ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO (E. C. 1.6.6.2)
SOB INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS E QUÍMICOS EM
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

LUIZ ANTONIO GALLO

Orientador: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Energia Nuclear na
Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1980

.i.

À minha esposa *Sueli*,

e meus filhos

Giovana Maria

Marco Antonio

e

Marcel Francisco

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo, pela orientação e incentivo.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, na pessoa de seu Diretor Prof. Admar Cervellini, pelo apoio à realização do curso.
- À Comissão Nacional de Energia Nuclear, pelo apoio financeiro.
- Aos Professores do Curso de Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura.
- Aos Professores Luiz Carlos Basso, Luiz Eduardo Gutierrez e T.S. Gerald Lee, pela cooperação durante os ensaios.
- Aos funcionários Romeu Aparecido Rocha, Antonio Carlos Dorelli e Clarice Matraia, pela colaboração na parte experimental.
- Ao colega Alfredo José Ferraz de Mello, pela excelente datilografia.
- Aos demais companheiros de luta, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.
- Em especial à mãe de meus filhos, Sueli A. Malosso Gallo, pelo amor e compreensão que me dedicou durante o trabalho.

ABREVIações UTILIZADAS

ADP	- Adenosina difosfato
AMP	- Adenosina monofosfato
ATP	- Adenosina trifosfato
CLORETO DE NAFTIL	- N-1-Naftil etileno diamino diidrocloro
DCMU	- Dicloro Fenil Dimetil Uréia
2,4-D	- Ácido Diclorofenoxi Acético
I A A	- Ácido Indol Acético
FAD	- Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMN	- Flavina Mono Nucleotídeo
FADH ₂	- Flavina adenina nucleotídeo reduzido
FMNH ₂	- Flavina Mono Nucleotídeo reduzido
NAD ⁺	- Nicotina Amida Adenina Dinucleotídeo
NADH	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NADP ⁺	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NR	- Redutase de Nitrato

	<i>Página</i>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. Efeito da radiação gama sobre a atividade da Redutase de Nitrato	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Ensaio nº 1 "Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da Redutase de Nitrato".	34
4.2. Ensaio nº 2 "Verificação do tempo de indução sobre a atividade da Redutase de Nitrato".	35
4.3. Ensaio nº 3 "Determinação do pH ótimo do tampão de infiltração para as determinações da atividade da Redutase de Nitrato".	36
4.4. Ensaio nº 4 "Determinação de temperatura ótima de incubação para o ensaio da Redutase de Nitrato".	36
4.5. Ensaio nº 5 "Efeito da posição da folha na atividade da Redutase de Nitrato".	37
4.6. Ensaio nº 6 "Efeito do Ácido Indol Acético na indução da Redutase de Nitrato".	37
4.7. Ensaio nº 7 "Influência da luz sobre a atividade da Redutase de Nitrato".	38
4.8. Ensaio nº 8 "Comparação entre duas cultivares de feijão crescendo em diferentes condições nutricionais com relação à atividade da Redutase de Nitrato".	39
4.9. Ensaio nº 9 "Efeito da dose de radiação sobre a atividade da Redutase de Nitrato".	40

	.v.
4.10. Ensaio nº 10 "Efeito de três diferentes intensidades de dose de radiação gama sobre a atividade da Redutase de Nitrato"	41
4.11. Ensaio nº 11 "Determinação da atividade da Redutase de Nitrato sob a influência de indutores e inibidores".	42
5. RESULTADOS.	44
5.1. Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima Redutase de Nitrato.	44
5.2. Análise do nitrato	47
5.3. Verificação do tempo de indução da enzima Redutase de Nitrato.	47
5.4. Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato.	49
5.5. Efeito da temperatura do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato	52
5.6. Determinação da atividade da Redutase de Nitrato.	52
5.7. Efeito do Ácido Indol Acético sobre a atividade da Redutase de Nitrato.	55
5.8. Influência da luz na atividade da Redutase de Nitrato.	57
5.9. Atividade da Redutase de Nitrato durante o ciclo biológico de duas cultivares de feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Goiano Precoces e <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Carioca Precoces.	59
5.10. Efeito da radiação gama sobre a atividade da Redutase de nitrato.	65
5.11. Efeito de três intensidades de dose de irradiação sobre a atividade da Redutase de Nitrato..	68
5.12. Efeito de indutores e inibidores na atividade da Redutase de Nitrato.	74

6. DISCUSSÃO.	.vii. 78
6.1. Efeito da concentração de $N-NO_3^-$ na atividade da Redutase de Nitrato.	78
6.2. Determinação das condições ideais de análises da Redutase de Nitrato.	79
6.3. A enzima Redutase de Nitrato nas folhas e raízes do feijoeiro.	81
6.4. Ação da radiação sobre a enzima Redutase de Nitrato.	88
7. CONCLUSÃO.	89
8. SUMMARY.	92
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	94
10. APÊNDICE.	110

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a determinação de parâmetros físicos e químicos que influenciam na atividade do enzima Redutase de Nitrato (NR) em plântulas de feijão. Esta enzima é uma das mais importantes no metabolismo nitrogenado da planta, pois ela representa o ponto inicial da assimilação do nitrogênio nítrico.

Para os ensaios realizados, utilizamos sementes de *Phaseolus vulgaris* L., cvs. Goiano precoce e Carioca precoce, cedidas pela Seção de Radiogenética do C.E.N.A. - Piracicaba-SP. Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação e nas câmaras de crescimento do Setor de Bioquímica de Plantas do C.E.N.A.

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios, demonstraram que a enzima é reduzida pelo substrato e possui um pH e temperatura ótimos para a incubação de 7,3 e 33°C respectivamente.

As constantes de Michaelis-Menten também foram determinadas, sendo que para as folhas é de $6,8 \times 10^{-3}M$ e para as raízes de $9,7 \times 10^{-4}M$.

.2.

Verificou-se também que a atividade da NR varia com a idade da planta, tendo um máximo de atividade antes do florescimento dos cultivares utilizados. Também a atividade da NR varia de acordo com a posição da folha na planta, sendo que folhas sombreadas apresentaram menor atividade da enzima. A atividade da NR varia também com relação a idade da folha, sendo que as folhas mais novas possuem maior atividade.

A luz também é um fator que afeta a atividade da NR. Plantas crescendo à luz quando foram colocadas em condições de escuro, tiveram sua atividade diminuída ao mínimo. Entretanto quando as plantas retornaram a luz, após 48 horas no escuro, tiveram a atividade da enzima restabelecida.

Também o efeito de indutores e inibidores da NR foi estudado. A adição de intermediários da glicólise promoveu um aumento na atividade da enzima. Entretanto a adição de ácido isocítrico não teve efeito na indução ou inibição da enzima.

Os reguladores de crescimento, ácido giberélico e 2-4-diclorofenoxiacético, promoveram um aumento da atividade da enzima. Também a auxina ácido indol acético, com o aumento da dose, promoveu um aumento da atividade enzimática.

Com relação à adição dos aminoácidos ao meio indutor, foi verificado que os aminoácidos glicina e ácido glutâmico promoveram um acréscimo na atividade enzimática, enquanto que a cisteína diminuiu sua atividade.

Também a adição ao meio indutor de citrulina, agmatina e putrescina, aumentou a atividade da enzima. Porém a espermidina e a espermina promoveram um decréscimo não significativo na atividade da NR.

.3.

A irradiação com diferentes intensidades de radição gama não teve efeito sobre a atividade da enzima, entretanto em relação a dose de radiação, houve uma inativação proporcional ao aumento da mesma.

Estes resultados demonstram que a atividade da NR varia de acordo com as condições fisiológicas e ambientais em que a planta se encontra, tornando-se necessário para sua análise, estabelecer as condições ideais do ensaio.

2. INTRODUÇÃO

O nitrato constitui uma das principais fontes de nitrogênio para as plantas, e uma vez reduzido irá fazer parte de compostos nitrogenados, os quais estarão comprometidos com o metabolismo proteico, sendo portanto de fundamental importância para a manutenção do estado vivo da planta. Após sua redução e conversão enzimática em amônia, será incorporado em moléculas de aminoácidos, via enzimas assimilatórias, os quais por sua vez irão fazer parte do "pool" de compostos nitrogenados que se compartimentalizam nas células do vegetal. Assim a planta produz proteínas e cria condições de crescer e desenvolver-se.

É sabido que o feijão, como toda leguminosa cultivada, apresenta baixa produtividade por área. Mesmo em condições ótimas, tem-se obtido cerca de 4.500 kg/ha e nos experimentos de campo não ultrapassa a 2.000 kg/ha. Isto vem demonstrar que o potencial de produção de nossas cultivares de feijão é muito baixo, em virtude talvez de uma baixa eficiência fotossintética e senescência precoce; além disso, a atividade das enzimas relacionadas à assimilação de nitrato nas plantas é reduzida.

A enzima responsável pela absorção do nitrato pelas plantas é a redutase de nitrato (NR), sendo que sua ação depende, em última análise, da formação de outros nitrogenados, levando finalmente a proteína.

Tendo em vista a importância desta enzima, resolvemos estudá-la sob o ponto de vista bioquímico, procurando respostas às perguntas formuladas, relativas aos parâmetros físicos e químicos que regulam sua atividade, com vista a uma meta mais ampla, qual seria contribuir para as pesquisas de melhoramento genético do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), no sentido de se obter cultivares que apresentem melhor eficiência de absorção do nitrogênio e sua incorporação em proteínas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A principal fonte de nitrogênio para a maioria das plantas e microorganismos é o nitrato. É, pois, de importância fundamental que seja conhecida a assimilação do íon nitrato. Nos trabalhos iniciais, demonstrou-se que nitrito formava-se quando uma planta era incubada com nitrato e glicose (ECKERSON, 1924). HAMMER (1936) demonstrou a formação de nitrito em tecidos de plantas deficientes em nitrogênio, quando eram incubadas com nitrato. ANDERSON (1924), reportou a detecção de nitrito em folhas e parte aérea de 25 plantas. BURSTON (1943) e ECKERSON (1932), relataram que a luz está envolvida na assimilação do nitrato.

Em geral aceita-se que o nitrito é um intermdiário no metabolismo do nitrato e que o processo de redução é enzimático.

EVANS e NASON (1953) purificaram a enzima Redutase de Nitrato e verificaram que o NADPH é usado como cofator preferencialmente ao NADH e que a enzima é uma flavoproteína tendo FAD como grupo prostético, sendo sensível a metais pesados. Demonstraram também a necessidade de nitrato e luz para a ativação da enzima.

HAGEMAN e FLESCHER (1960), demonstraram em uma série de experimentos com luz e variação dos níveis de nitrato, que a NR é dependente de ambos para sua ativação, e propõem que a regulação e o controle da atividade da NR seriam um segundo mecanismo para evitar a intoxicação da planta por amônia.

BANDERSON e COCKING (1963), em folhas de tomate, e cinco outras plantas, encontraram atividade da NR, sendo o pH ótimo ao redor de 7,5 e o nível de cisteína de 10^{-3} M, no tampão extrator, o melhor. Também estudaram o efeito da luz, concentração de nitrato e concentração do cofator na reação.

Estudando folhas de couve flor, *AFRIDI e HEWITT (1964)* verificaram que a atividade da NR varia com a variedade usada e com a idade. Também encontraram que a enzima é induzível por nitrato e molibdênio.

Os autores *MENDEL e VESSER (1951)* relatam a transformação de nitrogênio nitrato durante a assimilação pelas raízes de tomate, usando N^{15} , e comparam plantas no claro e escuro e plantas crescendo em nitrato e amônia e encontraram que em raízes de tomate há dois processos para a assimilação do nitrato: um que ocorre no escuro e que depende da energia da respiração e outro dependente da luz, possivelmente uma redução fotoquímica, na qual a amônia aparece como intermediária.

WALLACE e PATE (1964) em ervilha demonstraram a presença de Redutase de Nitrato em raízes, caules e folhas, e que existe um limiar de concentração de nitrato na raiz, que controla a atividade da NR e o fluxo de nitrato pelo caule. Grande parte do nitrogênio assimilado é encontrado no caule sob a forma de aminoácidos. Também demonstraram que o nitrato

to indutor pode atuar diretamente estimulando a síntese da enzima inativa. Nos tecidos velhos a diminuição da atividade da NR deve-se a um decréscimo do "turnover" da enzima ou que os sítios ativos da enzima estariam sendo bloqueados por inibidores.

Altas concentrações do indutor nitrato inibem a indução da enzima (ótimo ao redor de 10^{-2} M), em cotilédones de beterraba, sendo que a indução da enzima apresenta uma fase "LAG" de 30 minutos. Também nitrito não induz a NR, e amônia parece não exercer um efeito inibitório. *BEEVERS et alii* (1965), observaram também que a indução da NR não é diretamente ligada à luz, mas talvez a uma deficiência de substratos necessários à sua indução ou a um fluxo lento de indutores para o sítio de síntese. Encontraram também que o ótimo de temperatura de indução é entre 35-40°C. Concentrações crescentes de inibidores da síntese de proteínas inibem a indução da enzima, indicando haver síntese "de novo" durante a indução da mesma. Sob condições de sombra o nitrato se acumularia no vacúolo e não funcionaria como indutor, pois a luz, aumenta o movimento dos íons pela membrana e tonoplasto.

A NR tendo como doador NADH ou succinato, foi determinada estar com a fração mitocondrial por *MIFFLIN* (1967), em folhas e raízes de cevada, sendo observado maior atividade nas raízes.

SCHADER et alii (1968) encontraram em plantas de milho e abóbora e espinafre, que a NR pode ter tanto NADH como FMNH₂ como cofator. Encontraram também uma meia vida de 4 horas para a enzima. Devido a quantidade de FMNH₂ ser maior do que NADH, propõem o nome para a enzima de NADH: nitrato reductase (E.C.1.6.6.1.). Também sugerem um modelo de funcionamento para a NR, na qual a enzima participaria da transferência de elétrons via FMN, FAD e molibdênio. A enzima teria

duas subunidades que estariam unidas fortemente, ou que seriam duas enzimas separadas.

Plantas de trigo deficientes em cálcio acumulam nitrato, e possuem uma baixa atividade da NR (PAULSEN e HARPER, 1968). A explicação para tal fato, segundo os autores, é que o cálcio atua reprimindo a síntese da enzima, e não inibindo a atividade da mesma.

Segundo RITENOUR *et alii* (1967), redutase de nitrato e nitrito têm localizações diferentes na célula. Enquanto a NR está localizada no citoplasma, o nitrito estaria fora do cloroplasto, enquanto que a redutase de nitrito localiza-se dentro do cloroplasto, devendo portanto o nitrito passar através da membrana do plasto. O cálcio é essencial para manter a integridade da membrana, e sua deficiência, levaria a um desarranjo da membrana, impedindo a entrada do nitrito para o interior dos cloroplastos. Uma outra explicação seria a de que o nitrito se acumula porque a quantidade de nitrato reduzido excede a quantidade necessária para um pequeno crescimento.

A enzima NR foi parcialmente purificada em 15 espécies de plantas superiores e possuem especificidade por NADH como cofator, enquanto que em soja a enzima pode usar tanto NADH como NADPH. O trabalho de BEVEER *et alii* (1964) demonstra que a utilização de cisteína aumenta a atividade da NR.

A RN para soja parece ser diferente das outras plantas analisadas, pois apresenta uma diferença no ótimo de pH do meio extrator de 7,5 para as outras plantas analisadas a 6,25 para soja. A enzima pode usar tanto para NADH como NADPH como cofator.

Uma revisão sobre a assimilação do nitrogênio nitrato em plantas (*KESSLER, E. 1964*), descreve a hipótese mais aceita na época de que a assimilação do nitrato (redução), inicia-se no transporte de elétrons do NADPH_2 via FAD e no nitrato, sendo que NADH_2 também atua como doador de nitrogênio (elétrons).

O componente flavínico geralmente é FAD, porém FMN pode em alguns casos também funcionar. Cobalto em microorganismos, influencia a síntese da NR. A enzima tem caráter adaptativo e é induzida por nitrato ou por nitrito (em alguns casos). Amônia é um repressor da síntese da Redutase de Nitrato e a luz é indispensável. A redução do nitrato também está ligada à respiração, fotossíntese e hidrogenação.

Trabalhando com espinafre, *PANEQUE et alii* (1965) purificando a NR cerca de 130 vezes, encontraram um Km para FMN e FAD de 0,02 nM e para nitrato de 0,2. Nos experimentos, tanto FMN como FAD foram efetivos como doadores de elétrons para a redução do nitrato em plantas superiores, e propõem que a enzima deve ser considerada como uma mistura de duas diferentes enzimas, conhecidas anteriormente como NAD(P)H_2 : nitrato oxidoreductase (EC 1.6.6.2), devem ser agora denominada $\text{FMNH}_2(\text{FADH}_2)$: nitrato oxidoreductase e NADP reductase.

