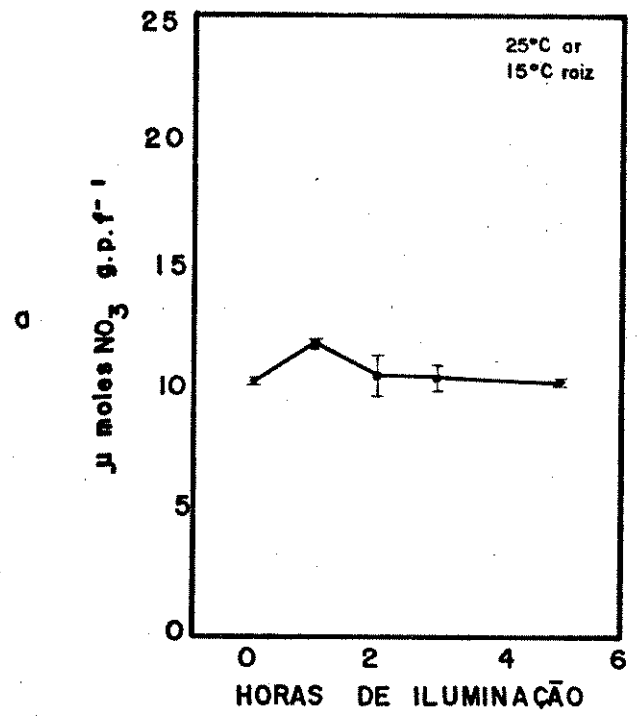
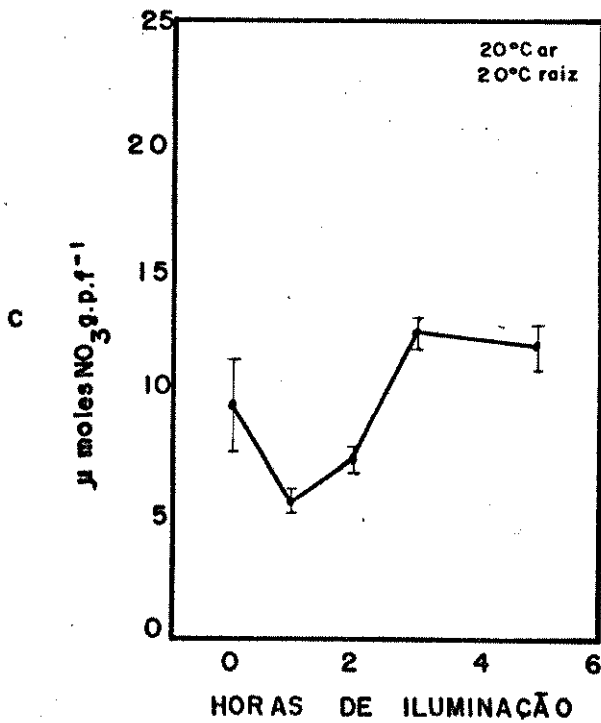
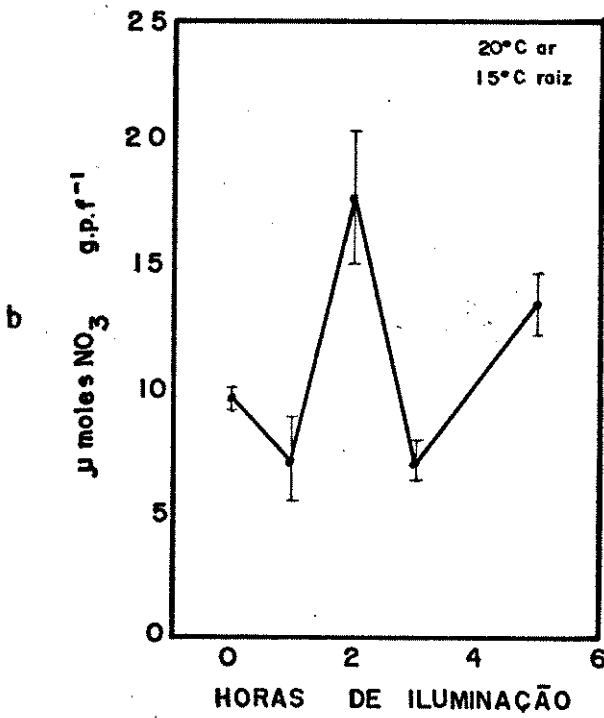
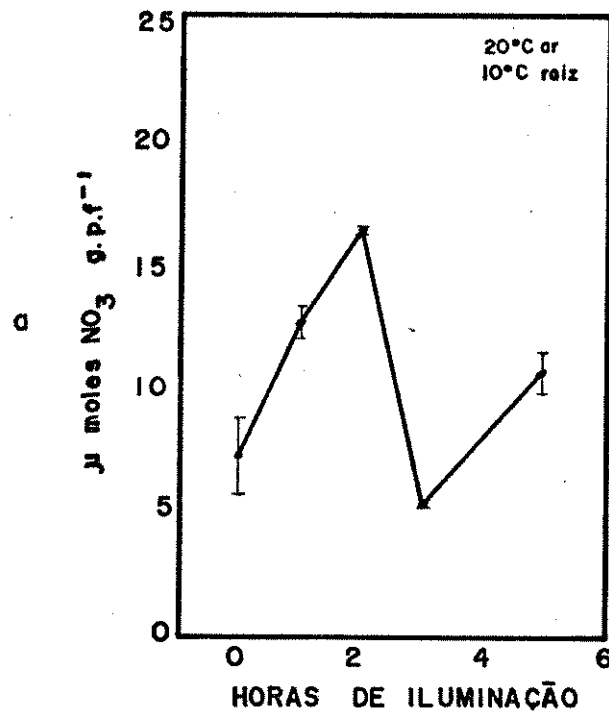


Figura 18. Concentração do Íon nitrato no tecido foliar de aguapê. A temperatura do ar é constante a 30°C . O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

Figura 19. Concentração do Íon nitrato no tecido foliar (—) e radicular (- - -) de aguapê. A temperatura é constante a 25°C . O erro padrão é indicado acima e abaixo de cada ponto.

