

Alessandra de Souza Santos

Indução termoperiódica da nitrato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (Ananas comosus).

Thermoperiodic induction of nitrate reductase associated with the plasma membrane in pineapple (Ananas comosus).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Botânica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Helenice Mercier

São Paulo

2010

RESUMO

A nitrato redutase (NR) atua juntamente com a nitrito redutase (NiR) catalisando a primeira etapa da redução do nitrato. A NR, no citossol, é ativada, principalmente, pela luz e reduz o nitrato a nitrito. Em seguida, este é reduzido a amônio. Trabalhos anteriores demonstraram que a isoforma citossólica da NR está presente nas folhas e raízes do abacaxizeiro; já as associadas à membrana plasmática (NRMP) ainda não se tem registro. Sabe-se, no entanto, que a NRMP apresenta modos diferentes de ativação, como já constatados para outras espécies. Dentre os fatores que afetam sua atividade pode-se citar a temperatura. Pesquisas realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP, acerca da influência do termoperíodo sobre os metabolismos nitrogenado e fotossintético de plantas de abacaxizeiro, aventaram a hipótese de que haveria uma nitrato redutase específica de membrana plasmática presente nas células radiculares, a qual seria regulada por termoperíodo, diferindo, portanto, da isoforma citossólica presente nas folhas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal demonstrar a existência de uma isoforma da NR associada à membrana plasmática, a qual seria responsável pelo incremento da atividade dessa enzima registrada nas raízes de *Ananas comosus*, quando plantas cultivadas *in vitro* são submetidas ao termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite). Para tanto, determinou-se o tempo mínimo de exposição das plantas de abacaxizeiro ao termoperíodo, necessário à indução da nitrato redutase radicular. Além disso, estudou-se a influência da idade das plantas na resposta ao tratamento com baixa temperatura noturna. Plantas cultivadas *in vitro* com 90 dias de idade ou com idades variadas foram transferidas para câmaras de crescimento com temperatura constante (28°C dia/noite – controle experimental) ou com termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 55 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Elas permaneceram nessas condições por 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 ou 60 dias. Após cada período, a atividade *in vivo* da NR foi analisada durante a fase de ausência de luz. Para que fosse possível identificar uma possível NRMP nas células radiculares de abacaxizeiro, um método de ensaio *in vitro* foi padronizado e a melhor técnica de isolamento de frações de membrana plasmática foi selecionada. Após as plantas com 60 dias de idade serem submetidas por 30 dias ao tratamento termoperiódico ou à temperatura constante, as frações de membrana

plasmática das células radiculares foram isoladas e o ensaio *in vitro* da NR foi realizado, utilizando-se NADH, NADPH ou succinato como doadores de elétrons. Os resultados indicaram que o tempo mínimo de exposição das plantas de abacaxizeiro ao termoperíodo foi de 30 dias. O método de ensaio enzimático *in vitro* foi padronizado para as plantas de abacaxizeiro e a técnica de isolamento de frações de membrana plasmática que se mostrou mais adequada para essa bromélia foi a de fracionamento por sistema de duas fases com Dextran T-500 e PEG 3350. O grau de pureza das frações, avaliado pela detecção da atividade da enzima citoplasmática malato desidrogenase (MDH), foi em média de 95%, evidenciando a eficácia da padronização do método. Os resultados obtidos para as frações de membranas plasmáticas, extraídas das raízes das plantas que estiveram sob o tratamento termoperiódico, mostraram que a baixa temperatura noturna influenciou positivamente a atividade da nitrato redutase. O aumento da atividade foi observado quando NADH, NADPH ou succinato foram utilizados como doadores de elétrons. Isso significa que, provavelmente, mais de uma isoforma da NRMP está presente nas raízes de abacaxizeiro. Além disso, há indícios de que a isoforma que está ligada externamente à membrana por uma âncora glicosídica (que utiliza succinato como doador de elétrons) está presente nas células radiculares do abacaxizeiro e respondeu positivamente ao estímulo da baixa temperatura noturna. Em contrapartida, nenhuma diferença pôde ser observada quando as atividades da NR foram medidas nas frações de citoplasma das plantas controle e daquelas que foram tratadas com termoperíodo. Não foi detectada atividade nas frações citossólicas quando succinato foi oferecido como poder redutor da NR. Concluiu-se, portanto, que o incremento na atividade da NR, verificado nas plantas que foram tratadas com termoperíodo, deveu-se à indução pela baixa temperatura noturna da NRMP. Esta pesquisa trouxe contribuições importantes acerca da existência de uma nitrato redutase associada à membrana plasmática em abacaxizeiro, nunca antes detectada em uma bromélia e muito pouco estudada nos demais vegetais. As padronizações realizadas serão essenciais para aplicação em outras pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP, abrindo oportunidades para se aprofundar ainda mais o tema sobre o controle da ativação da NR.