Trabalhando também com cloroplastos isolados de espinafre, *LOSADA et alii* (1965), encontraram que a flavina nucleotídeo é o único carregador de elétrons, necessário para a transferência de elétrons dos grana de espinafre isolados para o sistema nitrato-nitrato reductase. Nem NADP nem ferredoxina, são necessários para a fotoredução do nitrato. Usando PCMB, que é um inibidor da NADP reductase e da fotore

dução do NADP, não se observou alteração da redução fotoquímica do nitrato a nitrito. Concluem os autores que nucleotídeos de flavina reduzidos, no claro ou no escuro podem reduzir nitrato a nitrito, na presença de NR.

INGLE e HAGEMAN, 1966 encontraram em beterraba, que NR e NIR, são ambas induzidas pelos respectivos substratos. Cotilédones de beterraba desenvolveram alta atividade de NR quando em solução de nitrato ou de nitrito mais amônio. A NR não é inibida por amônio em plantas superiores, e os autores sugerem que devida à alta conversão do nitrato, esta não deve-se à contaminação bacteriana. Estudos com inibidores demonstram que para a indução é necessário síntese de RNA e proteína. O modelo de regulação não deve ser semelhante ao modelo do operon de Jacob e Monod, pois o mesmo substrato induz as duas enzimas e esta indução não é simultânea. Aminoácidos sob certas condições podem regular a atividade da NR.

Com relação à indução da Redutase de Nitrato, INGLE, (1968) provou que a síntese de RNA e proteínas foi necessária para a indução da Redutase de Nitrato o que foi demonstrado pelo uso de inibidores actinomicina D, puromicina e cicloheximida, entretanto Nitrato não estimulou a síntese de RNA ribossômico e solúvel e a indução da RN não induziu o aumento de proteínas. Isto porque talvez as proteínas sintetizadas durante a indução não seja a NR mas moduladores necessários para sua atividade.

RIES et alii (1967), verificaram que o efeito do herbicida Simazina, quando em níveis sub tóxicos, estimula o crescimento e o conteúdo em nitrogênio na planta. Também a NR aumenta de atividade quando em concentrações sub ótimas de herbicidas. Provavelmente o herbicida em concentrações sub ótimas, aumenta a utilização do nitrato, pois se

observa um aumento do total de proteína por planta. Os dados indicam que a ação do herbicida é sobre um dos passos da redução do nitrato a amônia. Possivelmente o herbicida* acelera a absorção do nitrato, o que provocaria a estimulação da atividade da NR, ou especificamente acelerando a velocidade da síntese proteica ou tornando a enzima mais estável.

FILNER (1966) trabalhando com células de fumo em cultura de tecido, encontrou uma enzima NR típica, com pH ótimo próximo de 7,5 que é específica para NADH_2 . É mais ativa com tampão fosfato do que Tris para sua extração e não influência de FAD ou FMN (3×10^{-5} M), aminoácidos (10^{-3} M) e amônia (10^{-2} M). Na ausência de cisteína no tampão extrator, nenhuma atividade foi detectada. Demonstraram os autores que o nitrato também é indutor da NR; e que aminoácidos funcionam como repressores ou depressores da NR. Enquanto que *BEEVERS (1965)*, não detectou inibição por aminoácidos, as células em cultura de tecido tiveram a NR inibidas por aminoácidos repressores (ALA, ASN, Gly, Met, Pro, Thr, Val, Asp, Glu, His, Leu) e ou induzidos por aminoácidos derrepressores (ARG e LYS).

WALLACE et alii (1967), analisando várias plantas herbáceas crescendo em solução de nitrato, encontraram na seiva, nitrato livre e muitos aminoácidos, principalmente ASN e GLN, enquanto que em *Xanthium*, a quantidade de aminoácidos foi muito baixa e a de nitrato livre foi muito alta, indicando que nesta planta o nitrato é assimilado diretamente para a seiva e transportado à parte aérea. Nas plantas examinadas, há uma indicação de que o nitrato é reduzido na raiz, exceto em *Xanthium*, que não possui o sistema redu

*Simazina é inibidora da reação de Hill

tase nas raízes, sendo este, característico da parte aérea, principalmente nos internós e pecíolos. Os autores descrevem também um modelo de redução e transporte do nitrogênio em *Xanthium* e em *Pisum arvense* L.

RANDALL (1969), estudando folhas de trigo verificou que a atividade da NR, "*in vivo*", aumenta quando as folhas são incubadas no escuro, onde se acumula nitrito, enquanto que no claro nitrito não se acumula. O pH ótimo foi 7,0 e a temperatura ótima foi de 30°C. Incubando-se as folhas em atmosfera de nitrogênio, houve um aumento na atividade de 15 a 20%. Plantas crescendo em solução com níveis crescentes de molibdênio, apresentaram também aumento na atividade da NR. A adição de Mo em plantas com crescimento normal, não apresentou resposta.

FILNER (1970), postula que a inibição dos aminoácidos é sobre a síntese de NR, pois a absorção do nitrato não foi alterada em células mutantes de fumo em cultura onde linhagem de células foram selecionadas para a resistência à inibição por aminoácidos.

KENDE et alii (1971) em embriões de *Agrostemma githago*, verificaram que a atividade da NR aumentou 50% em 1 hora após o tratamento com benziladenina e que o efeito da citocinina é sobre o aumento da atividade da redutase de nitrato diretamente e não sobre a indução da enzima pelo nitrato. Ácido abscísico tem efeito antagônico ao de benziladenina. Duas possibilidades podem ser consideradas sobre a ação da citocinina: uma de a citocinina poderia levar à ativação de uma enzima pré-existente, e segunda de que a citocinina causa o retardamento da degradação da enzima presente, na ausência do nitrato adicionado.

LEECE et alii (1972) determinaram a ocorrência

cia de NR em folhas de damasco e cereja e verificaram que am bos NADPH e FMN foram efetivos como doadores de elêtrons para a enzima, durante a extração "*in vitro*", usando PVP como agente protetor da enzima, sendo que sem um agente protetor, fenóis de baixo peso molecular inibiram a atividade da enzima.

KLEPPER et alii (1971), determinaram as fontes de NADH para a utilização durante a redução do nitrato a nitrito. Realizando ensaios "*in vivo*" e "*in vitro*", concluiram que o ensaio "*in vivo*" apresenta vantagens em relação ao "*in vitro*", pois a extração da enzima apresenta alguma dificuldade e que este procedimento dá uma indicação do nível de carboidratos na célula e sua utilização durante a redução do nitrato. Os autores empregaram intermediários do ciclo de Krebs e da glicólise para a estimulação "*in vivo*" e "*in vitro*" da enzima. Encontraram também que a incubação do ensaio enzimático deve ser no escuro pois na luz existe uma inibição da redução. Encontraram que frutose difosfato, glicose 6 fosfato e gliceraldeído 3 fosfato, são mais efetivos na indução da enzima.

Nos ensaios "*in vitro*" encontraram que Ácido 3 Fosfoglicérico quando junto com seus cofatores, levam â uma alta redução do nitrato. Juntamente ADP e AMP foram efetivos na estimulação da enzima na ausência da luz. Concluem os autores que não há diferenças evidentes entre a redução do nitrato quando NADH é adicionado ao meio ou indiretamente gerado de precursores glicolíticos. A redução do nitrato também é afetada pelo teor de CO_2 no ambiente, e que esta aumenta na presença de CO_2 . Propõem também os autores uma interrelação entre glicólise, fotossíntese e redução do nitrato. Segundo eles, a redução do nitrato ocorre no citoplasma da célula, e esta redução é dependente da energia gerada pere

los "transportadores metabólicos" que saem do cloroplasto e da glicólise, e isto levaria a um fluxo maior de carboidratos consumidos via mitocôndrio. Em plantas crescendo com nitrato quando comparadas com plantas crescendo em amônia, o nitrato poderia, via oxidação do NADH, estimular o fluxo de metabólitos para a glicólise, piruvirato e Krebs.

FERRARI (1970), em cevada, usando H_2O_{18} , resultante da redução do $KN_{18}O_3$ e medindo o nitrito resultante da redução do nitrato sob condições anaeróbicas, encontraram que a produção de nitrito foi aumentada por etanol e bisulfeto, e que o oxigênio inibe a liberação de nitrito em condições aeróbicas e que na presença do antibiótico Antimicina A, temos um aumento da atividade da Redutase de Nitrato.

Em trigo, *MINOTTI et alii (1970)*, reportaram que plântulas crescendo em solução contendo alta concentração de nitrato, excretam nitrato para a solução.

JAWORSKI (1971), em soja, demonstrou que ensaios "*in vivo*" dão melhores resultados que os ensaios "*in vitro*", e que a metodologia é muito simples, comparada com a "*in vitro*". Determinou a atividade da NR sob diferentes condições, e verificou que a anaerobiose não é necessária quando se usa propanol no tampão fosfato. O propanol e outros solventes orgânicos foram usados, e o que apresenta melhores resultados é o propanol, sendo que seu efeito seria sobre o aumento da permeabilidade celular. A maior atividade da NR "*in vivo*", deve-se ao fato de que durante a extração "*in vivo*" pode-se perder atividade por inativação durante o preparo do extrato.

SWADER e STOCKING (1971), relataram que o fenômeno da redução do nitrato está relacionado à luz, e que a enzima NR é induzida pelo substrato e isolando cloroplas

tos de *Wolffia arrhiza*, encontrou que a NR não está presente ou associada com cloroplastos isolados, pois nos estudos "*in vitro*" com cloroplastos, foram incapazes de reduzir o nitrato na presença de luz.

Comparando ensaios "*in vivo*" e "*in vitro*", *STREETER et alii* (1972) em folhas de soja, encontraram que ambos deram a mesma atividade para a Redutase de Nitrato concluem que os ensaios "*in vivo*" devem ser preferencialmente usado, pois dispensam menor tempo e são de execução mais fácil.

Em raízes e folhas de maçã, *FRITH*, 1972, encontrou que a maior atividade da NR ocorre quando plantas são crescidas em solução contendo somente nitrato como fonte nitrogenada, enquanto que em solução amoniacal, raízes não deram atividade. Quando nitrato e amônio estavam juntos na solução nutritiva, a atividade foi também diminuída.

Em soja, *HARPER e HAGEMAN* (1972) encontraram uma variação diária e estacional da atividade da Redutase de nitrato. Durante o meio do ciclo de vida da planta a enzima apresentou uma atividade maior, diminuindo no início e no final do ciclo. Também com relação à posição foliar, obtiveram uma variação da atividade da enzima sendo que as folhas mais novas e mais velhas, possuem atividade menor. Obteve-se entretanto, um acúmulo de nitrato crescente a partir do início até o fim do ciclo o que foi também acompanhado por uma fixação crescente de nitrogênio nas plantas crescendo em solução deficiente.

WALLACE e STEVENS (1972) comprovaram através de experimentos com inibidores, que ocorre uma síntese "de novo" da NR, quando plantas que foram induzidas pelo nitrato são transferidas para uma solução do nitrato, e que depois retornaram novamente à solução com mais nitrato. Também tempe

raturas elevadas afetam a atividade da Redutase de Nitrato sendo que a enzima é mais estável na raiz do que na folha. Os resultados também demonstram que as partes mais velhas tem um maior tempo "turnover" do que as partes mais novas. Encontraram também que o tempo médio do RNA mensageiro para a enzima é de 20 minutos.

A adição de clorato ao meio de células contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, resulta em inibição do crescimento, acompanhada de um clareamento parcial das células. Em células crescendo em meio contendo amônio como fonte nitrogenada, não ocorre tal inibição. Clorato e nitrato são ambos substratos para a NR, atuando ambos como inibidores competitivos. A adição de cloreto ao ensaio, resulta em uma progressiva e irreversível inibição da enzima com o tempo. *SOLOMONSON et alii (1972)*.

SHEN (1972) em plântulas de arroz, demonstrou que o nitrato induz ambas NADH e NADPH nitrato redutase, clo ranfenicol e outros compostos orgânicos como o 2,4 dinitro fenol e a paranitroanilina, também induzem a NR. Quando a enzima foi induzida por nitrato, podia aceitar elétrons mais eficientemente do NADH do que NADPH. Entretanto, quando induzida por nitrocompostos pode aceitar mais eficientemente elétrons do NADPH que NADH.

Em folhas de algodão, cuja atividade da NR foi determinada, *RADIN (1973)* encontrou que em ensaios "in vivo", o oxigênio diminui a atividade da enzima, enquanto que quando incubados com nitrato e na presença de nitrogênio, ocorre um aumento de sua atividade. Isto se dá provavelmente devido ao efeito competitivo pelo NADH. Uma segunda possibilidade é de que o oxigênio estimularia a redução do nitrato pela redutase do nitrito. A inibição pelo oxigênio não ocorre em concentrações acima de 100 mM. Também a

redução pelo nitrato aumentou na presença de arsenato sob condições aeróbicas e inibiu ligeiramente em anaerobiose.

Em folhas etioladas de feijão, *SLUITERS-SCHOLTEN* (1973) encontrou baixa atividade da NADH-nitrato oxidoreductase (EC.1.6.6.2.) detectada na presença de nitrato. Após a iluminação das folhas a atividade foi novamente detectada, não ocorrendo então indução na ausência de nitrato.

MORILLA et alii (1973) em folhas de milho encontrou que uma diminuição do potencial de água levou a uma diminuição da atividade da NR, e do conteúdo de polirribossomos nas células, mantendo-se o nível de nitrato constante. Nestas plantas após a irrigação houve um aumento do conteúdo de polirribossomos nas células, que precedeu o aumento da NR. Cicloheximida inibiu a recuperação da enzima com o aumento do potencial de água.

FRITH (1974) demonstrou que em raízes de macieira, inibidores fotossintéticos poderiam inibir a NR, não por afetar a taxa de formação do agente redutor, mas que quando a planta com deficiência de esqueletos carbônicos, amônio seria transportado na forma livre das folhas para as raízes, aumentando a concentração do íon e inibindo a atividade da enzima.

CANVIN et alii (1974) encontraram em diferentes plantas analisadas, um efeito direto da luz sobre a assimilação do nitrato, sendo esta diminuída quando plantas foram retiradas da luz. Os autores supõem uma estreita ligação da assimilação do nitrato com o transporte de elétrons fotossintéticos. Isto foi demonstrado quando plantas que foram privadas de CO₂, tiveram uma forte redução da assimilação. Amônia também tem um pequeno inibidor da assimilação de nitrato sendo que esta inibição é dependente da concentração. Também nitrito teve efeito inibidor dependente da con

centração.

BRUNETTI e HAGEMAM (1976) encontraram em trigo, uma correlação positiva entre a atividade da NR "*in vivo*" e "*in vitro*", sendo que a atividade da NR pelo método "*in vitro*" nas raízes e parte aérea foi sempre maior que "*in vivo*". Com a utilização de NADH no ensaio "*in vivo*" houve um aumento da atividade da enzima.

Cinetina tem um efeito sobre a atividade da Redutase de Nitrato provavelmente sobre uma mudança da permeabilidade da membrana. A atividade da enzima apresenta um ritmo circadiano, possuindo picos de atividade em tempos diferentes quando folhas de *Capsicum annuum* foram iluminadas continuamente (STEER, 1976).

Em várias espécies C_4 , RATHAN (1976) encontrou que a NR e outras enzimas responsáveis pela assimilação do nitrato se encontram nas células do mesófilo.

Muitos autores acreditam que a NR está relacionada apenas com o nível de nitrato na planta, e não com o conteúdo proteico do grão. PURVIS (1972), mencionado por Hagemam et alii (1976), encontraram diferenças genotípicas entre variedades, independente do conteúdo de nitrato disponível. HAGEMAM et alii (1976) calcularam os custos das determinações da Redutase de Nitrato através dos métodos "*in vitro*" e "*in vivo*", e concluíram que o método "*in vivo*" é o mais barato e que demanda menor tempo, embora neste método tenhamos uma atividade inferior ao "*in vitro*". Também os autores encontraram que a NR pode ser considerada como um fator de seleção no melhoramento genético de variedades, e que é possível obter-se cruzamentos nos quais os produtos possuam alta atividade da NR.

CHANTAROTWONG et alii (1976), encontraram em cevada, que a NR é induzida por concentrações crescentes de

nitrato, entre 0 e 5 nm, e que a partir desta concentração, a indução da enzima se mantém constante. Encontraram também uma correlação exponencial entre as atividades "*in vivo*" e "*in vitro*" da NR. Os dados obtidos pelos autores revelam que a absorção do nitrato não está diretamente relacionada com a indução da enzima, e sugerem que a velocidade de absorção do nitrato é um mecanismo regulado por fatores intrínsecos à planta.

A atividade do sistema NR em *Bracharia sp*, está relacionada positivamente com o teor de nitrato aplicado ao solo (FERNANDES e FREIRE, 1976). Os autores também sugerem a possibilidade de usar a atividade basal da NR, quando se deseja fazer uma avaliação do teor de nitrogênio da planta, independente de fatores ambientais.