FIGURA 18

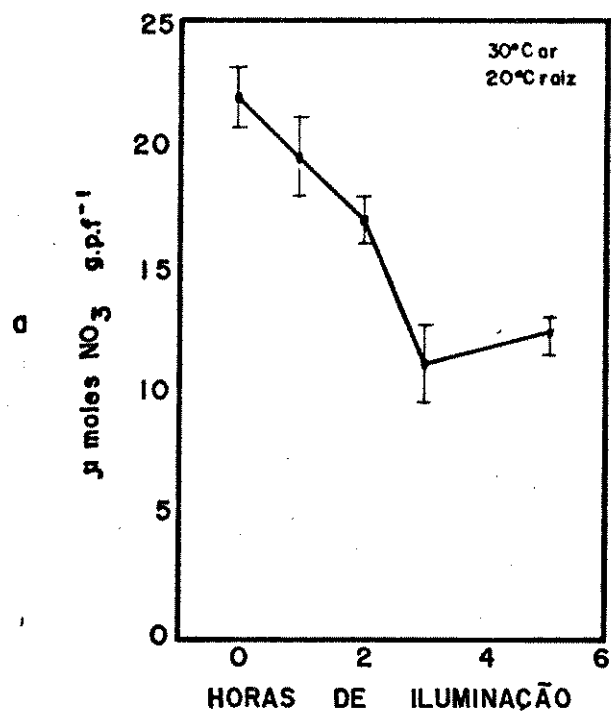
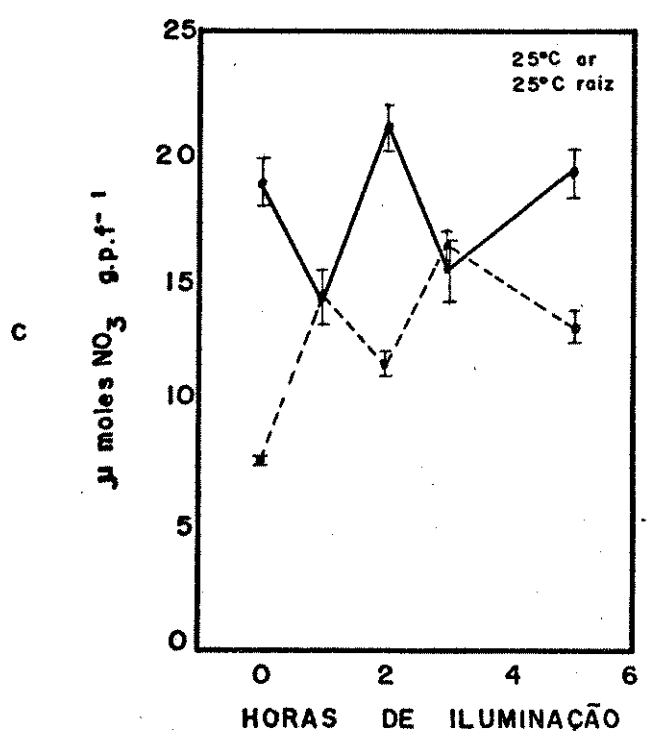
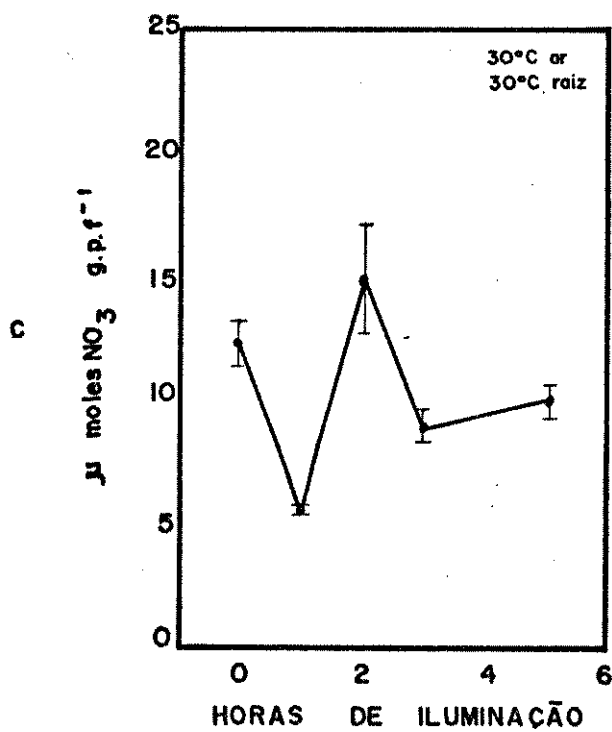
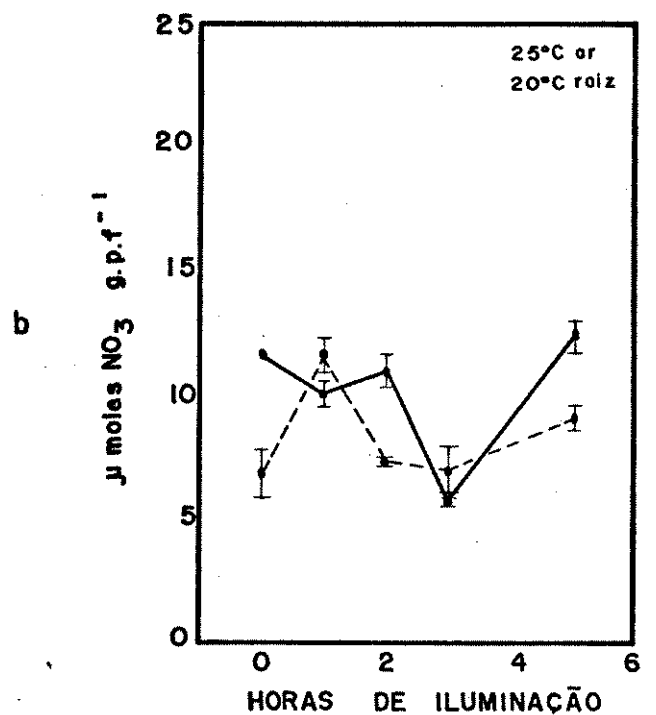
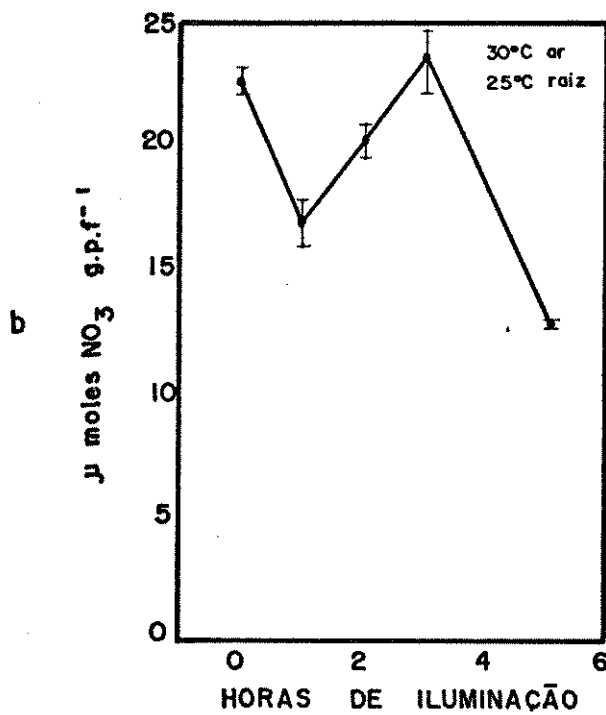
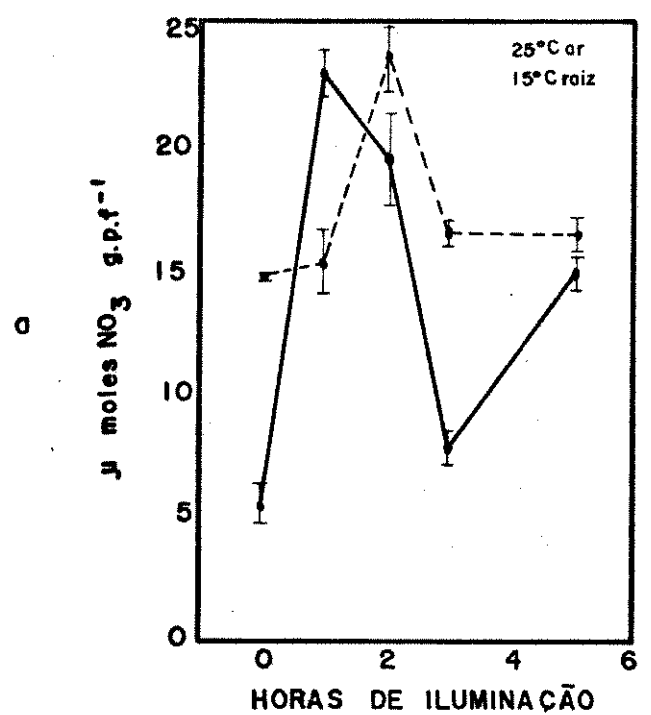