ABSTRACT

The nitrate reductase (NR) acts together with the nitrite reductase (NiR) to catalyze the first step of the nitrate reduction. The NR localized in the cytosol is activated mainly by light and reduces nitrate to nitrite, followed by its reduction to ammonium. Previous work demonstrated that the cytosolic isoform of NR is present in leaves and roots of *Ananas comosus*, although the isoform associated with the plasma membrane (PM-NR) has not yet been registered in this species. The PM-NR has different modes of activation in comparison to the cytosolic NR, as already demonstrated in other species. Among the factors that affect its activity can be mentioned the temperature. Experiments developed in the Laboratory of Plant Physiology of IBUSP hypothesized that exists a specific plasma membrane NR in plant roots regulated by thermoperiod, differing from the cytosolic isoform present in leaves. The present work aimed to demonstrate the existence of this isoform of NR present in the plasma membrane, which would be responsible for the increase of its activity in *Ananas comosus* roots when plants were cultivated *in vitro* under thermoperiod of 28°C day/ 15°C night. Initially, it was important to determine the minimum time of exposure to thermoperiod necessary for the induction of nitrate reductase in roots of pineapple plants. Furthermore, it was analyzed the influence of age in the response of plants to low night temperature treatment. For this purpose, plants with different ages cultivated *in vitro* were transferred to growth chambers either with constant temperature (28°C day/night – experimental control) or with thermoperiod (28°C day/ 15°C night). The plants were cultivated in these conditions during 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 or 60 days and then the *in vivo* NR activity was analyzed in the shoot and root tissues during the dark period. In order to identify a probable PM-NR in the pineapple root cells, it was also necessary to develop a NR *in vitro* assay protocol specific for *Ananas comosus* and the appropriate technique for plasma membrane isolation (Dextran T-500 and PEG 3350). The purity of the fractions, determined by the activity of cytoplasmic enzyme malate dehydrogenase (MDH), was on average 95%, indicating the effectiveness of the method. The next step was to evaluate the NR activity in cytoplasmic and plasma membrane fractions of root tissues of *Ananas comosus*. Using 60 days'old plants exposed either to 30 days under the thermoperiodic treatment or to

constant temperature, the plasma membrane fractions of roots were isolated and the *in vitro* NR assay was performed using NADH, NADPH or succinate as electron donors. The results indicated that the minimum thermoperiod exposure time necessary to induce NR activity was 30 days. Furthermore, it was demonstrated that low temperatures during the dark period positively influenced the activity of nitrate reductase in plasma membrane fractions and that the increase in its activity was observed when NADH, NADPH or succinate were used as electron donors. On the other hand, no difference in NR activity was observed in the cytoplasmic fraction of control plants and those which were treated with thermoperiod. Moreover, no NR activity was detected in cytosolic fractions when succinate was provided as electron donor. All together, this results showed that probably diferents isoforms are presents in pineapple roots. The extracellular isoform that is attached to the plasma membrane by a lipophilic anchor (using succinate as electron donor) can be present in root cells of pineapple and responded positively to the low night temperature stimulus. This study has made important contributions to the knowledge of the metabolism and physiology of *Ananas comosus*. This is the first time that the existence of a nitrate reductase associated with the plasma membrane, a very little studied enzyme, is documented in Bromeliaceae.

INTRODUÇÃO

O Abacaxizeiro

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr), pertencente à família Bromeliaceae (CUNHA *et al.* 1994), é uma planta nativa de nosso continente (MEDINA *et al.* 1993; BARTHOLOMEW e MALÉZIEUX, 1994); ocorre em áreas com temperaturas elevadas, onde a pluviosidade é pequena ou irregular (BACKER e COLLINS, 1939).

A cultura do abacaxizeiro ocupa o nono lugar no ranque mundial da fruticultura, sendo que o Brasil é o segundo maior produtor (BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO, 2001).

A variedade “Smooth Cayenne” tem alta qualidade comercial. Essa importância deve-se ao fato de ser uma fruta doce, de acidez leve, e textura tenra (RANGAN, 1984). Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi corresponda a essa variedade (CUNHA *et al.*, 1994).

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado como importante ferramenta em estudos fisiológicos acerca de diversas espécies de bromélias (MERCIER e KERBAUY, 1997). No Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP várias pesquisas têm sido realizadas com relação à composição hormonal endógena (MERCIER e ENDRES, 1999) ao metabolismo do nitrogênio (ENDRES e MERCIER, 2001a; ENDRES *et al.*, 2002; INSELSBACHER *et al.*, 2007), ao crescimento (ENDRES e MERCIER, 2001b), à organogênese (MERCIER *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003; HAMASAKI *et al.* 2005), ao metabolismo fotossintético (NIEVOLA, 2002; FRESCHI *et al.*, 2010) ou à atividade de várias enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio (NIEVOLA e MERCIER, 2001; NIEVOLA, 2002; FRESCHI *et al.* 2009).