Em plântulas de arroz, SASAKAWA e YAMAMOTO, (1977) encontraram que a NR teve sua atividade diminuída, quando da remoção do endosperma da semente, quando comparados com plântulas normais. A adição de açúcar exógeno, elevou o nível de atividade da NR ao normal, o mesmo acontecendo com plântulas crescendo no escuro, quando cresciam em solução de glicose, indicando uma substituição da luz pela glicose. Clorfenicol promoveu a indução da NR, enquanto que cicloeximida, azaguanina, puromicina, actinomicina D e 6-Metil purina, inibiram a sua indução, os resultados indicam que clorfenicol atua como indutor da NR, quando a planta é exposta por um breve período de tempo, e por um longo período inibidor.

SASAKAWA e YAMAMOTO (1977b), encontraram que plantas de arroz deficientes em nutrientes, tinham baixa atividade específica da NR, enquanto que micronutrientes, reduziram a atividade da NR. Deficiências de Mg e Fe, diminuíram a atividade da NR, sem alterar a taxa de absorção de nitrato. Deficiências de N, P, K e Ca, diminuíram a atividade da enzi

ma, e a absorção de nitrato. Micronutrientes, não afetaram a atividade da enzima, apesar de afetarem a absorção de nitrato, parecendo indicar que a atividade da NR não está diretamente relacionada com a concentração de nitrato na planta. Cálcio, embora estimule a absorção e translocação do nitrato, no ensaio com deficiência em Ca, houve uma diminuição da NR e NIR (MORGAN *et alii*, 1972).

✕ Em milho, OAKS *et alii* (1977) encontraram que aminoácidos têm um efeito inibidor da NR, especialmente glutamina e asparagina, que causaram uma inibição maior. Também a adição de caseína hidrolisada, inibem a NR. Os autores não encontraram uma correlação entre a acumulação de nitrato e a atividade da NR. O acúmulo e a indução da enzima também são dependentes do pH do meio de reação. Também o efeito da inibição é mais severa nas raízes maduras do que em raízes jovens. A adição de sulfato de amônio só ou com glicose, resultaram em altos níveis de NR.

MAGALHÃES *et alii* (1976), estudaram o efeito da temperatura sobre o metabolismo do nitrato e expansão foliar, verificando que na temperatura de 40°C, há uma alta atividade da NR, no primeiro dia do experimento, declinando a atividade durante o transcorrer do experimento. Encontraram também que o pico do nitrato é coincidente com o da atividade da NR, isto ocorrendo ao terceiro dia do experimento. Com o aumento de 30 para 40°C, após o terceiro dia, existe um grau maior de inativação da NR, associada com a desnaturação da enzima. Entre as enzimas que envolvem a assimilação do nitrogênio, a NR é a mais termo lábil, o que parece ser mais funcional, pois se tal fato não ocorresse, teríamos o acúmulo de nitrito ou amônia no, ou próximas ao cloroplasto.

Em *Rhizobium*, SIK e BARABÁS (1977), descreve

ram três tipos de NR; uma NR assimilatória, quando nitrato era a única fonte de N do meio, uma NR respiratória, quando no meio não aerado de *Rhizobium*, existiam além do nitrato, outros compostos nitrogenados e um terceiro tipo de NR que foi detectada em uma cultura com aminoácidos como fonte de C e N. Em mutantes de *Rhizobium*, amônia inibiu a atividade da NR, enquanto que com aminoácidos, alguns mutantes reduziram o nitrato e outros não. Tungstênio inibiu a atividade da NR, inibindo a síntese do componente Fe-Fe da nitrogenase, e o efeito inibidor foi restaurado por 50 a 100 μ M de Mo.

Os autores propõem também uma correlação entre a NR e a nitrogenase, pois o acúmulo de amônia no nódulo, inibiria a ação da nitrogenase, durante a fixação, e uma eventual transformação da amônia em nitrato, poderia eliminar o problema da inibição pela amônia.

Em soja, (DUKE *et alii* (1978)), encontraram uma periodicidade rítmica da NR. Plantas não inoculadas com *Rhizobium*, tiveram um pico máximo de atividade da NR quando no início do experimento com variação dia - noite. Em plantas inoculadas, o pico de atividade da NR apareceu durante o meio do ciclo dia - noite. A diferença entre os picos deve-se à influência da fixação do nitrogênio, uma vez que esta também tem um ritmo circadiano.

SERRA *et alii* (1978) em Diatomáceas, encontraram que tungstênio inibe a NR, isto é, a assimilação do nitrato quando este é a única fonte do elemento, pois este compete com o Mo pelo mesmo sítio da enzima, mas somente o molibdênio é funcional. Células crescendo com nitrito ou amônia, não foram inibidas por tungstênio.

TRAVIS *et alii* (1969), encontraram que cicloheximida retarda a perda da atividade da NR quando as folhas de

cevada são transferidas da luz para o escuro, e supõem que o tratamento no escuro, estimula a síntese de um sistema inativante da NR. *TISCHLER (1978)*, encontrou uma variação rítmica da NR, com tratamento de luz e escuro, e supõe que esta ritmicidade não deve-se a um fator inativante responsável pela inativação da NR, em cotilédones de algodão, mas sim à disponibilidade de nitrato ou NADH, que afetam o nível da NR, modificando sua estabilidade "*in vivo*".

Em folhas de soja, foi isolado uma proteína de peso molecular 31000, com duas subunidades idênticas, purificadas 2500 vezes, que funcionou como um inibidor da NR. O inibidor parece não ser uma protease, e atua como um inibidor não competitivo pelo nitrato, reduzindo a atividade da NR e diminuindo a velocidade máxima de reação. O inibidor também é inativo na luz e tem sua atividade restabelecida no escuro. (*JOLLY e TOLBERT, 1979*).

KADAM et alii (1974), encontraram também em raízes de arroz uma proteína inativante da Redutase do Nitrato.

Em raízes de algodão, *RADIN (1977)*, encontrou que Glicina, Asparagina e Glutamina, inibiram a indução da Nitrato Redutase, sendo que na presença de outros aminoácidos não houve inibição, sendo leucina o mais efetivo contra a inibição. Ácido glutâmico e Ácido Aspártico promoveram a indução da Redutase do Nitrato. Provavelmente as interações entre os aminoácidos na regulação e indução da Redutase do Nitrato, resultaram de dois mecanismos, um atuando sobre os aminoácidos inibidores, e os outros envolvendo um efeito antagônico.

RADIN (1973), demonstrou que a redução do nitrato nas raízes de algodão é profundamente afetada pelo fornecimento de açúcares da parte aérea quando os níveis de açúcares endógenos, diminuí nas raízes, também houve uma diminui

ção da atividade da NR. Também verificaram que a absorção de nitrato não foi afetada pelo nível de açúcar na planta.

SASAKAWA e YAMAMOTO (1977a), em arroz, determinaram que a luz não afeta a absorção de nitrato ou amônio, enquanto que a remoção do endosperma o fez. Inibidores como a cicloheximida, cianeto e arsenato inibiram a absorção do nitrato.

EAGLESHAM e HEWITT (1971) trabalhando com espinafre, verificaram que ADP exerce um efeito alostérico da Redutase do Nitrato, implicando na compartimentação da enzima. ADP e nitrito são inibidores não competitivos e AMP inibe competitivamente.

NICHOLAS et alii (1976a) encontraram que a concentração ótima de nitrato no meio de ensaio "*in vivo*" foi de 50 mM, 1% e de 100 mM de tampão fosfato a pH 7,5. Também encontraram que plantas iluminadas, quando transferidas para o escuro perderam 95% da atividade inicial, sendo que o decréscimo foi maior em temperaturas maiores. Após 24 horas de exposição à luz as plantas voltaram a ter atividade da NR original.

NICHOLAS et alii (1976b) comparando ensaios "*in vivo*" com nitrato e sem nitrato e ensaios "*in vitro*", encontrou que houve uma diminuição da NR quando as plantas foram colocadas no escuro, e que a adição de NADH ao ensaio "*in vivo*" não aumentou a atividade da NR. Entretanto, a adição de glicose, frutose 1-6 difosfato, piruvato, citrato, succinato e malato aumentaram a atividade da enzima "*in vivo*", sendo a glicose o mais efetivo.

Cloranfenicol e cicloheximida aplicada no começo da exposição à luz, inibiram a síntese da NR. No entanto, após 24 horas de iluminação cloranfenicol reduziu pouco a ati

vidade da NR. Na luz, cicloheximida inibiu a síntese mas clo^{ro}ranfenicol não. Concluíram do experimento que a enzima NR é sintetizada no citoplasma, nos ribossomos, e que é necessária para a síntese a ajuda do cloroplasto.

SLUITERS e SCHOLTEN (1975b) em folhas de fei^{jo}eiro, demonstraram que a luz induziu um aumento da atividade da NADH-Nitrato oxidoreductase (E.C.1.6.6.2) que foi coincidente com o início do desenvolvimento do cloroplasto. Em presença de DCMU na luz não houve atividade da NR, enquanto que a adição de sacarose aumentou a atividade da NR na presença de DMCU. Os autores sugerem que as reações fotossintéticas fornecem o NADH que é o doador de elétrons para a NR e que a NADH também protege a NR contra a inativação. Entretanto *KA^{NA}GARA e WOOLHOUSE (1967)* encontraram que a sacarose não pode substituir a luz na indução da enzima em folhas de *Perilla frutescens*.

SHANER e BOYER (1976a) encontram que a atividade da NR varia de acordo com o fluxo de nitrato para as fo^lhas e com o teor de nitrato nas folhas. O fluxo de nitrato foi correlacionado com a taxa de transpiração, pois com um de^{cr}êscimo da taxa de transpiração, também houve um de^{cr}êscimo da atividade da NR. Também *SHANER e BOYER (1976^b)* em milho, comprovaram a idéia de que o fluxo de nitrato regula a ati^{vi}dade da NR, e que plantas crescendo com baixo potencial de água tiveram baixa atividade da NR, e com o aumento do poten^{ci}al de água, houve um aumento da atividade da NR.

Também em milho, *NEYRA e HAGEMAM (1976)* relacionaram o teor de Malato nas folhas com a indução da NR, con^{cl}uindo que a oxidação do malato é uma das principais fonte de NADH para a redução do nitrato.

BEN ZIONI et alii (1971) propuseram que a redu^ç

ção do nitrato na parte aérea resultou de uma produção equivalente de malato. Este malato seria transportado para as raízes e sofrendo oxidação liberaria bicarbonato, que é trocado por nitrato da solução. No entanto, *HERVIS et alii* (1974) encontraram que o acúmulo do nitrato em raízes de milho está inversamente relacionado com o teor de malato.

YAMAYA e OHIRA (1976) e *YAMAYA e OHIRA* (1977) e *YAMAYA e OHIRA* (1978) estudaram o fator inativante da NR do arroz, trigo, seioja, fumo e milho e verificaram que o fator difere na sua natureza entre o milho e o arroz; e que o fator tem também uma flutuação durante o período de crescimento. Nas raízes de arroz, a atividade do fator foi de 10 a 20 vezes maior que nas folhas; e nas raízes, a atividade do fator foi 30 vezes maior em raízes jovens do que em raízes maduras. Encontraram também os autores que a flutuação do fator inativante da NR, é no sentido oposto ao da enzima, isto é, quando a atividade da NR é alta, a atividade do fator é baixa e vice-versa.

AMINDARI et alii (1978) encontraram em raízes de pepino crescendo no escuro, atividade da NR, porém não nos cotilédones, mesmo com as plântulas crescendo com nitrato. Na luz todas as partes das plântulas tinham atividade da NR, porém nas folhas a atividade foi muitas vezes maior.

Uma purificação da NR de cerca de 150 vezes e com 50% de recuperação, foi obtida por *CAMPBELL e SMARRELLI* (1978), em pepino. Também os autores descrevem uma metodologia de purificação da enzima, bem como propõem um modelo cinético de funcionamento da enzima, sugerindo também que a transferência de elétrons do NADH e a redução do NO_3 ocorrem em sítios separados.

BADIN et alii (1978) em raízes de algodão, en

contraram que a redução do nitrato é profundamente afetada pelo fornecimento de açúcares. Quando os níveis de açúcares endógenos diminuem, também ocorre uma diminuição da atividade da enzima. Entretanto, a absorção do nitrato pelas raízes não foi afetada pelo teor de açúcares endógenos.

Em feijoeiro, *FRANCO et alii* (1979), encontraram que a atividade máxima da NR ocorreu nos estádios iniciais do desenvolvimento foliar, mas a atividade total por folha, foi máxima quando as folhas atingiram tamanho maior. Os autores relacionaram a atividade da NR com a nitrogenase, e encontraram uma maior atividade da nitrogenase durante o florescimento e decrescendo rapidamente após este período. O feijoeiro foi ainda capaz de assimilar nitrato após o florescimento, pois houve um aumento da atividade da NR nas raízes e folhas. A atividade da NR foi maior por planta após o florescimento. Também a adição de NH_4NO_3 ao solo durante o florescimento produziu altos níveis da NR e alta produção de sementes.

SHERRARD e DALLING (1979), encontraram que a adição de nitrato e nitrato combinado com NADH não teve influência sobre a estabilidade da NR dependente de NADH, "in vitro". FAD teve influência não sobre a ativação, mas sobre a estabilidade da enzima. O melhor pH de incubação do meio de reação foi 7,5 sendo que uma diminuição do pH levou a uma diminuição da atividade enzimática.

DUKE e DUKE (1979) encontraram em folhas de milho deficientes em clorofila alta atividade da NR, entre 12 e 24 horas de iluminação. A iluminação de plantas com diferentes comprimentos de onda, tiveram efeitos diferentes sobre a atividade da NR e sobre o acúmulo de nitrato, indicando que os pigmentos fotossintéticos estão secundariamente envolvidos na indução da enzima.

JONES (1979) em tecidos intactos, determinou que propanol e a infiltração à vácuo diminuem a retenção de nitrito endógeno. Fragmentos de tecido liberam o nitrito localizado endogenamente em uma taxa constante e quanto menor for o tecido, maior a liberação. Também o aumento do pH de 5 para 7 aumenta a liberação do nitrito, o qual está relacionado com um aumento da atividade da NR.

CARELLI e MAGALHÃES (1979) demonstraram em soja, que cicloeximida inibe a atividade da NR, quando plantas crescendo no escuro foram submetidas à luz, enquanto que actinomicina D não teve nenhum efeito.

3.1. Efeito da Radiação Gama sobre a Atividade da Redutase do Nitrato

A radiação gama, segundo *PATT (1953)* pode atuar direta ou indiretamente sobre um material biológico. Assim, na ação direta, as moléculas sofrem modificações, quebras, sofrendo transformações, como por exemplo nas enzimas, temos a quebra das pontes de hidrogênio com ruptura de moléculas, alterando assim a estrutura terciária, alterando então o sítio ativo. Nas sementes, com conteúdo de água de 1 a 4%, temos um efeito direto da radiação, sendo este efeito sobre DNA, RNA, proteínas etc. Na ação indireta da radiação, temos que no material biológico formam-se radicais livres, sendo que estes radicais livres podem reagir com outros radicais, ou com moléculas, provocando alterações químicas no material.

Segundo *BACK e ALEXANDER (1966)*, a frequência de mutações é proporcional à dose de radiação, isto é, com o aumento da dose, temos um aumento de mutações gênicas e alterações no material genético. Entretanto, com o aumento da dose, surgem efeitos fisiológicos que podem ser letais ao organismo irradiado.

A radiosensitividade, também pode variar segundo a espécie (*SPARROW et alii, 1961*), sendo que o volume nuclear, número de cromossomos, duração do ciclo mitótico estão envolvidos. Também a radiosensitividade das sementes, pode variar segundo a fase do desenvolvimento em que se encontra a planta, ou o tecido. Sabe-se também que (*SPARROW et alii, 1962*) espécies que possuem maior número de cromossomos, tem menor radiosensibilidade ou seja, são menos sensíveis à radiação.

Também segundo *CASARETT (1968)*, o conteúdo da água afeta a radiosensitividade, ou seja, sementes com baixo ou alto teor de água são mais sensíveis à radiação do que sementes com teor de água entre 10 e 15%. Isto provavelmente está relacionado às concentrações de radicais livres nas sementes após a radiação. Nos níveis médios de umidade, a sensibilidade é mínima, devido aos radicais livres se recombinarem formando produtos que não reagem. A presença ou não de oxigênio na irradiação também pode alterar o dano causado pela radiação da semente. O oxigênio poderia levar à formação de radicais ativos e peróxidos, que aumentariam os danos genéticos e fisiológicos (*KONZAK et alii, 1961*). Na ausência do oxigênio (*ZIMMER et alii, 1957*) os radicais livres poderiam permanecer durante muito tempo, principalmente em materiais secos, e nos embriões durante vários dias.