FIGURA 19



5. DISCUSSÃO

O efeito da idade do tecido foliar na atividade da enzima Redutase de Nitrato (Figura 1) mostrou que as folhas totalmente expandidas possuem atividade enzimática mais alta. De acordo com TRAVIS e KEY (1971); JORDAN e HUFFAKER (1972); BILAL e RAINS (1973), as folhas jovens teriam uma habilidade maior para a absorção de nutrientes, fixação de gás carbônico e síntese de proteínas. Em soja, foi verificado que a atividade das folhas é mais alta em folhas totalmente expandidas, decaindo durante as fases antogenéticas posteriores. (HARPER e HAGEMAN, 1972). SRIVASTAVA (1975) observou o mesmo resultado em feijão, e sugeriu que o efeito da diminuição da atividade da Redutase de Nitrato com a idade das plantas poderia estar correlacionado com uma redução da capacidade dos tecidos para sintetizar proteína. Outros autores concluíram favoravelmente a hipótese (INGLE *et al.*, 1966; KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967).

Por outro lado, a descoberta de que a síntese da Redutase de Nitrato é dependente da fotossíntese sugere que a queda na produção da enzima seria consequência de uma limitação da capacidade fotossintética, mais do que uma causa do processo de senescência (KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967). BEEVERS e HAGEMAN (1969) postularam que a baixa atividade da Redutase de Nitrato em folhas mais velhas pode ser atribuída a uma diminuição de doadores de elétrons e ATP fotossinteticamente produzidos.

Outro fator que poderia contribuir para a diminuição da atividade em tecidos mais maduros seria a compartimentação do nitrato utilizado para o processo de incorporação de nitrogênio em nitrogênio α -amino (FERRARI *et al.*, 1973).

O papel da luz na atividade da Redutase de Nitrato levou a sugestões de que a energia luminosa afeta o movimento do íon nitrato do compartimento armazenador inativo para os sítios metabólicos (JONES e SHEARD, 1975; ASLAM *et al.*, 1976). Assim,

na luz, a taxa da enzima é alta, pois existe um influxo contínuo de nitrato que mantém o processo de redução. A indução da "síntese de novo" da Redutase de Nitrato pela luz foi sugerida por BEEVERS e HAGEMAN, 1972. Entretanto, SOLOMONSON e SHEPAR (1977) CARELLI e MAGALHÃES (1981), demonstraram que a ativação da enzima, mais do que a "síntese de novo", é mediada pela luz.

A importância dos compostos originados na fotossíntese como fonte de energia para o processo de redução do nitrato foi enfatizado por BRETELER e TEN CATE (1980).

Conforme ilustrada na Figura 2, a atividade máxima da enzima nas folhas de aguapê ocorreu 4 horas após sua exposição a iluminação. Resultados semelhantes foram obtidos por KLEPPER et al., (1971) em *Chenopodium*, STEVENS e OAKS (1973), com raízes de milho, BAKSHI et al. (1978), em *Wolffia microscópica* e TISCHER e HUTTERMAN (1978) com *Chlorella*.

Os resultados mostrados na Figura 2 indicam que a atividade diminui durante o período de escuro. Esse efeito foi verificado por TRAVIS et al. (1970) em cevada, que demonstrou a presença de uma proteína sintetizada no escuro que inativa a Redutase de Nitrato (TRAVIS et al., 1969). Esta proteína também foi detectada por VIJAYARAGHAVAN (1979) em trigo.

A concentração ótima do substrato no meio da incubação para a atividade da Redutase de Nitrato foi de 0,1 M de nitrato de potássio (Figura 3). A linearidade até a concentração de 0,1 M foi obtida por BEEVERS et al., (1965) em cotilédones de rabanete, porém, ao contrário desses autores, acima dessa concentração houve uma queda acentuada da atividade nas folhas de *Eichhornia* c. Os autores sugerem que o nitrato em excesso no meio de incubação pode limitar a atividade da enzima. TINGEY et al. (1974) demonstraram a perda da atividade da Redutase de Nitrato à concentrações acima de 0,1 M em folhas de soja. Por sua vez, LIN e KAO (1980) trabalhando com folhas de trigo, verificaram que concentrações muito altas de nitrato não penetram no citoplasma e, conseqüentemente, não são disponíveis como substrato.

O efeito do pH na atividade enzimática foi verificado como sendo variável entre as diferentes espécies de plantas. Em folhas de cevada o pH ótimo foi 7,5 (KUO et al., 1980); para folhas de soja foram encontrados dois valores: 6,5 (JOLLY et al., 1976) e 7,5 (NICHOLAS et al., 1976). Em plântulas de arroz, pH 7,4 foi o ideal (SHEN, 1972), enquanto que em *chlorella* a atividade da Redutase de Nitrato foi inibida na faixa de pH de 7,6 e 8,8 (TISCHER e HUTTERMAN, 1978). Parece que, a pH alto, os íons OH^- competem com o nitrato, e a pH muito baixo pode ocorrer dano no tecido (BASSIONI, 1971). Em aguapê em pH alto, para o processo de redução de nitrato foi 7,0 (Figura 5).

As Figuras 7, 8 e 9 ilustram o efeito da temperatura das raízes sobre a atividade da enzima redutase de Nitrato em folhas de aguapê. Os resultados mostraram a existência de um efeito pronunciado da temperatura na atividade da enzima, a qual é inibida pela ação da diminuição da temperatura no ambiente das raízes. Esse efeito poderia ser devido, possivelmente, a limitação do fluxo de nitrato para as folhas e, uma vez que o substrato é essencial para o processo de redução, os efeitos dessa limitação são óbvios. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por SHANER e BOYER (1976a) que, trabalhando com raízes de milho, constataram que é o fluxo do íon nitrato que regula a atividade da enzima, e este é fortemente influenciado pela temperatura.

CHANTAROTWONG (1976) verificou que temperaturas baixas interferem na taxa de absorção iônica, e que a redução, *in vivo*, parece estar mais associada ao processo de absorção de nitrato do que com a quantidade de enzima presente.

Uma alteração na permeabilidade da membrana que ocorreria sob temperaturas baixas, levando a uma difusão maior de íons para o exterior das células, foi sugerido por CAREY e BERRY (1978).

SASAKAWA e YAMAMOTO (1978) constataram a influência da temperatura na absorção do nitrato em plântulas de arroz, e de

mostraram a total inibição da absorção em temperaturas abaixo de 15°C. Nesse trabalho foi verificado que, conforme a temperatura da água se aproxima da temperatura do ar, a atividade enzimática é estimulada provavelmente devido ao aumento da absorção de nitrato (Figuras 7 e 8 a, b, c).

CLARKSON et al. (1979) sugerem que, em condições nas quais a diferença entre a temperatura do ar e a das raízes é muito acentuada é possível que as temperaturas baixas causem retardamento da absorção de nutrientes, como o nitrogênio, de tal maneira que provocará limitações na taxa de crescimento vegetativo.

Efeitos de variação sazonal do crescimento de aguapé, com inibição pronunciada em épocas de ocorrência de temperaturas baixas, tem sido observadas em experimentos de campo e em casa de vegetação (MAGALHÃES comunicação pessoal).

Quando a temperatura do ar foi de 30°C, ocorreu um efeito inverso (Figura 9a, b, c), pois, nesse caso, conforme a temperatura da água se aproximou da temperatura do ar, houve uma diminuição na atividade da enzima. Isso poderia ter ocorrido devido à inativação da enzima, inibição da síntese (KAUFMANN et al., 1971, ou a sua degradação (MORAGHAN e PORTER, 1975; MAGALHÃES, 1976).

NICHOLAS et al. (1976) verificaram que plantas de soja submetidas a altas temperaturas no campo, e mesmo em ambientes controlados, apresentaram uma perda da atividade enzimática mais rápida.

Quando as temperaturas do ar e da água foram iguais a 30°C, a queda da atividade enzimática poderia ter sido causada pela diminuição da disponibilidade de carboidratos e, consequentemente, a limitação de energia metabólica necessária para o processo de redução (TINGEY et al., 1974) e para a absorção ativa de íons.

Os resultados experimentais mostraram que uma diferença de 5 ou 10°C entre a temperatura do ar e do ambiente das raízes (Figura 9 a e b) causou um aumento da atividade da enzima. Esse mesmo efeito foi demonstrado por DRUMMOND et al. (1980) com

raízes de cevada.

A proteção contra a inativação da enzima induzida por temperaturas baixas durante o período de obscuridade foi demonstrada em cevada por ONWEME et al., 1971.

O nitrato pode ser assimilado tanto nas raízes quanto nas folhas (RADIN, 1977), sendo que esta partição de atividades varia entre as diferentes espécies (PATE, 1973). Em aguapê a atividade da Redutase de Nitrato foi detectada nas raízes (Figura 11, a, b, c), porém a atividade nesse órgão foi somente cerca de 30% da atividade determinada nas folhas. Como verificado nos experimentos descritos anteriormente, a atividade da Redutase de Nitrato aumentou conforme a temperatura do ar e da água se estabeleceram em valores próximos. Parece, portanto, que o aguapê reduz a maioria do nitrato em seus tecidos foliares, da mesma forma que *Xanthium* (WALLACE e PATE, 1967); feijão (SRIVASTAVA, 1975) e girassol (KAISER e LEWIS, 1980).

Os dados referentes à concentração do íon nitrato (Figuras 16, 17, 18 e 19) não mostraram correlação com a atividade da Redutase de Nitrato. Essa falta de consistência foi demonstrada por TRAVIS et al., (1969) em cevada; JONES e SHEARD (1975) em ervilha, e SHANER e BOYER (1976a) com milho.

A falta de correlação entre a concentração de nitrato no tecido e a atividade da Redutase de Nitrato parece indicar que a maior parte do nitrato está compartimentalizado no vacúolo e, portanto, não disponível para o processo de redução (SHANER e BOYER, 1976a).

Tem sido demonstrado que as células vegetais podem acumular grandes quantidades de nitrato, independente da atividade da Redutase de Nitrato (HEIMER e FILNER, 1971; FERRARI et al., 1973; ASHLEY et al., 1975; ASLAM et al., 1976; SHANER e BOYER, 1976a). O acúmulo de nitrato no vacúolo do mesófilo em células de cevada foi demonstrado por MARTINOIA et al. (1981).

Talvez a característica já mencionada, de que o aguapê seja uma planta que absorve grandes quantidades de nitrogênio,

encontrado normalmente na forma de nitrato na água pode ser devido ao fato de que ela tem capacidade de acumular o nitrato no seu vacúolo.

As Figuras 12 e 13 ilustram a atividade média da enzima nos três regimes de temperatura do ar, em relação à temperatura da raiz. Como mostrado na Figura 12, quando ocorre aumento progressivo nas temperaturas radiculares a atividade enzimática é estimulada em temperaturas do ar de 20 e 25°C, o mesmo não ocorrendo quando a temperatura foi 30°C.

Os dados da Figura 13 integram todas as médias de todos os dados para cada temperatura da raiz, e o mesmo efeito pode ser constatado. Com relação ao efeito da temperatura do ar pode ser verificado que, a 20°C, a atividade foi mais alta, decrescendo em temperatura de 25 à 30°C.

A Figura 14 ilustra a média de todas as atividades em relação as diferenças de 0, 5 ou 10°C da temperatura das raízes em relação a temperatura do ar. Conforme a temperatura da raiz se aproximou da temperatura do ar a atividade da enzima foi estimulada.

Com relação ao efeito da temperatura na atividade máxima da enzima (Figura 15), observou-se que nos conjuntos de temperatura do ar de 20 e 25°C ocorreu um aumento paralelo na atividade da Redutase de Nitrato em relação as temperaturas radiculares consideradas, o mesmo não ocorrendo com temperatura do ar de 30°C. De acordo com os dados apresentados nas Figuras 14 e 15, que mostram as atividades enzimáticas média e máxima, ficou evidenciada a boa consistência dos resultados analisados estatisticamente.

6. CONCLUSÃO

1. A caracterização da enzima Redutase de Nitrato nas folhas de aguapé apresentou como condições ótimas para sua atividade, as seguintes: concentração de substrato 0,1 M no meio de incubação constituído por n-propanol 1% e tampão fosfato, pH 7,0; temperatura no meio de reação de 33°C; linearidade de reação entre 15 e 45 minutos de incubação. A atividade máxima ocorre após 4 horas de iluminação. As folhas fisiologicamente maduras correspondem à idade de 30 dias após a emergência.

2. Com relação ao efeito da temperatura das raízes sobre a atividade da enzima nas folhas foi constatado que temperatura do ar e raízes com valores próximos de 20 e 25°C, induzem a uma atividade máxima, o mesmo não ocorrendo com temperatura do ar de 30°C.

3. A atividade da enzima nos tecidos radiculares correspondem à cerca de 30% da atividade no tecido foliar.

4. A concentração do íon nitrato no tecido foliar e radicular, não se associa à atividade enzimática, provavelmente porque esse nitrato determinado representa principalmente o conteúdo dos sítios não metabólicos.