Com relação à influência da radiação gama sobre a atividade da enzima, *GOUTIER e BACQ (1963)*, estudaram o efeito indireto da radiação e a interação com compostos sulfidrílicos, protetores da radiação. *SANNER e PHIL (1969)*, verificaram que a maioria das alterações que ocorrem durante a irradiação é sobre a desnaturação da estrutura terciária e desarranjo do sítio ativo das enzimas, com alterações na constante de *Michaelis Menten*. Também a ação da radiação em retardar o crescimento seria indiretamente através da inativação de hormônios que regulariam o crescimento do vegetal. *GUSMAN*

e CROCOMO (1974), encontraram que as doses de 5 e 35 Kr, tem um efeito derrepressor sobre a atividade da enzima peroxidase, sendo este efeito acompanhado de um aumento das áreas de tecidos transversais do estelo. A cisteína aplicada, teve um efeito estimulante no crescimento do caule, protegendo-o contra os efeitos da radiação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para os diferentes ensaios, sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L., cultivar Carioca Precoce, foram escolhidas, esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio, 5% por 10 minutos, a seguir foram mergulhadas em solução de sulfato de cálcio por 10 minutos, sob arejamento. Em seguida foram semeadas em vermiculite, em bandejas de polietileno. Após a germinação foram transferidas para bandejas maiores contendo solução nutritiva com nitrato e sem nitrato (Quadro I), sob contínuo arejamento. Nos experimentos de comparação entre cultivares, utilizamos também a cultivar Goiano Precoce), que foram submetidas ao mesmo tratamento anterior.

Para os demais experimentos de indução com nitrato, intermediários da glicólise e Ciclo de Krebs, bem como com antibióticos e hormônios, radiação γ e luz, o procedimento foi o mesmo para a germinação da semente, exceto as plântulas que ficaram na câmara de germinação durante 10 dias.

As intensidades luminosas da câmara de crescimento (Convicon, Canadá) foram determinadas e se encontram no Quadro II.

Quadro I - Composição da solução nutritiva de *HOAGLAND e ARNON* (1950).

E s t o q u e s	ml de solução estoque/litro de solução nutritiva	
	+ Nitrogênio	- Nitrogênio
\ KH_2PO_4 1 M	-	2
\ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 M	1	-
\ MgSO_4 1 M	2	2
\ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M	6	-
\ KNO_3 1 M	4	-
Micronutrientes ⁽¹⁾	1	1
Fe EDTA ⁽²⁾	1	1
\ CaCl_2 1 M	-	4
\ K_2SO_4 1 M	-	2

(1) Micronutrientes g/litro

\ H_3BO_3	2,86
\ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
\ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
\ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,022
H_2MoO_4	0,02

(2) FeEDTA - Complexo Ferro - EDTA (Ácido Etilinodiamino Tetraacético) com 24,9 g/l de sulfato de ferro $\text{II} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Quadro II - Intensidades luminosas da câmara de crescimento
(Convirom-Controlled Environments).
(1 caloria/cm² minuto = 697 μ W/cm²)

COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	Intensidades luminosas (cals/cm ² min)			
	A	B	C	D
400 a 500 Azul	0,63	1,4	3,94	3,78
600 a 700 Vermelho	0,20	0,46	1,16	1,72
700 a 800 Far Red	0,06	0,2	0,51	2,72

A - Intensidade com 30% das lâmpadas acesas.

B - Intensidade com 60% das lâmpadas acesas.

C - Intensidade com todas as lâmpadas acesas.

D - Intensidade da luz solar.

Os reagentes utilizados, e os sais minerais para a solução nutritiva continham especificações de pureza "P.A."

Durante os ensaios em câmara de crescimento, as plântulas ficaram sob fotoperíodo de 12 horas.

4.1. Ensaio nº 1

- Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da Redutase de Nitrato

Ensaio "*in vivo*", modificado de *STREETER e BOSLER (1972)*.

Discos de folhas e pedaços de raízes, pesando 0,2 gramas foram incubadas em tampão fosfato 5 mM, pH 7,0 e 0,1 M de KNO_3 . Os frascos contendo os tecidos foram tapados com rolhas de vivil, evacuados durante um minuto para se retirar o ar dos tecidos e facilitar a infiltração do tampão. A seguir foram incubados em banho maria durante uma hora a 33°C.

Após este tempo, os tubos foram destapados, retirando-se as folhas, e o meio foi analisado para se determinar o nitrito formado. Ao meio de incubação adicionou-se 1ml de sulfanilamida 1% em 1,5 N HCl para paralizar a reação e 1 ml de cloreto de naftil a 0,02% em água destilada. O conteúdo de nitrito formado foi determinado pela leitura em espectrofotômetro Beckman modelo DBG, medindo-se a absorbância a 540 nm.

As plantas usadas neste ensaio, foram obtidas por crescimento em câmara de germinação durante 4 dias, trans-

.35.

feridas para câmara de crescimento durante 6 dias crescendo com iluminação total, à temperatura média de 28°C . Após este período as plantas foram removidas da vermiculita, lavadas previamente com água destilada e transferidas para vasos contendo variações de nitrato de 0,1 M até 0,001 M de KNO_3 , onde permaneceram durante um dia sob iluminação constante e aeração, à temperatura média de 28°C . Após este tempo, as plantas foram coletadas e determinou-se a atividade da NR.

A atividade da Nitrato Redutase foi expressa em μM de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco, liberado para o meio extrator.

Todas as análises foram feitas em duplicata.

4.2. Ensaio nº 2

- Verificação do tempo de indução sobre a atividade da Redutase de Nitrato

Plântulas de feijão foram obtidas de sementes escolhidas e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 10% por 10 minutos, e plantadas em bandejas com vermiculite previamente tratadas com ácido para remoção do nitrato. Após a lavagem ácida, a vermiculita foi lavada seguidas vezes com água destilada por um dia, até que o pH final atingisse 6,5. Após a germinação das sementes, as plântulas foram removidas, lavadas em água deionizada, e colocadas em solução de nitrato de potássio 0,1 M. Logo após a indução pelo nitrato foram colhidas amostras de folhas e raízes periodicamente para a determinação da atividade da NR. As determinações foram feitas segundo metodologia já descrita no

Ensaio nº 1.

4.3. Ensaio nº 3

- *Determinação do pH ótimo do tampão de infiltração para as determinações da atividade da Redutase de Nitrato*

Sementes de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., cultivar Goiano Precoce, foram esterilizadas superficialmente, e plantadas em vermiculite, em câmara de germinação com temperatura média de 28°C. Após uma semana, as plântulas obtidas, foram transferidas para a câmara de crescimento sob iluminação total, e induzidas por uma solução de 0,1 M de nitrato de potássio. Um dia após a indução, as plantas foram colhidas, lavadas em água deionizada, e analisadas para se determinar a atividade da NR, segundo a metodologia descrita no Ensaio nº 1, exceto que o pH do tampão de infiltração variou de 4,0 a 9,0. A atividade da enzima foi expressa em μ M de nitrito formado por grama de peso fresco por hora.

4.4. Ensaio nº 4

- *Determinação da temperatura "ótima" de incubação para o ensaio da Redutase de Nitrato*

O ensaio foi realizado sob as mesmas condições do ensaio anterior, sendo que o meio de incubação da enzima foi mantido em pH 7,0, variando-se a temperatura do meio de

incubação entre 10⁰C e 45⁰C.

As atividades da enzima foi expressa em μ M de Nitrato formado por hora e por grama de peso fresco.

4.5. Ensaio nº 5

- Efeito da posição da folha na atividade da Redutase de Nitrato

Plantas de feijão germinando em vermiculite foram transferidas após 4 dias para vasos plásticos contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951), em câmara de crescimento, onde ficaram durante 20 dias a 27⁰C. Após este tempo, as folhas foram colhidas em diferentes posições e foram amostradas para se determinar a atividade da Redutase de Nitrato. No primeiro ensaio, não se levou em conta o sombreamento casual das folhas. No segundo ensaio, as folhas foram separadas umas das outras cuidadosamente, para que todas recebessem a mesma iluminação. As determinações do nitrito foram feitas segundo o método já descrito.

As atividades da enzima foram expressas em μ M de nitrito formado por grama de peso fresco por hora.

4.6. Ensaio nº 6

- Efeito do Ácido Indol Acético na indução da Redutase de Nitrato

Plântulas de feijão, *Phaseolus vulgaris*, L., cul-

tivar Goiano Precoce, crescendo durante 5 dias em vermiculite foram lavadas e transferidas para vasos contendo solução 0,02M de nitrato de potássio, como meio indutor, contendo 50 ppm e 100 ppm de Ácido Indol Acético, respectivamente. Após duas horas de indução, amostras de folhas e raízes foram coletadas e analisadas pelo método do ensaio nº 1 para se determinar a atividade da Redutase de Nitrato.

As atividades foram expressas em μM de nitrito formado por grama de peso fresco por hora.

4.7. Ensaio nº 7

- Influência da luz sobre a atividade da Redutase de Nitrato

Sementes de feijão, *Phaseolus vulgaris* L., cultivar Goiano Precoce, foram germinadas sob as condições já descritas no ensaio nº 1. Após uma semana, as plântulas foram transferidas para vasos com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) normal (Quadro I). Com duas semanas de idade, os vasos que estavam na câmara de crescimento sob intensidade luminosa máxima, foram transferidos para o escuro. Em intervalos regulares foram tomadas amostras de folhas (2º par de folíolos), para se determinar a atividade da NR. As plantas foram mantidas à temperatura de aproximadamente 26°C e sob aeração.

Após quarenta e oito horas no escuro, as plantas foram transferidas para a luz, realizando-se análises em intervalos de tempo regular, até 12 horas.

Neste ensaio, após as plantas voltarem para a luminosidade, as análises foram de folhas de plantas intactas e de plantas decapitadas, raízes de plantas normais e raízes de plantas decapitadas, para se determinar o efeito do IAA formado endogenamente na atividade de enzima. O nitrito liberado para a solução foi estimado segundo a metodologia estabelecida anteriormente.

A atividade da NR foi expressa em μM de nitrito formado por grama de peso fresco por hora.

4.8. Ensaio nº 8

- *Comparação entre dois cultivares de feijão crescendo em diferentes condições nutricionais, com relação à atividade da Redutase de Nitrato*

Plântulas de *Phaseolus vulgaris* L., cultivares Goiano Precoce e Carioca Precoce, obtidas da germinação das sementes em condições estéreis, foram transferidas para solução nutritiva, em casa de vegetação, em bandejas de 30 X 50 cm, contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) normal e deficiente em nitrogênio (Quadro I).

O pH das soluções nutritivas foi mantido aproximadamente constante (6,5), renovando-se as soluções nutritivas periodicamente.

Para as determinações da atividade da NR, foram utilizadas sempre as folhas cotiledonares e as folhas do 1º folíolo, até o fim do experimento. As análises foram feitidas.

tas tomando-se amostras aleatórias, sendo que as folhas coletadas foram cuidadosamente separadas, para se evitar o efeito do sombreamento, que poderia interferir nos resultados.

A temperatura variou entre 22 e 30°C durante o transcorrer do ensaio que ocorreu nos meses de março a maio.

4.9. Ensaio nº 9

- Efeito da dose de radiação gama sobre a atividade da Redutase de Nitrato

Sementes de feijoeiro, *Phaseolus vulgaris*, L., cultivar Goiano Precoce foram selecionadas, quanto a uniformidade, vigor e tamanho, e submetidas a diferentes doses de radiação. A intensidade de dose de exposição foi de 123,5 Krd por hora, para cada dose empregada. As doses de radiação foram 0, 10, 15, 20, 25 e 30 krd.

As irradiações foram realizadas na câmara de irradiação do CENA/ESALQ, tendo como fonte de irradiação o Cobalto-60, da fonte Gamabeam, da Nuclear Chicago.

Após a irradiação, que ocorreu na presença do ar, as sementes foram imediatamente esterilizadas superficialmente como descrito anteriormente, e plantadas em bandejas rasas, com vermiculite, sendo para cada dose foram utilizadas 100 sementes. Após a germinação das sementes em câmara escura, as bandejas transferidas para a câmara de crescimento, onde cresceram sob intensidade luminosa e temperaturas constantes (28°C).

Um dia anterior às análises da NR,

as plantas foram irrigadas com uma solução de nitrato 0,01 M.

Para a análise da Redutase de Nitrato, raízes e folhas das plantas foram destacadas, lavadas e analisadas segundo a metodologia já descrita no Ensaio nº 1, para cada dose de radiação.

4.10. Ensaio nº 10

- *Efeito de três diferentes intensidades de dose de radiação γ sobre a atividade de Redutase de Nitrato*

Irradiação das Sementes

As sementes foram irradiadas segundo as mesmas condições do ensaio anterior, variando-se apenas a intensidade de irradiação.

As sementes foram submetidas às seguintes intensidades de dose de radiação γ : 123,6 Krd/h, 190,6 Krd/h e 450,0 Krd/h.

As doses nos diferentes tratamentos foram: controle (sem irradiação), 10, 20, 30 e 50 Kr, para cada intensidade de dose de radiação acima indicada.

Análises da Redutase de Nitrato

Raízes e folhas nos diferentes tratamentos, fo

ram destacadas e analisadas para a enzima segundo a metodologia do Ensaio nº 1. Para as análises das folhas nos tratamentos mais severos de 30 e 50 Kr, foram coletadas uma quantidade de folhas seis vezes maior que nos outros níveis, uma vez que as folhas tinham tamanho bastante reduzido.

Este experimento foi repetido três vezes, com duas repetições por tratamento.

4.11. Ensaio nº 11

- *Determinação da atividade da Redutase de Nitrato sob a influência de diferentes indutores e inibidores*

Plantas de feijoeiro foram submetidas à indução por nitrato, na presença de diferentes substâncias, indutoras ou inibidoras da atividade da NR. A relação das substâncias bem como as concentrações respectivas, se encontram no Quadro III. Nestes ensaios, foram utilizadas plantas com uma semana de idade, obtidas de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., var. Goiano Precoce), cultivadas em vermiculite, submetidas as condições do ensaio nº 2, para a remoção do nitrato.

Durante o experimento, as plantas foram removidas da vermiculite, lavadas em água destilada, e mergulhadas nas diferentes soluções de indutores ou inibidores. Para se estudar o efeito dos indutores e inibidores, as raízes das plantas foram removidas no interior das soluções, ficando então apenas a parte aérea para os testes. A seguir as plantas nas soluções foram transferidas para a câmara de crescimento,

.43.

onde ficaram sob iluminação constante durante uma hora. Após transcorrido este tempo, as folhas foram destacadas, pesadas e a atividade da NR foi analisada seguindo-se a metodologia descrita no Ensaio nº 1.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima Redutase de Nitrato

Podemos observar pela Figura 1, que o aumento da concentração do nitrato indutor da NR, também levou a um aumento da atividade da Enzima, tanto nas raízes do feijoeiro, quanto nas folhas. Observamos também que a atividade da enzima é sempre maior nas folhas do que nas raízes. A melhor concentração de nitrato para a indução da enzima foi 0,05 M, que deu um aumento de Ca, 900% na atividade das folhas e 200% na atividade das raízes. A concentração de 0,1 M de nitrato determinou um decréscimo na atividade da NR, nas folhas, embora este nível em relação ao controle tivesse um aumento de 400%, para as folhas e 300% para as raízes.

Plotando-se os dados obtidos em um gráfico de duplo recíproco, pelo método de Lineweaver-Burk, obteve-se duas linhas retas, uma para a raiz e outra para a folha. Através da análise gráfica, pudemos determinar que a constante de Michaelis-Menten para as folhas é equivalente a $6,89 \times 10^{-3} \text{M}$ de NO_3 , com um coeficiente de correlação igual a $r=0,9627$ (Figura 2)

Figura 1 - Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da NR. A atividade foi expressa em µM de nitrato formado por hora e por grama de peso fresco. A atividade foi determinada nas folhas cotiledonares, com duas repetições por tratamento. R = raiz; F = folha.

Figura 2 - Determinação da Constante de Michaelis-Menten pelo método gráfico, através da transformação de Lineweaver-Burk. A atividade da enzima NR, foi expressa em μM de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco.

Nas raízes obteve-se um KM para o nitrato de $9,75 \times 10^{-4}$ M com um coeficiente de correlação igual a $r=0,7498$.

Observando-se o Quadro III, pode-se verificar que os Km encontrados para as raízes e folhas, estão dentre os citados da literatura, e sendo assim acreditamos que se pode determinar através do método "*in vivo*" a constante de Michaelis-Menten para a NR.

Todas as determinações da atividade enzimática foram feitas sempre nas mesmas folhas cotiledonares e todas as plantas possuíam a mesma idade.

5.2. Análise do Nitrato

As análises do nitrato nas raízes e folhas do feijoeiro foram realizadas na seção de Química Analítica do CENA, seguindo o método potenciométrico.

Amostras de raízes e folhas de *Phaseolus vulgaris* L., cultivar Goiano Precoce, foram homogeneizadas em água destilada. A seguir a solução foi filtrada, e no filtrado determinou-se o teor de nitrato.

Foi encontrado para as raízes a concentração de 2×10^{-4} M, e nas folhas $1,5 \times 10^{-3}$ M do nitrato.