O estudo para a avaliação do efeito da temperatura do ar e do ambiente radicular, sobre a atividade da enzima Redutase de Nitrato *in vivo*, foi conduzido usando-se tecidos de folhas e de raízes de aguapé. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em recipiente contendo solução nutritiva de Hoagland na concentração 0,5 N. A otimização da atividade de Redutase de Nitrato foi feita para as folhas. Quarenta e oito horas antes das determinações, as plantas foram colocadas em câmara de crescimento com temperatura diurna de 25°C e noturna de 20°C. Ficou estabelecido que as condições para o ótimo da atividade enzimática são: meio de incubação, 0,1 M de nitrato de potássio, n-propanol 1%, tampão fosfato, pH 7,0, e temperatura de 33°C. O tempo de reação ideal foi 30 minutos, e os tecidos foram obtidos após 4 horas de iluminação, com folhas de 30 dias de idade. Para avaliar o efeito da temperatura radicular sobre a atividade da enzima na folha, as plantas foram colocadas em câmaras de crescimento, com temperatura do ar regulada a 20, 25 e 30°C constantes, e temperatura da raiz mantida a 0, 5 e 10°C abaixo da temperatura do ar, durante um período de 5 horas de luz. A atividade da enzima Redutase de Nitrato nas folhas de aguapé foi estimulada sob regimes de temperatura do ar de 20 e 25°C com temperaturas radiculares se situando à valores próximos da temperatura do ar. Porém, um efeito inverso foi obtido quando a temperatura do ar era de 30°C; nesse caso, a diferença de 5 ou 10°C entre a temperatura do ar e das raízes favoreceu a atividade enzimática. A determinação da atividade enzimática nas raízes do aguapé seguiu o método padronizado para as folhas, sendo que seu valor foi cerca de 30% mais baixa que a atividade mostrada nas folhas, quando o experimento de 25°C foi repetido. Nesse caso, tanto a atividade da raiz como da folha de cresceram com o resfriamento do sistema radicular.

As determinações da concentração do íon nitrato nas fo-

lhas e raízes não foram consistentes com a quantidade de íon re-
duzido na parte aérea ou radicular.

51791BC

8. SUMMARY

A study to evaluate the effect of root and air temperature on the activity of the enzyme Nitrate Reductase *in vivo* was conducted using leaves and roots of waterhyacinth. The plants were grown in a green house in containers with half strength Hoagland's nutrient solution. Optimum conditions for Nitrate Reductase activity was determined for the leaves. The plants were placed in a growth chamber with an air temperature of 25°C D/20°C N 48 hours before the start of the experiments. The assay was carried out with 30-day-old leaves taken 4 hours after the beginning of the illumination period. Optimum enzyme activity was obtained with 0,1 M KNO₃, 1% n- propanol in phosphate buffer pH 7,0, and assay temperature of 33°C and an incubation period of 30 minutes. To evaluate the effect of root temperature on leaf enzyme activity, the plants were placed in a growth chamber, set at constant air temperatures of 20, 25 and 30°C, with a constant root temperature of 0, 5 and 10°C below the air temperature applied during the first 5 hours of illumination. The enzyme activity of waterhyacinth leaves was optimum under air temperatures of 20 and 25°C with a root temperature close that of the air. However, a different effect was obtained when the air temperature was 30°C, in this case, a root temperature of 5 or 10°C below that of the air stimulated the enzyme activity. Activity of the root enzyme was determined following the same pattern established for the leaves, it's value being 30% of that found in the leaves, when air temperature was set at 25°C. Enzyme activity in the roots and leaves decreased with the lowering of root temperature.

The nitrate concentrations in the leaves and roots were not consistent with the amount of ion reduced in these organs.

9. LISTA DE ABREVIATURAS

N.R. - Nitrato redutase

NiR. - Nitrito redutase

G.S. - Glutamina sintetase

GOGAT - Glutamina oxoglutarato amida transferase

α -KG - ácido α -cetoglutárico

- ALEEM, M.I.H. 1970. Oxidation of inorganic nitrogen compounds
Annu. Rev. Plant Physiol., 67-90.
- ALOFE, C.O.; SCHRADER, L.E.; SMITH, R.R. 1973. Influence of
high day and variable night temperature on nitrate reductase
activity of young corn (*Zea Mays* L.) plants. *Crop. Sci.*, 13:
625-629.
- AMOS, J.A. e SCHOLL, R.L. 1977. Effect of growth temperature
on leaf nitrate reductase, glutamine synthetase, and NADH
Glutamine Dehydrogenase of juvenile maize genotypes. *Crop.*
Sci., 17: 445-448.
- ASHLEY, D.A.; JACKSON, W.A. e VOLK, R.J. 1975. Nitrate uptake
and assimilation by wheat seedlings during initial exposure
to nitrate. *Plant Physiol.*, 55: 1102-1106.
- ASLAM, M. e OAKS, A. 1975. Effect of glucose in the induction
of nitrate reductase in maize roots. *Plant Phsyiol.*, 56: 634-
639.
- ASLAM, M.; OAKS, A. e HUFFAKER, R.C. 1976. Effect of light and
glucose on the induction of nitrate reductase and on the dis-
tribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Phy-*
siol., 58: 588-591.
- AUSTIN, R.B.; ROSSI, L. e BLACKWELL, R.D. 1978. Relationship
between nitrate reductase activity. Plant weight and nitrogen
content in seedlings of *Triticum*, *Aegilops* and *Triticale*. *Ann.*
Bot., 42: 429-438.

- BAKSHI, I.S.; FAROOQI, A.H.A.; MAHESHWARI, S.C. 1978. Circadian rhythm in nitrate reductase activity in the duckweed *Wolffia microscopica*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 30: 165-169.
- BASSIONI, N.H. 1971. Temperature and pH interaction in NO_3 uptake. *Plant Soil*, 35: 445-448.
- BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 20: 495-522.
- BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1972. The role of light in nitrate metabolism in higher plants. *Photophysiology*, vol. III, A.P. Inc. New York and London.
- BEEVERS, L. e HAGEMAN, R.H. 1980. Nitrate and nitrite reduction. In: *The Biochemistry of Plants*. ed. B.J. Mifflin. Academic Press. New York, vol. V. pp. 115-159.
- BEEVERS, L.; SCHRADER, L.E.; FLESHER, D. e HAGEMAN, R.H. 1965. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant. Physiol.*, 40: 691-698.
- BJERANO, R.N. e LIPS, S.H. 1973. Induction of nitrate reductase in leaves of barley in the dark. *New Phytol.*, 72: 253 - 257.
- BENZIONI, E. e HEIMER, Y.M. 1977. Temperature effect on nitrate reductase *in vivo*. *Plant. Sci. Lett.*, 9: 225-231.
- BERRY, J. e BJÖRKMAN, 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *An. Rev. Plant. Physiol.*, 31: 491-543.

- BILAL, I.M.; RAINS, D.W. 1973. In vivo characterization of ni
trate reductase activity in cotton. *Physiol. Plant.*, 28: 237
243.
- BINGHAM, S.W. e SHAVER, R.L. 1971. Uptake, translocation and
degradation of diphenamide in plants. *Weed Science*, 19(6): 639
643.
- BINGHAM, S.W.; SHAVER, R.L. 1977. Diphenamide removal from
water and metabolism by aquatic plants. *Pesticide Bioche-*
mistry and Physiology, 7: 8-15.
- BLEVINS, D.G.; BARNETT, N.M. e FROST, W.B. 1978. Role of po-
tassium and malate in nitrate uptake and translocation by
wheat seedlings. *Plant Physiol.*, 62: 784-788.
- BOYD, C.E. 1976. Accumulation of dry matter nitrogen and phos-
phorus by cultivated water hyacinths. *Economic Botany*, 30:
51-56.
- BOYD, C.E. e SCARBROOK, E. 1975. Influence of nutrient addi-
tions and initial density of plants on production of waterhya-
cynth *Eichhornia crassipes*. *Aquatic Botany*, 1: 253-261.
- BRETELER, H.; TEN CATE, C.H. 1980. Fate of nitrate during ini-
tial nitrate utilization by nitrogen depleted dwarf bean .
Physiol. Plant., 48: 292-296.
- BRETELER, H.; TEN CATE, C.H. e NISSEN, P. 1979. Time-course of
nitrate uptake and nitrate reductase activity in nitrogen de-
pleted dwarf bean. *Physiol. Plant.*, 47: 49-55.
- CARELLI, M.L.C. e MAGALHÃES, A.C. 1981. Efeito da remoção dos
cotilédones no desenvolvimento das plântulas e na

atividade da redutase de nitrato em soja (*Glycine max* L. Merr.). *Rev. Bras. Bot.*, 4: 43-47.

CAREY, R.W. e BERRY, J.A. 1978. Effects of low temperature on respiration and uptake of Rubidium ions by excised and corn roots. *Plant. Physiol.*, 61: 858-860.

CHANTAROTWONG, W.; HUFFAKER, R.C.; MILLER, B.L. e GRANSTEDT, R. C. 1976. *In vivo* nitrate reduction in relation to nitrate uptake, nitrate content, and *in vitro* nitrate reductase activity in intact barley seedlings. *Plant. Physiol.*, 57: 519-522.

CHEN, T.M. e RIES, S.K. 1969. Effect of light and temperature on nitrate uptake and nitrate reductase activity in rye and oat seedlings. *Can. J. Bot.*, 47: 341-343.

CHEVALIER, P. e SCHRADER, L.E. 1977. Genotypic differences in nitrate absorption and partitioning of N among plant parts in maize. *Crop. Sci.*, 17: 897-901.

CLARKSON, D.T. 1976. The influence of temperature on the exudation of xylem sap from detached root systems of rye (*Secale cereale*) and barley (*Hordeum vulgare*). *Planta*, 132: 297-304.

CLARKSON, D.T. e WARNER, A.L. 1979. Relationship between root temperature and the transport of ammonium and nitrate ions by Italian and perennial ryegrass (*Lolium multiflorum* and *Lolium perenne*). *Plant Physiol.*, 64: 557-561.

CLARKSON, D.T. e HANSON, J.B. 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 31: 239-298.

- CLARKSON, D.T.; SHONE, M.G.T. e WOOD , A.V. 1974. The effect of pretreatment temperature on the exudation of xylem sap by detached barley root systems. *Planta*, 121: 81-92.
- CLEMENTS, C.R.; HOPPER, M.J.; JONES, L.H.P. e LEAFE, E.L. 1978. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. Effect of light, defoliation and relationship to CO₂ flux. *J. Exp. Bot.*, 29: 1173-1184.
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E. e HAGEMAN, P.H. 1972. Intracellular location of nitrate and nitrite reductase. II. Wheat roots. *Biochim. Biophys. Acta*, 283: 513-519.
- DEANE-DRUMMOND, C.E.; CLARKSON, D.T.; JOHNSON, C.B. 1980. The effect of differential root and shoot temperature on the nitrate reductase activity assayed *in vivo* and *in vitro* in roots of *Hordeum vulgare* (Barley). *Planta*, 148: 455-461.
- DINGES, R.S. 1976. Who says sewage plants have to be ugly? *Water & Wastes engineering*, 20-23.
- DINGES, R.S. 1978. Upgrading stabilization of pond effluent by water hyacinth culture. *Journal Water Pollution Control* , 833-845.
- DODDEMA, H. e TELKAMP, G.P. 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. II - Kinetics. *Physiol. Plant.*, 45: 332-338.
- EILRICH, G.L. e HAGEMAN, R.H. 1973. Nitrate reductase activity and its relationship to accumulation of vegetative and grain nitrogen in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop. Sci.* 13:59-66.

- EMES, M.J. e FOWLER, M.W. 1979a. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. *Planta*, 144: 249-253.
- EZETA, F.N. e JACKSON, W.A. 1975. Nitrate translocation by de-topped corn seedlings. *Plant Physiol.*, 56: 148-156.
- FERRARI, T.E. e VARNER, J.E. 1970. Control of nitrate reductase activity in barley aleurone layers. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 65: 729-736.
- FERRARI, T.E.; YODER, O.C. e FILNER, P. 1973. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues: evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol.*, 51: 423-431.
- FRITH, G.J.T. 1974. Light stimulated activity of nitrate reductase in apple roots. *Plant Cell. Physiol.*, 15: 153-155.
- FROTA, J.N.E. e TUCKER, T.C. 1972. Temperature influence on ammonium and nitrate absorption by lettuce. *Soil. Sci. Soc. Proc.*, 36: 97-100.
- GALLO, J.R. e LOTT, W.L. 1965. Método simplificado para determinação de nitrato nas folhas com o ácido fenoldissulfônico. *Bragantia*, 24: III-VI.
- GALSTON, A.W. 1961. The life of green plants. Prentice Hall, Englewood Cliffs, ed. New Jersey, USA:
- GOSSET, D.R. e NORRIS, W.E. Jr. 1971. Relationship between nutrient availability and content of nitrogen and phosphorus in tissues of the aquatic macrophyte, *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Hydrobiologia*, 38(1): 15-28.

- 59
- HALLMARK, W.B. e HUFFAKER, R.C. 1978. The influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in Sundangrass seedlings. *Physiol. Plant.*, 44: 147-152.
- HANSEN, G.K. 1980. Diurnal variation of root respiration and nitrate uptake as influenced by nitrogen supply. *Physiol. Plant.*, 48:421-427.
- HARPER, J.E. e HAGEMAN, R.H. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max.* L. Merr.). *Plant. Physiol.*, 49:146-154.
- HEIMER, Y.M. e FILNER, P. 1971. Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. *Biochim. Biophys. Acta*, 230: 362-372.
- HEWITT, E.J. 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 26: 73-100.
- HEWITT, E.J.; HUCKLESBY, D.P. e NOTTON, B.A. 1976. In: Plant Biochemistry. J. Bonner and J.E. Varner, ed. pp. 633-672. Academic Press; New York.
- HILDEBRAND, E.M. 1946. Herbicidal Action of 2,4 diclorophenoxy acetic acid on the water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. *Science*, 103(26): 477-479.
- HOAGLAND, D.R. e ARNON, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agr. Exp. Sta. Circ.*, 347.
- HOLM, L.G. WELDON, L.W. e BLACKBURN, R.D. 1969. Aquatic Weeds. *Science*, 166: 699-708.
- HOUCARD, R. 1974. STP. Users Manual. Computer Center. Western Michigan University.