5.3. Verificação do tempo de indução da enzima Redutase de Nitrato

Plântulas de feijoeiro foram mantidas em pre-

Quadro III - Constantes de Michaelis-Menten encontradas em plantas superiores. R- Raízes; F- Folhas.

K_M (NO_3^-)		R e f e r ê n c i a s
10^{-3} e 10^{-4}M	Folhas	BEEVERS, L. et alii (1974)
$1,1 \times 10^{-4}\text{M}$	Raízes	RAO e RAINS (1976)
$2,0$ a $3,5 \times 10^{-4}\text{M}$	Folhas	ROUSTAN et alii (1974)
$2,0 \times 10^{-4}\text{M}$	Folhas	SANDERSON e COCKING (1964)
$2,0 \times 10^{-4}\text{M}$	Folhas	SCHRADER et alii (1968)
10^{-5}M	Folhas	AFRIDI e HEWITT (1964)
$7 - 15 \times 10^{-5}\text{M}$	Folhas	CAMPBELL e SMARELLI (1978)
$9,7 \times 10^{-4}\text{M}$	Raízes	GALLO e CROCOMO (1980)
$6,8 \times 10^{-3}\text{M}$	Folhas	GALLO e CROCOMO (1980)

sença de nitrato, em tempos diferentes, sendo as análises da Redutase de Nitrato, feita após 1, 2, 3 e 4 horas. Os resultados se encontram na Figura 3. Duas cultivares de feijão, Carioca Precoce e Goiano Precoce, foram comparadas, observando-se que a NR na cultivar Carioca Precoce responde mais rapidamente à indução pelo nitrato, dando uma resposta imediata ao agente indutor. Entretanto, isto ocorre apenas nas folhas, enquanto que nas raízes a indução foi muito menor e mais demorada.

A NR em Goiano Precoce teve uma resposta mais lenta, aumentando entretanto gradualmente, tanto nas raízes como nas folhas. Na cultivar Goiano Precoce ocorreu um aumento da atividade da NR nas folhas de Ca, 28 vezes a atividade inicial após quatro horas de indução, enquanto que na cv. Carioca Precoce as folhas apresentam um aumento de 10 vezes a atividade inicial após o mesmo tempo de indução.

5.4. Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato

Variando o pH do meio de incubação da Redutase de Nitrato obteve-se que o ótimo de atividade se deu a pH 7,3, como se pode observar pela Figura 4.

Os ensaios foram conduzidos, mantendo-se a temperatura do meio de incubação em 33°C, e variando-se a faixa de pH entre 4,0 e 9,0. As plantas usadas para este ensaio tinham uma semana de idade. As análises foram feitas apenas nas folhas cotiledonares, que foram iluminadas sob intensidade luminosa constante da câmara de crescimento a 1,87 cal/cm² min de intensidade luminosa média.

Figura 3 - Verificação do tempo de indução da NR. A atividade foi determinada em plântulas com uma semana de idade que foram transferidas para uma solução com 0,1 M de nitrato. Os feijões utilizados no ensaio foram *Phaseolus vulgaris* cv. Goiano Precoce e Carioca Precoce.

Figura 4 - Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da NR. As plantas foram cultivadas em vermiculite irrigadas com uma solução de 0,1 Molar de nitrato e analisadas após uma semana. A temperatura do meio foi mantida em 30°C. Três repetições por tratamento. A atividade da enzima foi expressa em μ Moles de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco.

5.5. Efeito da temperatura do meio de incubação sobre a atividade da Redutase de Nitrato

Mantendo-se o pH do meio de incubação, constante em 7,0, a temperatura do meio de incubação variou entre 10 e 45°C, o que se pode observar pela Figura 5. Obteve-se como "ótimo", a temperatura de 33°C. Todas as condições experimentais foram semelhantes ao experimento anterior.

5.6. Determinação da atividade da NR em folhas em diferentes posições

A atividade da Redutase de Nitrato variou segundo a posição foliar. É o que se pode verificar na Figura 6, onde temos as atividades determinadas em feijoeiro com 30 dias de idades. Podemos verificar o efeito do sombreamento na atividade da NR. A atividade da enzima aumentou de maneira crescente em relação às folhas cotiledonares, e em relação às folhas trifolioladas até o ápice da planta, onde encontramos a maior atividade da enzima. Com relação ao sombreamento, verificamos que a atividade oscilou de maneira irregular, não sendo mantido um padrão na atividade da enzima.

O ensaio foi feito em câmara de crescimento com luminosidade constante, recebendo as plantas a intensidade luminosa de 5,5 cal/cm².min., e temperatura constante de 28°C.

Para o ensaio sem influência do sombreamento, as folhas do feijoeiro foram arranjadas de tal forma que todas as folhas recebessem luminosidade por igual.

Figura 5 - Efeito da temperatura do meio de incubação sobre a atividade da enzima NR. As plantas cresceram em vermiculite e foram irrigadas com uma solução 0,1 M de nitrato. Após uma semana de idade, foram analisadas e a atividade da enzima foi expressa em μMoles de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco. O pH do meio foi mantido em 7,0.

Figura 6 - Determinação da atividade da NR em diferentes posições foliares, em feijoeiro com 5 semanas de idade. A atividade da NR foi expressa em μM de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco.

----- Tratamento sem sombreamento.
 ———— Tratamento com sombreamento.

Nos ensaios com sombreamento as plantas cresceram de maneira irregular, e as folhas receberam luminosidade diferente. Ao que tudo indica, a atividade da NR varia de acordo com a idade da folha e com a posição foliar.

5.7. Efeito do Ácido Indol Acético sobre a atividade da NR

A adição de Ácido Indol Acético ao meio de indução da Redutase de Nitrato aumentou a atividade da enzima em cerca de 280% com a concentração de 50 ppm e 640% na concentração de 100 ppm, nas folhas de feijoeiro; enquanto que nas raízes observou-se uma redução da atividade da Redutase de Nitrato em relação ao controle, sendo a redução de 50% e 75%, respectivamente para as concentrações de 50 e 100 ppm de AIA (Figura 7). A concentração de nitrato no meio indutor foi de 0,002 M para que não houvesse o efeito da concentração do íon, o que poderia interferir nos resultados. A atividade detectada nas plantas crescendo sem nitrato, deve-se provavelmente ao nitrato, ou ao nitrato residual provavelmente da vermiculite, embora a mesma tenha sido submetida ao tratamento para a remoção do nitrato.

O meio de reação da enzima continha NO_3^- em todos os tratamentos a concentração de 0,1 M. Esta adição de nitrato foi necessária pois quando se realizou o ensaio sem nitrato no meio de reação, a atividade da enzima foi consideravelmente menor. O efeito do AIA formado endogenamente pelo ápice da planta, pode ser visto na Figura 8, quando plantas que estavam no escuro, e que retornaram à luz, tiveram o ápice removido. Isto provocou uma diminuição na atividade da Redutase de Nitrato, sendo que as folhas de plantas sem ápice tiveram um decréscimo de 45% na atividade da NR com relação à folha idêntica do

Figura 7 - Efeito do Ácido Indol Acético sobre a atividade da NR, em seedlings com uma semana de idade. A atividade foi determinada nas folhas cotiledonares e expressa em μMoles de nitrito formado por grama de peso fresco e por hora. Média de três repetições por tratamento.

1- - NO_2

2- + NO_3
+ IAA (50 ppm)

3- + NO_3
+ IAA (100 ppm)

controle; e 73% de redução da atividade da NR, em relação atividade de folhas jovens da planta controle.

5.8. Influência da luz na atividade da Redutase de Nitrato

A luz, segundo a literatura é imprescindível para a atividade da Redutase de Nitrato. Também neste experimento pode-se comprovar esta hipótese. Na Figura 8, encontrou-se a atividade da enzima, diminuindo, quando plantas que cresciam sob luminosidade normal da câmara de crescimento, passaram a crescer na câmara ao escuro. Observou-se que as plantas crescendo à luz e em solução completa de Hoagland e Arnon, possuem uma atividade elevada da NR de cerca de $6 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de nitrito formado por hora, por grama de peso fresco, para as folhas e $0,65 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco para as raízes.

Quando estas plantas passaram a crescer no escuro, as folhas tiveram após 48 horas, a atividade da NR diminuída para cerca de 7,5% da inicial. Com relação às raízes, a atividade da NR diminuiu para cerca de 69% da atividade inicial. Essa atividade mínima manteve-se constante durante as 48 horas no escuro.

Quando, porém, as plantas retornaram à luz, houve uma lenta recuperação da atividade da NR, e após doze horas de luz, as folhas recuperaram, 25% da atividade inicial e as folhas mais jovens 56% da atividade inicial. Nas raízes, entretanto não observou-se a recuperação da atividade enzimática.

Figura 8 - Influência da luz na atividade da NR. Plantas de feijoeiro com duas semanas de idade, crescendo em condições de luminosidade e transferidas para o escuro. Após 48 horas de escuro as plantas retornaram à luz, e a atividade da enzima foi medida em plantas intactas, e em plantas cujo ápice foi removido.

5.9. Atividade da Redutase de Nitrato durante o ciclo biológico de duas cultivares de feijão *Phaseolus vulgaris* L., cultivar Goiano Precoce e *Phaseolus vulgaris*, L., cultivar Carioca Precoce.

As análises da atividade da enzima NR durante o ciclo biológico do feijão Goiano Precoce podem ser observadas na Figura 9-A e 9-B. As atividades foram determinadas durante o ciclo de 28 dias, até o aparecimento das primeiras flores. Plantas de Goiano Precoce crescendo em solução completa de Hoagland e Arnon, tiveram um máximo de atividade nas folhas ao redor do 16º dia de ensaio, enquanto que plantas crescendo em deficiência de nitrogênio, tiveram um máximo de atividade ao redor do 14º dia de ensaio, diminuindo a seguir, até o fim do ciclo. As análises foram feitas nas folhas cotiledonares e no primeiro folíolo acima das folhas cotiledonares. Entretanto, no final do período, nas folhas novas do primeiro folíolo, quando as mesmas cresciam em presença de nitrogênio, houve um aumento significativo em relação ao início do período, o que não foi observado com as folhas cotiledonares.

As raízes analisadas tiveram uma baixa atividades da NR, tanto em plantas crescendo em solução de Hoagland e Arnon completa, quanto em solução deficiente. A atividade média durante o ciclo foi de $1,0 \times 10^{-1}$ μ M de nitrito formado por hora por grama de peso fresco, nas raízes no ensaio com deficiência de nitrogênio, tanto em raízes novas, quanto em raízes mais maduras.

Nos tratamentos em solução completa, raízes tiveram uma atividade média da enzima de $1,4 \times 10^{-1}$ μ M de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco, tanto nas raízes novas quanto nas folhas mais velhas. Com relação ao fei-

Figura 9A - A atividade da NR durante o ciclo de vida do feijoeiro, (*Phaseolus vulgaris* L., cultivar Goiano Precoco). As análises foram feitas nas raízes mais novas, mais velhas, e folhas novas e folhas velhas, e a atividade expressa em μM nitrito formado por hora e por grama de peso fresco. Média de três repetições, para cada idade. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland e Arnon normal. F.V. - folha velha; F.N. - Folha nova; R.N. - Raiz nova; R.V. - raiz velha.

Figura 9B - Atividade da NR durante o ciclo de vida do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cultivar Goiano Precoces). As análises foram feitas nas raízes mais novas, raízes mais velhas, folhas novas e folhas cotiledonares, e a atividade foi expressa em μM de nitrito formado por hora, por grama de peso fresco. Média de três repetições para cada tratamento, sendo que as plantas foram cultivadas em solução de Hoagland e Arnon, deficiente em nitrogênio. F.V. - Folha velha; F.N. - Folha nova; R.N. - Raiz nova; R.V. - Raiz velha.

feijão Carioca Precoce, verificamos que também um máximo de atividade da NR, ocorreu no 14º dia do ensaio, tendo a mesma diminuído até o fim do período, quando as plantas cresciam em solução completa de Hoagland e Arnon. (Figura 10 A). Aqui também se pode observar que as folhas mais novas do primeiro folíolo, tiveram um aumento considerável na atividade no final do ensaio.

Considerando-se as plantas deficientes em nitrogênio, observa-se pela Figura 10 B que o pico máximo de atividade ocorreu no 14º dia do ensaio, diminuindo a seguir, até o fim do período do ensaio. Porém observa-se que as folhas cotiledonares tiveram um máximo de atividade da enzima de $15,2 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco, sendo maior do que as folhas cotiledonares em solução completa ($10 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco), porém no final do período a situação se inverteu, tendo as folhas cotiledonares em solução completa uma maior atividade do que as folhas cotiledonares do tratamento com deficiência de nitrogênio. Pode-se observar também que as folhas cotiledonares em solução completa, no final do ensaio, após 28 dias, tiveram a mesma atividade que no início do ensaio aos sete dias, e que as folhas com deficiência de nitrogênio, tiveram uma redução de cerca de 55% da atividade de inicial.

Com relação às raízes, não se observou uma diferença significativa entre os tratamentos com e sem nitrogênio, sendo a atividade média em ambos os casos de $1,0 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco, tanto para raízes novas quanto para raízes mais maduras.

As curvas de crescimento do feijão Goiano Precoce e Carioca Precoce crescendo em solução completa e deficiente em nitrogênio, encontram-se na Figura 10, onde temos

Figura 10A - Atividade da NR durante o ciclo de vida do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cultivar Carioca Precoce). As análises foram feitas nas raízes mais novas, raízes mais velhas, folhas novas e folhas cotiledonares, e a atividade expressa em μ Moles de nitrito formado por hora, e por grama de peso fresco. Média de três repetições para cada idade. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland e Arnon normal.

Figura 10B - Atividade da NR durante o ciclo de vida do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L. cultivar Carioca Precoce). As análises foram feitas nas raízes mais novas, raízes mais velhas, folhas novas e folhas cotiledonares, e as atividades expressas em μ Moles de nitrito formado por hora e por grama de peso fresco. Médias de três repetições por idade. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland e Arnon deficiente em nitrogênio.

os pesos frescos durante o período do ensaio. Tanto Goiano Precoce como Carioca Precoce tiveram um crescimento quase que linear com o andamento do experimento. No entanto observa-se na Figura 11 que o feijão Carioca Precoce crescendo em solução completa foi o que maior crescimento teve no final do experimento, e que em solução deficiente foi o de menor crescimento.

Procurou-se também relacionar a atividade da NR com o crescimento da planta do feijoeiro, mas tal fato não pode ser observado, pois obteve-se uma atividade maior da enzima na metade do ciclo e uma baixa atividade no final do ciclo, onde entretanto deu-se um maior crescimento da planta.

5.10. Efeito da radiação gama sobre a atividade da Redutase de Nitrato

O efeito radiação gama pode ser vista na Figura 12, onde temos 5 diferentes doses de radiação gama sobre as sementes de feijão Goiano Precoce. As doses foram respectivamente 10, 15, 20, 25 e 30 Krd. Após uma semana de germinação das sementes, amostras de folhas e raízes foram coletadas e a atividade de NR foi determinada. Encontramos uma redução da atividade da enzima, à medida que se aumentou a dose de radiação. A análise do efeito da radiação nas folhas demonstra que as doses de 10 e 15 Krd reduziram a atividade da enzima em 8% e para as doses de 20, 25 e 30 Krd, tivemos respectivamente uma redução de 28%, 32,5% e 84,5% da atividade original.

Nas raízes, tivemos também um aumento da inativação da enzima NR com o aumento da dose de radiação. No con-

Figura 11 - Determinação dos pesos fresco do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., cvs. Carioca Precoce e Goiano Precoce) durante o ciclo de vida. Média de três repetições por planta, por tratamento. As plantas foram cultivadas em solução de Hoagland e Arnon, normal e deficientes em nitrogênio.

Figura 12 - Efeito da Radiação Gama sobre a atividade da NR. A atividade foi determinada em plântulas com uma semana de idade, crescendo em vermiculite com solução de 0,1 μ Molar de nitrato. As sementes foram irradiadas na Bomba de Cobalto-Gamabeam, da Nuclear Chicago, com uma taxa de dose de 192,5 krd por hora. Média de 6 repetições por tratamento. A atividade foi expressa em μ M de nitrito formado por grama de peso fresco por hora.

trole tivemos uma atividade equivalente a $2 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de nitrato formado por hora e por grama de peso fresco. Para as doses de 10, 15, 20, 25 e 30 Krd, tivemos, respectivamente uma diminuição da atividade de 17,5%, 30%, 30%, 62,5% e 84,5%.

O efeito do teor de umidade da semente não foi por nós considerado, pois em todas as repetições do experimento, as sementes que foram utilizadas para o plantio se encontravam em câmara fria, e após sua retirada da baixa temperatura, foram submetidas à irradiação, supondo-se então que a umidade das sementes foi a mesma para todos os tratamentos.

5.11. Efeito de três intensidades de doses de radiação gama sobre a atividade da Redutase de Nitrato

O efeito das diferentes intensidades de doses de radiação gama, sobre a atividade da NR, podem ser observados na Figura 13.

Pode-se verificar através da análise dos dados, que com o aumento da intensidade da dose, houve uma redução da atividade da NR. A atividade enzimática foi determinada, nas plântulas de uma semana de idade, irrigados com uma solução 0,01 M de nitrato para que houvesse uma indução da enzima.

O efeito das doses de radiação foi marcante tanto nas raízes quanto nas folhas, pois houve em alguns casos uma diminuição da atividade de até 90% da atividade inicial.

Para a intensidade de dose de 123,5 Krd/h, obteve-se uma redução na atividade da enzima, nas folhas, de 90% do controle e para as raízes uma redução de 80% do controle,

Figura 13 - Efeito da intensidade de dose de Radiação Gama sobre a atividade da NR. T.D.I 123,5 Krd/hora, T.D. II = 190,5 Krd/hora e T.D. III = 450,0 Krd/hora. A atividade da enzima foi expressa em μ Moles de nitrato formado por hora e por grama de peso fresco. Média de 6 repetições por tratamento. A atividade da enzima foi determinada em sementes irradiadas e planta das em vermiculte, sendo irrigadas com uma solução 0,01 M de nitrato.

para a dose de 50 krd.

Na intensidade de dose de 190,5 Krd/h, obteve-se uma diminuição da atividade nas folhas semelhante à intensidade anterior e nas raízes uma redução de 90% do controle.

Entretanto na intensidade de dose de 450 Krd/h, houve uma diminuição na atividade nas folhas de 90% do controle e nas raízes, houve todavia uma variação nas doses de 30 Kr, que parece ter aumentado a atividade da enzima em cerca de 25% em relação às doses 20 e 50 Kr.

Este fato entretanto deve ter ocasionado pela quantidade muito grande de raízes que foram necessárias para as análises, uma vez que houve uma redução maior do crescimento nas doses finais.

O efeito da radiação sobre o crescimento das plântulas de feijão, pôde ser verificado pela análise dos pesos frescos e pesos secos, nos diferentes tratamentos. Estes dados estão nas Figuras 14 e 15 e 16.

Com relação ao peso fresco, observou-se que houve nos três diferentes tratamentos um aumento, com o aumento da dose. Isto pode ser explicado, pois considerou-se a soma do peso da folha primária mais o peso dos cotilédones. Houve também com o aumento da dose, um aumento do tamanho do cotilédone que se tornou bastante verde. Entretanto com relação ao peso seco pode-se observar que nas folhas houve um aumento gradativo do peso, o que pode ser explicado pelo acréscimo de peso determinado pelo cotilédone. As plantas controle após uma semana de idade, já tinham o cotilédone bastante reduzido em tamanho, enquanto que nos tratamentos, com o aumento da dose, houve um aumento gradativo em peso dos cotilédones.

Figura 14 - Peso fresco expresso em gramas, das três taxas de doses irradiadas nas sementes do experimento nº 11. Média de 6 repetições por tratamento.

Figura 15 - Peso seco das plântulas irradiadas com três taxas de doses do experimento nº 11. Em cada taxa de dose, as sementes foram irradiadas com doses que variavam de 0 até 50 Krd.

Figura 16 - Porcentagem de peso seco das sementes irradiadas com três taxas de dose do experimento nº 11. Em cada taxa de dose as sementes foram irradiadas com doses variando entre 0 e 50 Krd.

5.12. Efeito de indutores e inibidores na atividade da Redutase de Nitrato

O resultado da ação de inibidores e indutores na ação da NR pode ser observado na Fig. 17, onde temos as diferentes variações na atividade da enzima em μM de nitrato formado por hora e por folhas. As concentrações utilizadas estão no Quadro IV.

Pela análise dos dados, pode-se observar que a adição de sulfato de amônio não diminuiu a atividade da NR como seria esperado, havendo portanto um aumento de 29% do controle na atividade, o que porém não foi significativo.

A adição do antibiótico estreptomicina provocou um estímulo na atividade enzimática de cerca de 87% em relação ao controle, enquanto que o antibiótico puromicina levou a uma diminuição de 29% na síntese da enzima.

No ensaio com indutores intermediários da glicólise obteve-se um acrêscimo na atividade enzimática.

Frutose 6-fosfato, Glicose 1-fosfato e Diidro xicetona-fosfato promoveram um aumento de cerca de 59%, 169% e 321%, respectivamente.

O intermediário do ciclo de Krebs, ácido isocítrico adicionado, inibiu a atividade da NR em cerca de 10% em relação ao controle.

Os aminoácidos glicina e ácido glutâmico, adicionados ao meio indutor promoveram um acrêscimo na atividade enzimática de cerca de 400% e 333%, respectivamente. Cisteína, entretanto, quando adicionada ao meio indutor, levou a uma diminuição na atividade da NR de cerca de 20%. Verifi

ca-se assim, que alguns aminoácidos funcionam como indutores, porém outros, como inibidores da NR.

Também a ação do aminoácido não proteico, Citrulina promoveu a indução da NR em cerca de 218%.

O efeito da adição das poliaminas; Espermina, Agmatina, Putrescina e Espermidina sobre a atividade da NR, pode ser observada na Figura 17.

A adição de Agmatina e Putrescina promoveram um acrêscimo na atividade da NR de cerca de 94% e 560%, enquanto que a adição de Espermina e Espermidina levou a uma diminuição na atividade enzimática de cerca de 10% e 5%, respectivamente.

Os reguladores de crescimento IAA, 2,4-D e Ácido Giberélico adicionados ao meio indutor da enzima, promoveram um acrêscimo de 169%, 387% e 140%, respectivamente.

Substratos	Concentração	Atividade da NR	
		$\mu\text{M NO}_2^-/\text{g.PF.h.}$	$\mu\text{M NO}_2^-/\text{folha h.}$
1 $\text{H}_2\text{O} + \text{NO}_3^-$	0,5 M	0,28	2,11
2 NH_4SO_4	0,1 M	0,3	2,74
3 Estreptomicina	1 mg/ml	0,35	3,95
4 Puromicina	15 mg/ml	0,18	1,75
5 I.A.A.	300 μM	0,44	5,69
6 Ac. Giberélico	300 μM	0,6	10,28
7 2,4 D	300 μM	0,4	5,07
8 Diidroxiacetona-Fosfato	300 μM	0,54	8,89
9 Frutose 6-Fosfato	300 μM	0,33	3,36
10 Glicose 1-Fosfato	300 μM	0,42	5,69
11 Ac. Isocítrico	300 μM	0,28	1,92
12 Glicina	300 μM	0,61	10,57
13 Cisteína	300 μM	0,26	1,71
14 Ácido Glutâmico	300 μM	0,55	9,15
15 Citrulina	300 μM	0,46	6,73
16 Espermidina	300 μM	0,28	1,92
17 Agmatina	300 μM	0,36	4,11
18 Putrescina	300 μM	0,73	14,03
19 Espermina	300 μM	0,28	2,02

Quadro IV. Concentração dos indutores e inibidores da atividade da NR em μM de NO_3^- formado por hora e por grama de peso fresco e também em μM de NO_3^- formado por hora e por folha de planta

FIG. 17. Atividade da NR sob a ação de indutores e inibidores, expressa em μM de nitrito formado por hora e por folha.

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito da concentração de nitrogênio do nitrato da atividade da Redutase de Nitrato.

São inúmeros os trabalhos encontrados na literatura que relatam sobre a inducibilidade da enzima pela absorção primária do nitrato, a Redutase de Nitrato (*BEEVERS e HAGEMAN, 1969; HEWITT, 1975*).

Também encontramos que a enzima NR é induzida pelo substrato, sendo portanto uma enzima induzível, e que deve ser sintetizada quando na presença de seu substrato, o nitrato. Encontramos em nossos experimentos que um aumento da concentração de nitrato no meio indutor, levou a um aumento da atividade enzimática.

Pela análise gráfica, verificamos que as constantes de *Michaelis-Menten* para as raízes e para as folhas estão de acordo com a literatura citada (*RAO e RAINS, 1976, ROUSTANT et alii, 1974; SANDERSON e COCKING, 1964; SCHRADER et alii, 1968 e AFRIDI e HEWITT, 1964*). *CAMPBELL e SAMARELLI, 1978*. À luz destes fatos, podemos supor então que as constantes de *Michaelis-Menten* podem ser determinadas pelo método "*in vivo*", que além de ser bastante prático, econômico, rápido

do, também é não destrutivo, podendo-se avaliar realmente a capacidade de redução do NO_3^- no vegetal.

As análises de nitrato livre nas raízes, nos revela que nas raízes temos um menor acúmulo de nitrato do que nas folhas, existindo um fluxo de nitrato das raízes em direção às folhas. Em concordância com as constantes de *Michaelis Menten*, encontramos que nas folhas temos uma maior redução do nitrato pela NR, pois temos também uma maior concentração de nitrato. Entretanto, nas raízes o fato se inverte pois temos uma menor concentração de nitrato livre e uma menor constante de *Michaelis Menten*. Então esta maior ou menor quantidade de nitrato induziria uma maior ou menor quantidade de enzima.

Ao realizarmos o trabalho com a enzima NR, procuramos também, determinar as melhores condições ou as condições ideais para a análise da enzima "*in vivo*", em feijoeiro.

6.2. Determinação das condições ideais de análise da Redutase de Nitrato

Segundo *STREETER e BOSLER (1972)*, *RADIN (1973)*, *CHANTAROTWONG (1976)*, *AMINDARI e SPLITTSTOESSER (1978)*, *KLEPPER e HAGEMAN (1971)*, *NICHOLAS et alii (1979b)*, *JONES (1979)* a NR pode ser analisada pelos métodos "*in vitro*" e "*in vivo*", sendo que ambos os métodos são reproduzíveis e possuem uma boa correlação. Para esta análise, parte das folhas ou raízes são removidas do vegetal e incubadas em tampão fosfato contendo nitrato e analisadas as concentrações de nitrito relativas, sendo que a concentração de nitrito produzido, nos dá uma idéia da atividade da enzima.

KLEPPER et alii (1971) determinaram um pH de

7,5 para o tampão fosfato (1,0 mM) com a concentração de 0,2 M de nitrato com incubação a 33°C. *AMINDARI et alii* (1978), um pH de 7,5 contendo 0,1 M de KNO_3 , 0,1 M de succinato e 0,2 M de tampão, à temperatura de 25°C. *STREETER e BOSLER* (1972) encontraram um pH 7,0 para o tampão 5 mM, com 0,1 M de KNO_3 com incubação a 30°C.

Em nossos ensaios, variou-se a concentração do tampão fosfato e mantendo-se fixa a concentração do nitrato (0,1M). Também mantendo-se fixa a concentração do tampão (0,01 M), variou-se a concentração do nitrato. Encontramos que as condições do tampão que produziram maior rendimento e atividade foram as concentrações de 0,05 M de nitrato e de fosfato a 5 mM.

Para as análises de nitrito no meio de incubação, mantivemos as condições descritas por *STREETER e BOSLER* (1972), pois não obtivemos respostas às variações de cloreto de naftil.

Com relação à infiltração à vácuo, comparando-se amostras incubadas sem vácuo e sob efeito do vácuo, obtivemos um aumento da atividade da NR, em cerca de 286%. *STREETER e BOSLER* (1972), *HARPER e HAGEMAN* (1972), *BURNETTI e HAGEMAN* (1976) e *KLEPPER et alii* (1971), também obtiveram aumento da atividade enzimática nas análises feitas sob vácuo. Todos os experimentos realizados pelo método "*in vivo*" demonstram que não só nitrito se acumula nos discos mas também difunde-se para o meio de infiltração. Quando o ensaio é realizado na ausência de nitrato, obtem-se uma baixa atividade da enzima demonstrando que o nitrato é necessário não só como indutor da enzima, mas necessário também como ativador da enzima.

KLEPPER et alii (1971) também encontraram que durante a incubação do ensaio enzimático é necessário a ausên

cia de luz, pois na luz, teríamos a redução do nitrito formado.

Utilizando estas condições de ensaio, variamos então o pH do tampão e mantivemos a temperatura de 30°C; a seguir variamos a temperatura do meio de incubação e mantivemos o pH 7,0. Encontramos que as melhores condições de ensaio da enzima, é tampão fosfato 5 mM, contendo nitrato 0,05M com pH 7,3 e ã temperatura de 33°C. A incubação deve ser feita no escuro e com infiltração a vacuo por um minuto.

6.3. A enzima Redutase de Nitrato nas folhas e raízes do feijoeiro

Foi claramente evidenciada a influência da luz na indução, ativação ou síntese da NR, como o demonstraram *ECKERSON (1932)*, *BURSTON (1943)* *EVANS e NASON (1953)*, *MENDEL e VESSER (1951)*, *HAGEMAN e FLESHER (1960)* *SANDERSON e COCKING (1963)* *BEEVER et alii (1965)*, *SWADER e STOCKING (1971)*, *SLIU*
TER-SCHOLTEN (1973; 1975b), *CANVIN et alii (1974)*, *FRITH (1974)*, *NICHOLAS et alii (1976a)*, *SASAKAWA e YAMAMOTO (1977)*, *TRAVIS et alii (1978)*, *AMINDARI et alii (1978)*, *CARELLI e MA*
GALHÃES (1979).

A idéia de que a luz é um fator importante para a ativação da enzima pode também ser comprovada. ~~Quando as~~ plantas de feijão crescendo na luz foram transferidas para o escuro, tivemos uma redução da atividade da NR nas folhas em cerca de 70% da inicial após 48 horas de tratamento no escuro. Após o retorno destas mesmas plantas ã luz, obtivemos um aumento gradativo da atividade enzimática demonstrando a idéia anterior. Também plantas de feijoeiro foram crescidas no escuro, e não se encontrou atividade detectável da referida enzima.

A ativação da enzima pela luz, seria quanto à geração de redutores necessários para o transporte de elétrons durante a redução do nitrato a nitrito. *EVANS e NASON (1953)*, demonstraram que NADPH produzido na presença da luz, é usado preferencialmente ao NADH. Também *MIFFLIN (1967)*, encontrou NADPH como cofator da enzima. Entretanto, *SCHRADER et alii (1968)* encontraram que NADH é usado como cofator da enzima, e sugerem a numeração (EC1.6.6.1.).

KESSLER (1964) indica também que, além do NADPH, outros cofatores como o NADH, FAD e o molibdênio são utilizados no transporte de elétrons durante a fotoredução do nitrato. A produção dos cofatores como o NADPH, pode ser diretamente via fotossíntese ou, indiretamente através da redução de açúcares oriundos dos cloroplastos, que produzirão o cofator via glicólise e ciclo de Krebs (*KLEPPER, 1971*).

Também *CANVIN et alii (1974)* demonstraram que plantas crescendo em atmosfera com baixa concentração de CO₂, tiveram uma forte redução da assimilação do nitrato.

Existe ainda dúvidas a respeito do verdadeiro cofator da enzima, pois muitos trabalhos concordam que tanto o NADH como o NADPH podem ser usados como cofatores, alguns acham que os dois podem também ser utilizados ao mesmo tempo.

Em relação à estrutura da enzima, muitos autores encontraram resultados diferentes. *SIK e BARABÁS (1977)* suportam a idéia de que as enzimas em número de três, dependendo de qual substrato se utiliza. *BUTZ e JACKSON (1977)* propuseram um modelo de funcionamento para a enzima e que esta poderia ter um tetrâmero associado à membrana da célula, e que a mesma estaria associada a uma ATPase, formando um complexo situado no interior da membrana.

A idéia da influência na ativação da NR, pode ser indiretamente comprovada pela adição de intermediários da glicólise e do ciclo de Krebs no meio de indução. A adição destes intermediários estimulou a atividade enzimática em muitos casos. Este estímulo deve ser com relação à produção do NADH necessário para a atividade da enzima, quando estes intermediários forem metabolizados nas plantas. Uma vez que para a síntese "de novo" da enzima há necessidade de produção de RNA mensageiro, estes intermediários poderiam também fornecer a energia para estimular esta síntese, uma vez que o nitrato está presente no meio da reação. Uma dúvida então fica para ser esclarecida; se o nitrato estiver ausente, na presença destes intermediários, a enzima seria estimulada?. Se tal ocorre, indicaria que a mesma está presente na célula na forma inativa, e que o nitrato serviria como um ativador da enzima. Se entretanto, não houver ativação da enzima, poderia ser então que o nitrato fosse o agente indutor da enzima tipo "*operon LAC*" de *Jacob e Monod*". Seria então uma enzima indutiva.

A localização da enzima também é incerta, pois além da membrana, ela foi isolada de cloroplastos e estaria então compartimentalizada.

Na presença de muitos antibióticos como cicloheximida, puromicina, cloranfenicol, estreptomicina, actinomicina D e outros, a enzima foi inibida em muitos casos, mas em outros casos houve um estímulo da atividade.