- INGESTAD, T. e LUND, A.B. 1979. Nitrogen stress in birch seedlings. *Physiol. Plant.*, 45(1): 137-148.
- INGLE, J.; JOY, K.W. e HAGEMAN, R.H. 1966. The regulation of the enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. J.* 100: 577-588.
- JACKSON, W.A.; VOLK, R.J. e TUCKER, T.C. 1972. Apparent induction of nitrate uptake in nitrate depleted plants. *Agron. J.*, 64: 518-521.
- JACKSON, W.A.; FLESHER, D. e HAGEMAN, R.H. 1973. Nitrate uptake by dark grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiol.*, 51: 120-127.
- JACKSON, W.A.; KWIK, K.D.; VOLK, R.J. e BUTZ, R.G. 1976. Nitrate influx and efflux by intact wheat seedlings: Effects of Prior nitrate nutrition. *Planta*, 132: 149-156.
- JOHNSON, C.R. e SHEEHAN, T.J. 1977. Nutrient removal by water hyacinth from solution cultures. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 90: 118-119.
- JOLLY, S.O.; CAMPBELL, O. e TOLBERT, N.E. 1976. NADPH and NADH nitrate reductases from soybean leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 174: 431-439.
- JORDAN, W.R. e HUFFAKER, R.C. 1972. Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in greening barley leaves. *Physiol. Plant.*, 26: 296-301.
- JONES, R.W. e SHEARD, R.W. 1975. Phytochrome nitrate movement and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. *Plant. Physiol.*, 55: 954-959.

- JONES, R.W.; ABBOT, A.J.; HEWITT, E.J.; REST, G.R. e WATSON, E. F. 1978. Nitrate reductase activity in Paul's scarlet rose suspension cultures and the differential role of nitrate and molybdenum in induction. *Planta*, 141: 183-189.
- KAISER, J.J. e LEWIS, O.A.M. 1980. Nitrate nitrogen assimilation in the leaves of *Helianthus annuus* L. *New Phytol.*, 85: 235-241.
- KANNANGARA, C.G. e WOOLHOUSE, H.W. 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: 553-561.
- KAUFMANN, J.E.; BEARD, J.B. e PENNER, D. 1971. The influence of temperature on nitrate reductase activity of *Agrostis palustris* and *Cynodon dactylon*. *Physiol. Plant.*, 25: 378-381.
- KLEPPER, L.; FLESHER, D. e HAGEMAN, R.H. 1971. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant. Physiol.*, 48: 580-590.
- KUO, T.; KLEINHOF, A. e WARNER, R.L. 1980. Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves. *Plant. Sci. Lett.*, 17(3): 371-381.
- LANGRIDGE, J. e MCWILLIAM, J.R. 1967. Heat responses of higher plants. pg. 231-292. In: A.H. Rose ed. *Thermobiology*. Academic Press. New York, USA.
- LARCHER, W. 1975. *Physiological Plant Ecology*. Translated by M.A. Biederman-Thorson. Springer-Verlag. Berlin, Germany.

- LEE, R.B. 1978. Inorganic nitrogen metabolism in barley roots under poorly aerated conditions. *J. Exp. Bot.*, 29: 693-708.
- LENNINGER, A.L. 1977. Bioquímica. Tradução da 2a. edição. Edgard Blücher Ltda. (ed.) SP.
- LEOPOLD, A.C. e KRIEDMANN, P.E. 1975. Plant growth and development. Second Edition. McGraw Hill, Inc. New York, USA.
- LIANG, J.K. e LOVELL, R.T. 1971. Nutritional value of water hyacinth in channel catfish feeds. *Hyacinth Control Journal*, 9(1): 40-44.
- LIN, W.H. e KAO, C.H. 1980. Factors affecting *in vivo* nitrate reductase activity in triticales. *Physiol. Plant.*, 48: 361-364.
- MAGALHÃES, A.C. 1975. Nitrate assimilation in higher plants. What's new in *Plant Physiol.*, 7(1): 1-5.
- MAGALHÃES, A.C. 1977. Effect of root temperature on nitrate reduction in the soybean plant. *Cienc. Cult. (São Paulo)*, 29(1): 63-65.
- MAGALHÃES, A.C. e HAGEMAN, R.C. 1978. High temperature effects on net CO₂ exchange, nitrate reductase and RUDP carboxylase activities in soybean leaves. *Rev. Bras. Bot.*, 1: 139-142.
- MAGALHÃES, A.C.; NEYRA, C.A. e HAGEMAN, R.H. 1974. Nitrite assimilation and amino nitrogen synthesis in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, 53: 411-415.
- MAGALHÃES, A.C.; PETERS, D.B. e HAGEMAN, R.H. 1976. Influence of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in

soybean (*Glycine max.* L. Merr.) seedlings. *Plant Physiol.* ,
58: 12-16.

MARTINOLA, E.; HECK, U. e WIEMKER, A. 1981. Vacuoles as storage compartments for nitrate in barley leaves. *Nature*, 289: 292-293.

MIFLIN, B.J. 1967. Distribution of nitrate and nitrite reductase in barley. *Nature*, 214: 1133-1134.

MIFLIN, B.J. 1970. Studies on the sub-cellular location of particulate nitrate and nitrite reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots. *Planta*, 93: 160-170.

MINOTTI, P.J. e JACKSON, W. 1970. Nitrate reduction in the roots and shoots of wheat seedlings. *Planta*, 95: 36-44.

MOONEY, H.A. e GULMON, S.L. 1979. Environmental and evolutionary constraints on the photosynthetic characteristics of higher plants. Pages 316-337. In: O.T. Solbrig, S. Jain, C.B. Johnson and P.H. Raven editors. Columbia University Press. New York, USA.

MORAGHAN, J.T. e PORTER, O.A. 1975. Maize growth as affected by root temperature and form of nitrogen. *Plant Soil.*, 43: 479-487.

NEYRA, C.A. e HAGEMAN, R.H. 1975. Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots. *Plant Physiol.* , 56: 692-695.

NEYRA, C.A. e HAGEMAN, R.H. 1978. Pathway for nitrate assimilation in corn (*Zea mays* L.) leaves. Cellular distribution of enzymes and energy sources for nitrate reduction. *Plant Phy*

- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E. e HAGEMAN, R.H. 1976a. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max.* L. Merr.). I - Effects of light and temperature. *Plant Physiol.*, 58: 731-735.
- NIE, N.H.; HULL, C.H.; JENKINS, J.G.; STEINBRENNER, K. e BENT, D.H. 1975. SPSS: Statistical package for the social sciences. Second Edition McGraw-Hill, Inc. New York, New York, USA.
- OAKS, A.; WALLACE, W. e STEVENS, D. 1972. Synthesis and turnover of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 50: 649-654.
- ONWEME, I.C.; LAUDE, H.M. e HUFFAKER, R.C. 1971. Nitrate reductase activity in relation to heat stress in barley seedlings. *Crop. Sci.*, 11: 195-200.
- OSMOND, D.L. e RAPER, C.D. 1981. Growth and nitrogen accumulation in tobacco plants as affected by nitrate concentration, root temperature and aerial temperature. *Agron. J.*, 73: 491-496.
- PAL, U.R.; JOHNSON, R.R. e HAGEMAN, R.H. 1976. Nitrate reductase activity (drought) tolerant and intolerant maize genotypes. *Crop. Sci.*, 16: 775-779.
- PARRA, J.V. e HORTENSTINE, C.C. 1974. Plant nutritional content of some Florida waterhyacinths and response by pearl millet to incorporation of waterhyacinths in three soil types. *Hyacinth. Control J.* 12: 85-90.