Em nosso caso pudemos verificar que o mesmo comportamento da enzima em alguns casos estimulando, em outros inibindo a atividade.

Este comportamento poderia ser explicado pela presença de inibidores de natureza proteica da NR, *JOLLY e*

TOLBERT (1978), SASAKAWA e YAMAMOTO (1977), WALLACE (1973), YAMAYA e OHIRA (1978), relataram a presença destes inibidores, produzidos no escuro, e que seriam inativos na presença da luz. Então os antibióticos que estimulam a atividade da NR poderiam atuar inibindo a síntese destes inibidores, enquanto que aqueles antibióticos que inibem a enzima, poderiam então atuar diretamente, inibindo sua síntese.

Ainda com relação à indução ou inibição da enzima, outras moléculas como os aminoácidos, podem estimular ou reprimir a síntese da NR.

Pudemos constatar que a adição de dois aminoácidos; glicina e ácido glutâmico, estimularam a enzima, enquanto que cisteína promoveu uma inibição em folhas de feijoeiro. *RADIN (1977)*, também encontrou que cisteína é inibidor da enzima, sô ou combinado com outros aminoácidos. Entre tanto, glicina e ácido glutâmico em folhas de algodão não tiveram efeito. A explicação para tais efeitos sugere a inibição pelo produto final, uma vez que o nitrato será, na planta, convertido em aminoácidos posteriormente. O mecanismo de ação da inibição ou indução não é conhecido.

Ainda também a atividade da NR pode ser aumentada, quando se aplica hormônios vegetais ou reguladores de crescimento. A aplicação de Ácido Indol Acético, 2,4-Dicloro fenoxiacético, e Ácido giberélico tiveram todos um efeito estimulante sobre a enzima.

PATRICK e WAREING (1976) encontraram que a auxina AIA, promove o transporte de metabólitos pelo caule de feijão. Isto então poderia ser uma explicação para o aumento real da atividade da enzima, uma vez que na presença de nitrato, um aumento do fluxo de nitrato poderia induzir uma maior quantidade de enzima.

Também *SHEN (1972)* encontrou que 2,4 D estimula a atividade da NR.

STEER (1972) encontrou que cinetina aplicada exógenamente estimula a NR, por um aumento da permeabilidade da membrana.

Este aumento da permeabilidade da membrana, assim permitiria uma assimilação maior do nitrato, que então estimularia a enzima determinando uma maior atividade da mesma.

Em plantas decapitadas, quando submetidas ao nitrato, ocorreu uma menor indução na atividade da enzima, com relação às plantas normais. Este fato poderia ser explicado pelo efeito da produção da auxina pelo ápice, aumentando o fluxo de NO_3^- para a parte aérea.

O efeito do ácido giberélico em aumentar a atividade da NR, talvez seja devido ao aumento na síntese de RNA segundo afirmou *JOHRI e VARNER (1968)* o que aumentaria a síntese da enzima na célula. Além da NR, também a alfa amilase é estimulada pela adição do ácido giberélico. Esta seria uma outra via indireta do estímulo para a enzima, uma vez que a glicose produzida pela hidrólise do amido, seria metabolizada e produziria o NADH necessário para a indução da enzima.

Obtivemos um aumento considerável da atividade enzimática com a aplicação exógena de Ácido giberélico, da ordem de 380% da inicial.

A enzima NR nas plântulas do feijoeiro, se encontra distribuída pelos diferentes órgãos da planta, sendo que esta distribuição é sempre maior na parte aérea. Também esta distribuição varia com a idade do órgão. Em plantas no estágio de florescimento, possuem uma distribuição crescente com relação às folhas mais velhas para as mais novas. Encon

tramos que em plantas onde as folhas não estavam sobreadas houve um efeito da luz sobre a posição foliar. Quando as folhas se apresentaram com sombreamento casual, a atividade da NR teve uma variação irregular.

Também HARPER e HAGEMAN (1972) encontraram um perfil diário para a atividade da NR, onde a atividade foi menor nas folhas localizadas na parte inferior da planta, crescendo em relação ao ápice da planta. Os mesmos resultados também foram encontrados por FRANCO *et alii* (1970).

Encontramos também que a atividade da NR diminui com o envelhecimento do feijoeiro, onde no fim do ciclo temos uma diminuição da atividade da enzima, e durante o meio do ciclo é máxima. Também a temperatura tem influência sobre a atividade da enzima na folha, sendo que em menores temperaturas, temos uma menor atividade e plantas crescendo a 40°C tiveram uma maior atividade enzimática (MAGALHÃES *et alii*, 1976). A enzima apresenta assim além de uma atividade rítmica circadiana diária, também possui uma atividade rítmica estacional, que varia com a idade da planta.

Com relação à maior atividade da enzima nas folhas mais novas, tal fato poderia ser explicado, pois teríamos uma maior intensidade de síntese de proteínas, uma vez que a planta, isto é, a folha está em expansão. À medida que a folha envelhece a atividade de síntese deverá então decair com o tempo. Provavelmente com relação à maior atividade da enzima durante o meio do ciclo, poderíamos imaginar que a planta está se preparando para a produção de sementes, e isto levaria então ao acúmulo de reservas por parte da planta. A planta nesta fase teria talvez uma redução na absorção de nutrientes, e consequentemente teríamos uma redução na quantidade de nitrato disponível levando então à uma redução da atividade enzimática.

Tal fato poderia ser também explicado por uma diminuição da taxa fotossintética na planta, devido ao envelhecimento das folhas.

Também fatores internos à planta podem afetar a atividade da enzima, como por exemplo a remoção de cotilêdones das plantas (*CARELLI e MAGALHÃES, 1979*) ou a remoção do endosperma (*SASAKAWA e YAMAMOTO, 1977*).

Com relação ao tempo de indução da enzima vericamos que sua atividade aumento com o tempo de exposição ao íon nitrato. Quando são comparadas as duas cultivares de feijão Goiano Precoce e Carioca Precoce, pode-se notar que existe uma pequena variação não significativa quanto à indução da enzima. Observa-se que a cv. Goiano Precoce tem uma resposta mais lenta no início, mas no final de 4 horas a resposta é mais rápida. Na cv. Carioca Precoce, embora a resposta inicial seja mais rápida, nas raízes a indução é mais lenta, porém nas folhas, a indução foi maior do que nas folhas do outro cultivar.

Este fato parece evidenciar que deve existir na cultivar Carioca Precoce, um transporte mais rápido via xilema, das raízes para as folhas do íon nitrato. Isto levaria então a uma menor indução nas raízes e uma maior indução nas folhas. Na cultivar Goiano Precoce, o fluxo de nitrato parece ser mais lento, o que provocaria uma indução proporcional nas raízes e folhas.

A adição dos aminoácidos; citrulina e das poliaminas agmatina e putrecina, promoveu um aumento relativo na atividade da Redutase de Nitrato.

Entretanto, a adição das poliaminas espermina e espermidina não resultaram em efeito estimulante ou inibi

dor sobre a atividade enzimática.

Todavia os dados encontrados não foram conclusivos, tornando-se então necessários futuros experimentos para a explicação dos mesmos.

6.4. Ação da Radiação γ sobre a enzima Redutase de Nitrato.

O efeito da radiação γ sobre a ação da Redutase de Nitrato, foi bastante evidente principalmente com relação as doses de 30 e 50 krad.

Também a radiação γ provocou uma inibição bastante grande do crescimento nas dosagens utilizadas. Entretanto, não se observou nenhum efeito entre as diferentes intensidades de dose utilizadas sobre a atividade da enzima e sobre o crescimento da planta.

O efeito da radiação γ seria então sobre a formação de radicais livres que produziriam alterações nas estruturas terciárias e quaternárias da enzima, provocando então sua inibição. *SANNER e PHIL (1969)* confirmaram a hipótese de que a radiação γ induziria alterações nos sítios ativos das enzimas. Também o efeito da radiação γ estaria relacionado à inativação de hormônios que regulariam a atividade da enzima.

7. CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos nos permite concluir que de acordo com a metodologia empregada, a enzima Redutase de Nitrato, em plantas de feijão sofre o efeito de muitos fatores ambientais.

A melhor metodologia para se ensaiar a enzima em condições "*in vivo*", é a de incubar o ensaio enzimático utilizando-se tampão fosfato na concentração 0,05 M, contendo também nitrato na concentração de 0,05 M. O pH do meio deve ser ao redor de 7,3. A mistura de reação deve ser incubado em banho maria à temperatura de 30°C, e ao abrigo da luz.

A enzima possui atividade variável com a idade da planta, sendo esta maior no período que precede o florescimento talvez por uma menor assimilação de nitrato pela planta. A idade da folha também influencia na atividade da enzima, sendo que folhas mais novas possuem uma atividade maior. Plantas crescendo no escuro não tem atividade da enzima, porém a adição de intermediários da glicólise promoveu um aumento significativo em sua atividade.

A enzima é induzível pelo substrato, e possui

um Km de $6,8 \times 10^{-3}M$ para as folhas e de $9,7 \times 10^{-4}M$ para as raízes, sendo que as raízes possuem sempre uma menor atividade da enzima.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação à atividade da NR, quando foram comparados cultivares de feijão; todavia a cultivar Carioca Precoce foi a que melhor resposta apresentou quando na presença do nitrato.

Antibióticos inibidores da síntese proteica, puromicina e estreptomicina, atuaram de maneiras distintas, o primeiro não afetando a enzima e outro promovendo sua síntese.

A atividade da enzima é controlada por reguladores de crescimento, IAA, 2,4-D e ácido giberélico que atuam direta ou indiretamente.

O efeito da adição de aminoácidos e poliaminas não foram conclusivos, tornando-se necessário estudá-los melhor.

A enzima NR também sobre o efeito da radiação γ , sendo que ocorre uma inativação crescente com o aumento da dose.

8. SUMMARY

The objective of this work is a determination of physic and chemical parameters that influence Nitrate Reductase activity in bean seedlings. This enzyme is perhaps more important than enzymes of the nitrogen metabolism, because it represents the initial point of the assimilation of Nitrate-N.

Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Goiano Precoce e Carioca Precoce, were supplied by the Secção de Radiogenética of CENA-Piracicaba-SP.

The experiments were conducted in the greenhouse of the Setor de Bioquímica de Plantas do CENA.

The data in the different assays demonstrate that the enzyme is induced by substrate and has single optimal pH and temperature for incubation of 7,3 and 33°C respectively.

The *MICHAELIS - MENTEN* constant for the nitrate was determined in the leaves ($6,8 \times 10^{-3}$ M) and in the roots ($9,7 \times 10^{-4}$ M).

The activity of NR changes with the age of the plant, having maximal activity before flowering of the cultivars. The activity of NR also changes according to the position of

the leaves in the plant, showing that the shaded leaves present low enzyme activity.

The activity of NR varies with the age of the leaves and the young leaves have more activity than the others.

Another parameter that regulated the enzyme activity is the light. Plants growing in the light, and then transferred to the dark, had the NR decreased. Furthermore, when the plants were returned to light, after 48 hours in the dark, the NR activity recovered.

The effect of inducers and inhibitors of NR was also investigated. The addition of intermediates of glycolysis promoted an increase of NR activity. The addition of Isocitric Acid did not have any effect in the induction or inhibition of the enzyme.

The growth regulators, Gibberellic Acid, and 2,4,D also promoted an increase of enzyme activity. The auxin Indol Acetic Acid, with increase of concentration, promoted an increase of enzyme activity.

The addition of the aminoacids, glycine and Glutamic Acid, induced an increase of NR activity, and Cysteine decreased it. Also the addition of citrullin, arginine and putrescine, to the induction medium, increased enzyme activity, Spermine and Spermidine did not increase the activity. However Irradiation with different intensities of Gamma irradiation, did not have any effect on enzyme activity. However in relation to dose radiation with increase dosage there was a proportional inactivation of the enzyme.

These results confirm that the NR activity varies according to the physiological and environmental conditions, that the plant and it was necessary to establish the best conditions of assay the enzyme.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFRIDI, M.R.K. e E.J. HEWITT. 1964. The inducible formation and stability of nitrate reductase in higher plants. *Journ. Exp. Bot.*, 15:251-271.
- AMINDARI, S., DIR, M.A. e W.E. SPLITTSTOSSER. 1978. Induction of nitrate reductase in pumpkin seedlings. *Plant and Cell Physiol.*, 19(2):299-302.
- ASLAN, M. e A. OAKS. 1975. Effect of glucose on the induction of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 56:634-639.
- ASHLEY, D.A., W.A. JACKSON e R.J. VOLK. 1975. Nitrate uptake and assimilation by wheat seedlings during initial exposure to nitrate. *Plant Physiol.*, 55:1102-1106.
- BACQ, Z.M. e ALEXANDER, P. 1966. Interaction of ionizing radiation with matter. In *Fundamental of Radiobiology*, vol. 5, chap. I, pg.562. Pergamon Press, London.
- BEEVERS, L., D.M. PETERSON, J.C. SHANON e R.H. HAGEMAM. 1963. Comparatives effects of 2,4-dichlorophenoxyiacetic acid on nitrate metabolism in corn. *Plant Physiol.*, 38:675-679.

- BEEVERS, L. 1964. Studies on the pyridine nucleotide specificity on nitrate reductase in higher plants and its relations to sulfhydryl level. *Biochem. Biophys. Acta.*, 89:453-464.
- BEEVERS, L., L.E. SHRADER, D. FLESHER e R.H. HAGEMAN. 1965. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledone in maize seedlings. *Plant Physiol.*, 40:691-698.
- BEEVERS, L. e R.H. HAGEMAN. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20:459-523.
- BEN-ZIONI, A., Y. VAADIA e S.H. LIPS. 1971. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol. Plant.*, 24:288-290.
- BERGENSEN, F.J. 1961. Nitrate reductase in soybeans nodules. *Biochem. Biophys. Acta*, 52:206-207.
- BLEVINS, D.G., R.H. LOWE e L. STAPLES. 1976. Nitrate reductase in barley roots under sterile low oxygen conditions. *Plant Physiol.*, 57:458-459.
- BRUNETTI, N. e HAGEMAN, R.H. 1976. Comparison of "in vivo" and "in vitro" assays of nitrate reductase in wheat (*triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 58:583-587.
- BUTZ, R.G. e W.A. JACKSON. 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochem.*, 16:409-417.

- CAMPBELL, W.H. e J. SMARELLI Jr. 1978. Purification and kinetics of higher plant NADH: Nitrate Reductase. *Plant physiol.*, 61:611-616.
- CANVIN, D.T. e C.A. ATKINS. 1974. Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves effect of light, carbon dioxide and oxigen. *Planta*, 116:207-224.
- CARELLI, M.L. e A.C. MAGALHÃES. 1979. Partitioning of nitrate reductase activity in chlorophyllous tissues of soybean seedlings. *Plant Physiol.*, 63:25.
- CARDENAS, J., J. RIVAS, A. PANEQUE e M. LOSADA. 1971. Molybdenum and the nitrate-reducing system from *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.*, 79:367-376.
- CARDENAS, J., J. RIVAS, A. PANEQUE e M. LOSADA. 1972. Effect of iron supply on the activities of the nitrate-reducing system from *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.*, 81:260-263.
- CARTWRIGHT, P.M. 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.*, 31:309-321.
- CASARETT, A.P. 1968. Effects of radiation on higher plants and plant communities. In *Radiation Biology*. Part 13, pg.284-314. Prentice Hall Inc. N. Jersey.
- CHANTAROTWONG, W.R.R.C. RUFFAKER, B.L. MILLER e R.C. GRANSTEDT. 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.

- CHENIAE, G. e H.J. EVANS. 1960. Physiological studies on nodule-nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 35:454-462.
- DUKE, S.H., J.W. FRIEDRICH, L.E. SCHRADER e W. KOUKKARI. 1978. Oscillations in the activities of enzymes of nitrate reduction and ammonia assimilation in *Glicine max* and *Zea mays*. *Physiol. Plant*, 42:269-276.
- DUKE, S.H. e S.O. DUKE. 1979. The photosynthetic independence of light induced nitrate reductase activity. *Plant Physiol.* 63:45.
- CRUZ, C.A.M. 1977. Influência de alguns fatores ambientais nos estágios de crescimento e desenvolvimento do feijão. Boletim Técnico nº 3. EMATER-PE.
- EAGLESHAM, A.R.J. e E.J. HEWITT. 1971. Kinetics and inhibition by adenosine phosphates and nitrate of nitrate reductase from *Spinacea oleracea* L. *Biochem. Journ.*, 122:18-19.
- EVANS, H.J. e A. NASON. 1953. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, 28:233-254.
- FERNANDES, M.S. e L.R. FREIRE. 1976. Efeitos do nitrogênio nítrico aplicado ao solo na atividade da nitrato reductase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaría* sp. *Turrialba*, 26:268-273.
- PHILIP, F. 1966. Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 118:299-310.

- FILNER, P. e Y.M. HEIMER. 1970. Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells (II). *Biochem. Biophys. Acta*, 215:152-165.
- FILNER, P. e Y.M. HEIMER. 1971. Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells (III). *Biochem. Biophys. Acta.*, 230:362-372.
- FERRARI, T.E. e J.E. VARNER. 1970. Control of nitrate reductase activity in barley aleurone layers. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 65:729-736.
- FRANCO, A.A., J.C. PEREIRA e C. NEYRA. 1979. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Physiol.*, 63:421-424.
- FRITH, G.J.T. 1972. Effect of ammonium nutrition on the activity of nitrate reductase in the roots of apples seedlings. *Plant and Cell Physiol.*, 13:1085-1090.
- FRITH, G.J.T. 1974. Light stimulated activity of nitrate reductase in apples roots. *Plant and Cell Physiol.*, 15:152-155.
- GIBSON, A.H. 1971. Factors in the physical and biological environments affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. *Plant and Soil.*, vol. esp. 139-152.
- GOUTIER, R. e Z.M. BACQ. 1963. Inhibition due to radiation. In *Metabolic inhibition*. Ed. R.M. Rochester e J.M. Quastel. Acad. Press, N. York, vol.II, pg.631-650.

- GUSMAM, A.B. e O.J. CROCOMO. 1974. Efeitos da interação gama X Cisteína em seedlings de ervilha. Bol. Científico, CENA nº 20.
- HAGEMAN, R.H. e D. FLESHER. 1960. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content in nutrient media. *Plant Physiol.*, 35:700-708.
- HAGEMAN, R.H., D. FLESHER e A. GITTER. 1961. Diurnal variations and other light effects influencing the activity of reductase and nitrogen metabolism in corn. *Crop. Scienc.* 1:201-204.
- HAGEMAN, R.H. e P.D. HUCKLESBY. 1971. Nitrate reductase from plants. In *Methods in Enzim*, 17A:491-503.
- HAGEMAN, R.H., R.J. LAMBERT e D. LOUSSAERT, M. DALLING e L.A. KLEPPER. 1976. Nitrate and nitrate reductase as factors limiting protein synthesis. Proc. of a Workshop-Genetic Improvement of Seed Protein. Nac. Acad. Scienc.,
- HARPER, J.E. e G.M. PAULSEN. 1969a. Nitrogen assimilation and protein synthesis in wheat seedlings as affected by mineral nutrition (I). *Plant Physiol.*, 44:69-74.
- HARPER, J.E. e G.M. PAULSEN. 1969b. Nitrogen assimilation and protein synthesis in wheat seedlings as affected by mineral nutrition (II). *Plant Physiol.*, 44:636-640.
- HARPER, J.E. e R.H. HAGEMAN. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glicine max.* Merr.). *Plant Physiol.*, 49:146-154.

- HEWITT, E.J. 1975. Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26:73-100.
- HOAGLAND, B.R. e D.I. ARNON. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. St. California Circ. 347.
- INGLE, J.K., W. JOY e R.H. HAGEMAN. 1966. The regulation of activity of the enzymes involved in the assimilation of nitrate by higher plants. *Biochem. Journ.*, 100:577-588.
- INGLE, J. 1968. Nucleic acids and protein synthesis associated with the induction of nitrate reductase activity in radish cotyledons. *Biochem. Jour.*, 108:715-724.
- IRANZO, B.O. e W.H. CAMPBELL. 1979. Characterization of nitrate reductase from soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 63:43.
- JAWORSKY, G.E. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 46:1274-1279.
- JOLLY, S.O. e N.E. TOLBERT. 1978. NADH-nitrate reductase inhibition from soybean leaves. *Plant Physiol.*, 62:197-203.
- JONES, R.W. 1979. Release of endogenous NO_2^- in anaerobic intact tissue nitrate reduction. *Plant Physiol.*, 63:25.
- JORDAN, W.R. e R.C. HUFFACKER. 1972. Influence of age and light on the distribution and development nitrate reductase in greening barley leaves. *Plant Physiol.*, 44:110-114.

- KADAN, S.S., A.P. GANDHI, S.K. SAHENEY e M.S. NAIK. 1974. Inhibition of nitrate reductase in the roots of rice seedlings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH. *Biochem. Biophys. Acta.*, 350:162-170.
- KANANGARA, C.G. e H.W. WOOLHOUSE. 1957. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perilla frutescens*. *New Phytologist.*, 66:553-561.
- KENDE, H., H. HAHN e S.E. KAYS. 1971. Enhancement of nitrate reductase activity by benzyladenine in *Agrostemma githago*. *Plant Physiol.*, 48:702-706.
- KENDE, H. e T.C. SHEN. 1972. Nitrate reductase in *Agrostemma githago*. Comparison of the inductive effects of nitrate and cytokinins. *Biochem. Biophys. Acta*, 286:118-125.
- KESSLER, E. 1964. Nitrate assimilation by plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 15:57-72.
- KLEPPER, L., D. FLESHER e R.H. HAGEMAN. 1969. The occurrence of nitrate reductase in apple leaves. *Plant Physiol.*, 44:110-114.
- KLEPPER, L., D. FLESHER e R.H. HAGEMAN. 1971. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, 48:580-590.
- KLEPPER, L. 1974. Nitrate reductase and its role in the accumulation of protein in the grain of wheat. Reunião Latino Americana de trigo. Porto Alegre-Br. 446pgs.

- KONZAK, C.F., NILAN, A., LEGAULT, R.R. e HEIMER, R.E. 1961. Modification of induced genetic damage in seeds. In Effects of ionizing radiation on seeds. pg.161. Proc. of a symposium. IAEA/FAO.
- LEA, P.J. e B.J. MIFLIN. 1974. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251:614-616.
- LEECE, D.R., D.R. DILLEY e A.L. KENWORTHY. 1972. The occurrence of nitrate reductase in leaves of *Prunus* sp. *Plant Physiol.*, 49:725-728.
- LOSADA, M., J.M. RAMIREZ, A. PANEQUE e F.F. DELCAMPO. 1965. Light and dark reduction of nitrate in a reconstituted chloroplast system. *Biochem. Biophys. Acta.*, 109:86-96.
- MAGALHÃES, A.C., D.B. PETERS e R.H. HAGEMAM. 1976. Influence of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (*Glycine max* L. Merr.) seedlings. *Plant Physiol.* 58:12-16.
- MAGALHÃES, A.C. 1976. Effect of root temperature on nitrate reduction in the soybean plants. *Ciência e Cultura*, 29:63-65.
- MATTAS, R.E. e A.W. PAULI. 1965. Trends in nitrate reduction and N fraction in young corn plants during heat and moisture stress. *Crop Science*, 5:181-184.
- MENDEL, J.L. e VESSER, D.W. 1951. Studies on nitrate reduction in higher plants (I). *Arch. Bioch. Biophys.*, 32:158-169.

- MIFLIN, B.J. 1967. Distribution of nitrate reductase and nitrite reductase in barley. *Nature*, 214:1133-1134.
- MIFLIN, B.J. 1970. Studies on the sub cellular location of the particulate nitrate reductase, glutamic dehydrogenase and other enzymes in barley roots. *Planta*, 93:160-170.
- MIFLIN, B.J. 1974. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino-acids biosynthesis in the plastids of roots leaves. *Plant Physiol.*, 54:550-555.
- MINOTTI, P.L. e W.A. JACKSON. 1970. Nitrate reduction in the roots and shoots of wheat seedlings. *Planta*, 95:36-44.
- MORILLA, C.A., J.S. BOYER e R.H. HAGEMAN. 1973. Nitrate reductase and polyribossomal content of corn having low leaf water potentials. *Plant Physiol.*, 51:817-824.
- MORRISON, S.L., R.C. HUFFAKER e R.S. LOOMIS. 1979. Photosynthesis and nitrate reduction in leaf slices of barley. *Plant Physiol.*, 63:46.
- NEYRA, C.A. e R.H. HAGEMAN. 1976. Relationship between carbon dioxide malate and nitrate accumulation and reduction in corn seedlings. *Plant Physiol.*, 58:726-730.
- NICHOLAS, J.C., J.E. HARPER e R.H. HAGEMAN. 1976a. Nitrate reductase in soybeans. I- Effect of light and temperature. *Plant Physiol.*, 58:731-735.
- NICHOLAS, J.C., J.E. HARPER e R.H. HAGEMAN. 1976b. Nitrate reductase in soybeans. II- Energy limitations. *Plant Physiol.*, 58:736-739.

- NITSOS, R.E. e H.J. EVANS. 1966. Effects of univalent cation on the inductive formation of nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 41:1499-1504.
- OAKS, A., W. WALLACE e D. STEVENS. 1972. Synthesis and turnover of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 50:649-654.
- OAKS, A., M. ASLAM e I. BOESEL. 1977. Ammonium and amino-acids as regulators of nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol.*, 59:391-394.
- PANEQUE, A. 1965. Flavin nucleotide reductase from spinach. *Biochem. Biophys. Acta*, 109:79-85.
- PATE, J.S. e W. WALLACE. 1964. Movement of assimilated nitrogen from the roots systems on the field pea. *Ann. Bot.*, 28:83-90.
- PATRICK, J.W. e P.F. WAREING. 1976. Auxin promoted transport of metabolites in stems of *Phaseolus vulgaris* L. *Journ. Exp. Bot.*, 27:969-982.
- PATT, H.M. 1953. Protective mechanism in ionizing radiation injury. *Physiol. Rev.*, 33:35-76.
- RADIN, J.W. 1973. "In vivo" assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. *Plant Physiol.*, 51:332-336.
- RADIN, J.W. 1975. Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. *Plant Physiol.*, 55:178-182.

- RADIN, J.W.* 1977. Amino acids interactions in the regulation of nitrate reductase induction in cotton root tips. *Plant Physiol.*, 60:467-469.
- RADIN, J.W., L.L. PARKER e C.R. SELL.* 1978. Partitioning of sugars between growth and nitrate reduction in cotton roots. *Plant Physiol.*, 62:550-553.
- RANDALL, P.J.* 1969. Changes in nitrate and nitrate reductase levels on restoration of molybdenum to molybdenum deficient plants. *Austr. J. Agric. Res.*, 20:635-642.
- RAO, K.P. e D.W. RAINS.* 1976. Nitrate absorption by barley: II- Influence of nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 57:59-62.
- RATHNAM, C.K.M. e G.E. EDWARDS.* 1976. Distribution of nitrate assimilating enzymes between mesophyll protoplasts and bundle sheath cell in leaves of three groups of C_4 plants. *Plant Physiol.*, 57:881-885.
- ROTH, B.N. e S.H. LIPS.* 1970. Seasonal characteristics of daily fluctuation in nitrate reductase. *Physiol. Plant*, 23:530-535.
- SANDERSON, G.W. e E.C. COCKING.* 1964. Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I- Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Physiol.*, 39:416-422.
- SANNER, T. e A. PIHL.* 1969. Fundamentals of enzyme inactivation by ionizing radiation. In Enzymological aspects of food irradiation. Proc. of a Pannel. IAEA. Viena.

- SASAKAWA, H. e Y. YAMAMOTO. 1977a. Influence of some internal and external conditions on the induction of nitrate reductase in rice seedlings. *Plant and Cell Physiol.*, 18:207-214.
- SASAKAWA, H. e Y. YAMAMOTO. 1977b. Nitrate assimilation in rice seedlings as affected by mineral nutrition. *Plant and Cell Physiol.*, 18:215-224.
- SCHRADER, L.E., G.L. RITENOUR, G.L. EILRICH e R.H. HAGEMAM. 1968. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.*, 43:930-940.
- SERRA, J.L., M.J. LLAMA e E. CARDENAS. 1978. Nitrate utilization by the Diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Physiol.*, 62:987-990.
- SHANER, D.L. e J.S. BOYER. 1976a. Nitrate reductase activity in maize leaves (*Zea mays* L.). I- Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.*, 58:499-504.
- SHANER, D.L. e J.S. BOYER. 1976b. Nitrate reductase activity in maize leaves (*Zea mays* L.). II- Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.*, 58:505-509.
- SHEN, T.C. 1972. Nitrate reductase of rice seedlings and its induction by organic nitro compounds. *Plant Physiol.*, 49:546-549.
- SIK, T. e I. BARABAS. 1977. The correlation of nitrate reductase and nitrogenase in *Rhizobium* symbiosis. Proc. Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Wash. Univ. Press., 2:374-392.

- SLUITERS-SCHOLTEN, C.M.Th.* 1973. Effect of Chloranfenicol and cycloheximide on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in bean leaves. *Planta*, 113:229-240.
- SLUITERS-SCHOLTEN, C.M.Th.* 1975. Photosynthesis and the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in bean leaves. *Planta*, 123:175-184.
- SOLOMONSON, L.P.* 1974. Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide. *Biochim. Biophys.*, 341:297-308.
- SOLOMONSON, L.P. e A.M. SPEHAR.* 1977. Model for regulation of nitrate assimilation. *Nature*:373-375.
- SPARROW, A.H., CUANY, R.L. MISCHÉ, P. e SHAIRER, L.A.* 1961. Some factors affecting the responses of plant to acute and chronic radiation exposures. In "Effects of Ionizing radiation on seeds. pp.287-290. Proc. of a Symposium, IAEA/FAO.
- STEER, B.T.* 1976. Rhythmic nitrate reductase activity in leaves of *Capsicum annuum* L. and the influence of kinetin. *Plant Physiol.*, 57:928-932.
- STREETTER, J.G. e M.E. BOESLER.* 1972. Comparison of "in vivo" and "in vitro" assays for nitrate reductase in soybeans leaves. *Plant Physiol.*, 49:448-450.
- SWADER, J.A. e C.R. STOCKING.* 1971. Nitrate and nitrite reduction by *Wolffia arrhiza*. *Plant Physiol.*, 47:189-191.

- TANNER, J.W. e D.E. HUME. 1975. The use of growth chambers in soybean research. In World Soybean Research Conference, Champaign, USA, 342-351.
- TISCHLER, C.R., A.C. PURVIS e W.R. JORDAN. 1978. Factors involved in "in vitro" stabilization of nitrate reductase from cotton cotyledons. *Plant Physiol.*, 61:714-717.
- VEGA, J.M., J. HERRERA, P.J. APARICIO, A. PANEQUE e M. LOSADA. 1971. Role of molybdenum in nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 48:294-299.
- VILLALOBOS, E. e F.J. CARVAJAL. 1977. La actividad de la reductase del nitrato como guia de la fertilization nitrogenada de cinco especies agrícolas. *Agron. Cost.*, 1:57-63.
- WALLACE, W. e J.S. PATE. 1965. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvense* L.). *Ann. of Bot.*, 29:655-671.
- WALLACE, W. e J.S. PATE. 1967. Nitrate assimilation in higher plants with special reference to the cocklebur (*Xanthium pennsylvanicum* W.). *Ann. of Bot.*, 31:213-228.
- WALLACE, W. 1973. A nitrate reductase inactivating enzyme from the mayze roots. *Plant Physiol.*, 52:197-201.
- WALLACE, W. 1974. Purification and properties of a nitrate reductase-inactivating-enzyme. *Biochem. Biophys. Acta*, 341:265-276.
- WALLACE, W. 1975. A re-evaluation of the nitrate reductase content of the mayze roots. *Plant Physiol.*, 55:774-777.

- WEISSMAN, G.S. 1972. Influence of ammonium and nitrate nutrition an enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiol.*, 49:138-141.
- WOOLEY, J.T., G.P. HICKS e R.H. HAGEMAN. 1960. Rapid determination on nitrate and nitrite in plant material. *Agric. Food. Chem.*, 8:481-482.
- YAMAYA, T. e K. OHIRA. 1976. Nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant and Cell Physiol.*, 17:633-641.
- YAMAYA, T. e K. OHIRA. 1977. Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant and Cell Physiol.*, 18:915-925.
- YAMAYA, T. e K. OHIRA. 1978. Nitrate reductase inactivating factor from rice seedlings. *Plant and Cell Physiol.*, 19(2):211-220.
- ZIELKE, H.R. e P. FILNER. 1971. Synthesis and turnover of nitrate reductase induced by nitrate in culture tobacco cells. *Journ. Biol. Chem.*, 246:1772-1779.

10. APÊNDICE

MECANISMOS DE AÇÃO DA REDUTASE DE NITRATO, SEGUNDO SEUS AUTORES

FILNER - (1967)

KEPPLER ET AL (1971)

C.B. OSMOND — ION ABSORPTION AND CARBON METABOLISM IN CELLS OF
HIGHER PLANTS — IN "ENCICLOPEDIA OF PLANT PHYSIOLOGY"
VOL - 2 - 1976 pg. 352

FACE INTERNA (LADO CITOPLASMÁTICO) DO TETRAMERO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO ATPase - NR.

BUTZ e JACKSON - PHYTOCHEM 16:410 (1977)

NEYRA E HAGEMAM (1978) PL. PHY. 62: 620

ESQUEMA PROPOSTO PARA A ASSIMILAÇÃO DE NO_3 EM FOLHAS DE MILHO