- PARRA, J.V. e HORSTENTINE, C.C. 1976. Response by pearl millet to soil incorporation of waterhyacinth. *J. of Aquatic Plant Management*, 14: 75-79.
- PATE, J.S. 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5: 109-119.
- PENFOUND, T.W. e EARLE, T.T. 1948. The biology of the water hyacinth. *Ecology Monographs*, 18(4): 447-472.
- PITMAN, M.G.; MOWAT, J. e NAIR, H. 1971. Interactions of processes for accumulations of salt and sugar in barley plants. *Aust. J. Biol. Sci.*, 24: 619-631.
- POKHRIVAL, T.C.; SACHDEV, M.S.; GROVER, H.L.; ARORA, R. P. e ABROL, Y.P. 1980. Nitrate assimilation in leaf blades of wheat of different age. *Physiol. Plant.*, 48: 477-481.
- RADIN, J.W. 1977. Contribution of the root system to nitrate assimilation in whole cotton plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, 4: 811-819.
- RADY, H.M. 1979. Dangers and utilization of the waterhyacinths. *Plant Research and Development*, 10: 46-52.
- RAO, K.P. e RAINS, D.W. 1976a. Nitrate absorption by barley. I - Kinetics and Energetics. *Plant Physiol.*, 57: 55-58.
- RAO, K.P. e RAINS, D.W. 1976b. Nitrate absorption by barley. II - Influence of nitrate reductase activity. *Plant Physiol.*, 59-62.
- RITTENOUR, G.L. JOY, K.W.; BUNNING, J. e HAGEMAN, R.H. 1967. In tracellular localization of nitrate reductase, nitrite reducta

- se and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissue. *Plant Physiol.*, 42: 233-237.
- ROSARIO, E.L. e SOOKSATHAN, K. 1977. Influence of fertility levels on nitrate reductase activity and its significance to sugar yield. *International Society Sugar Cane Technology Proceedings*, 17: 1825-1841.
- SAHULKA, J. e LISÁ, L. 1978. The influence of sugars on nitrate reductase induction by exogenous nitrate or nitrite in excised *Pisum sativum* roots. *Biol. Plant.*, 20: 359-367.
- SAHULKA, J. e LISÁ, L. 1979. The effect of cultivation temperature on nitrate reductase, glutamine synthetase glutamine dehydrogenase levels in isolated *Pisum sativum* roots. *Biol. Plant.*, 21(2): 149-151.
- SASAKAWA, H. e YAMAMOTO, Y. 1978. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. *Plant Physiol.*, 62: 665-669.
- SCHRADER, L.E. e THOMAS, R.J. 1981. Nitrate uptake reduction and transport in the whole plant. In: *Nitrogen and Carbon Metabolism*, Dewhey, J.D. (ed.), Boston/London, pg. 49-93.
- SCHRADER, L.E.; RITTENOUR, G.L.; FILRICH, G.H. e HAGEMAN, R.H. 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.*, 43: 930-940.
- SERRA, J.L.; LLAMA, M.J. e CADENAS, E. 1978. Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum*. II - Regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.*, 62: 991-994.
- SHANER, D.L. e BOYER, J.S. 1976a. Nitrate reductase activity

in maize (*Zea mays* L.) leaves. I - Regulation by nitrate flux. *Plant. Physiol.*, 58: 499-504.

SHEN, T.C. 1972. Variation in the nitrate reductase of rice seedlings. *Planta*, 108: 21-28.

SHEN, T.C.; FUNKHOUSER, E.A. e GUERRERO, M.G. 1976. NADH and NAD(P)H - nitrate reductase in rice seedlings. *Plant Physiol.*, 58: 292-294.

SMITH, F.W. e THOMPSON, J.F. 1971. Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.*, 48: 219-223.

SRIVASTAVA, H.S. 1975. Distribution of nitrate reductase in aging bean seedling. *Plant Cell Physiol.*, 16: 995-999.

SOKAL, R.R. e ROHLF, F.J. 1981. Biometry. Principles and Practice of Statistics in Biological Research. Second edition. W. H. Freeman & Co. San Francisco, California, USA.

SOLOMONSON, L.P. e SHEPAR, A.M. 1977. Model for the regulation of nitrate assimilation. *Nature*, 265: 373-375.

STEVENS, D.L. e OAKS, A. 1973. The influence of nitrate on the induction of nitrate reductase in maize roots. *Can. J. Bot.*, 51: 1255-1258.

SUZUKI, A.; GADAL, P. e OAKS, A. 1981. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta*, 457-461.

STENBERG, H.O.R. 1975. The Amazon River of Brasil. Franz Steiner Verlag GMBH - WIESBADEN. 74p.

- TAMM, C.O. 1975. Plant nutrient as limiting factors in ecosystem dynamics. Pages 123-132. In: Productivity of World Ecosystems, Proceedings of a Symposium. National Academy of Sciences. Washington, D.C. USA.
- TINGEY, D.T.; FITES, R.C. e BAHARSJAH, J. 1974. Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. *New Phytol.*, 73: 21-29.
- TISCHNER, R. e HUTTERMAN, A. 1978. Light mediated activation of nitrate reductase in synchronous *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 62: 284-286.
- TRAVIS, R.L. e KEY, J.L. 1971. Correlation between polyribosome level and the ability to induce nitrate reductase activity in dark grown corn seedlings. *Plant Physiol.*, 48: 617-620.
- TRAVIS, R.L.; JORDAN, W.R. e HUFFAKER, R.C. 1969. Evidence for an inactivating system of nitrate reductase in *Hordeum vulgare* L. during darkness that requires protein synthesis. *Plant Physiol.*, 44: 1150-1156.
- TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. e KEY, J.L. 1970. Light induced development of nitrate reductase in corn leaves. *Plant Physiol.*, 46: 800-805.
- VIJAYARAGHAVAN, S.J.; SOPORY, S.K. e GUHA-MUKHERJEE, S. 1979. Role of light in the nitrate reductase level in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Cell Physiol.*, 20(7): 1251-1261.
- WALLACE, W. 1973. A nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root. *Plant Physiol.*, 52: 197-201.

- WALLACE, W. 1975. A re-evaluation of the nitrate reductase content of the maize root. *Plant Physiol.*, 55: 774-777.
- WALLACE, W. e PATE, J.S. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (*Xanthium pennsylvanicum*). *Ann. Botany*, 31: 213-228.
- WATTS, W.R. 1972. Leaf extension in *Zea mays*. Leaf extension and water potential in relation to root zone and air temperatures. *J. Exp. Bot.*, 23(76): 704-712.
- WOLVERTON, B.C. e McDONALD, R.C. 1978. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) productivity and harvesting studies. *E. R. L. Report n° 171*: 43-59.
- WOLVERTON, B.C. e MCKOWN, M.M. 1976. Water hyacinths for removal of phenols from polluted waters. *Aquatic Botany*, 2: 191-201.
- YOUNIS, M.A.; PAULI, A.W.; MITCHELL, H.L. e SICKER, F.C. 1965. Temperature and its interaction with light and moisture in nitrogen metabolism of corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Crop. Sci.*, 5: 321-326.
- ZIELKE, H.R. e FILNER, P. 1971. Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in cultured tobacco cells. *J. Biol. Chem.*, 246: 1772-1779.