O Nitrogênio na Nutrição Vegetal

O N é o quarto elemento mais abundante nos seres vivos sendo seguido pelo oxigênio, o carbono e o hidrogênio (BUCHANANN, 2000). O N está presente em diversas formas na biosfera, aproximadamente 79% da atmosfera terrestre é composta por N molecular (N₂). Na biosfera terrestre, 0,04% do nitrogênio está na forma combinada, desse percentual 57% encontram-se na forma orgânica e 43% na forma inorgânica. Considerando o nitrogênio existente na forma orgânica, somente 4% fazem parte dos seres vivos, sendo 94% localizados nos vegetais, 4% na biomassa microbiana e 2% nos animais (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). O nitrogênio é um dos principais fatores limitantes

do crescimento vegetal, sendo encontrado em moléculas importantes, como por exemplo, nas proteínas, em alguns fitormônios e nos ácidos nucleicos (RNA e DNA) (CORDEIRO, 2004; TISCHNER, 2000).

Apesar de muito abundante na atmosfera, o nitrogênio molecular não pode ser absorvido pelos vegetais. As plantas terrestres, geralmente, absorvem o nitrogênio do solo na forma de compostos altamente oxidados, dos quais o nitrato (NO_3^-) é o principal. Entretanto, o amônio (NH_4^+) também pode ser absorvido e incorporado em compostos orgânicos (BUCHANANN, 2000; SODEK, 2004).

A assimilação do N, proveniente do nitrato, começa com a absorção desse íon seguida por sua redução, resultando em amônio. Esse último é incorporado em aminoácidos, como a glutamina e o glutamato (TISCHNER, 2000; CORDEIRO, 2004).

Absorção e Redução do Nitrato

As plantas disponibilizam uma porção significativa de seus esqueletos carbônicos e reservas energéticas para a absorção e assimilação do NO_3^- (BUCHANANN, 2000). Todo o processo de assimilação pode consumir mais de 25% da energia gerada na fotossíntese (SOLOMONSON e BARBER, 1990).

A indução do sistema enzimático de assimilação inicia-se com a exposição da planta ao íon NO_3^- , resultando em um aumento contínuo na taxa de absorção do mesmo. Isso inclui também um incremento no número de proteínas transportadoras de nitrato presentes na membrana plasmática. (TISCHNER, 2000). O papel indutor do nitrato sobre o nível de atividade e o teor de RNAm da NR tem sido documentado para várias espécies, dentre elas podemos citar *Nicotiana tabacum* (GALANGAU *et al.*, 1988; MATT *et al.*, 2001), *Oryza sativa* (HAMAT *et al.*, 1989), *Lycopersicon esculentum* (GALANGAU *et al.*, 1988), *Hordeum vulgare* (MELZER *et al.*, 1989) e *Zea mays* (GOWRI e CAMPBELL, 1989). Não existem evidências de que a disponibilidade de nitrato acarrete alterações na regulação pós-traducional da NR (FERRARIO *et al.*, 1996; KAISER *et al.*, 2002).

O nitrato é conhecido como um estimulador de transportadores específicos para esse íon (CRAWFORD e GLASS, 1998; STITT, 1999; STITT *et al.*, 2002; TISCHNER, 2000; MATT *et al.*, 2001). Plantas que nunca foram expostas ao NO_3^- possuem células radiculares com uma capacidade limitada de absorção desse íon, sugerindo que uma pequena quantidade de proteínas transportadoras estariam presentes na membrana, isto é,

seriam proteínas constitutivas. Após contato com o íon, a taxa de absorção aumenta, mas a adição de inibidores de síntese de proteínas causa um rápido decréscimo para os níveis constitutivos. Isso sugere que a maioria das proteínas transportadoras é sintetizada de acordo com a disponibilidade de NO_3^- no meio externo (HOPKINS, 1999).

O transporte de NO_3^- através da membrana pode ocorrer por meio de dois mecanismos: o de alta afinidade (HATS, do inglês: high-affinity transport system) e o de baixa afinidade (LATS, do inglês: low-affinity transport system). Duas famílias gênicas atuam na síntese das proteínas transportadoras de NO_3^- : NRT1 e NRT2. A família NRT2 codifica transportadores para o sistema HATS. A família NRT1 é mais complexa, codificando transportadores que funcionarão em ambos os mecanismos (HATS e LATS) ou transportadores específicos para o LATS (BUCHANAN, 2000; TISCHNER, 2000).

Após ser absorvido pelas raízes, o NO_3^- pode ser reduzido ou estocado nos vacúolos, ou ainda, ser translocado para a parte aérea, onde poderá ser reduzido ou estocado.

O NO_3^- precisa ser reduzido a amônio, antes da assimilação em aminoácidos (CHENG *et al.*, 1992). O primeiro passo da redução, geralmente, ocorre no citossol por meio da enzima nitrato redutase (NR), resultando na produção de nitrito (NO_2^-). A NR é uma das poucas enzimas vegetais induzidas pelo seu próprio substrato (CRAWFORD, 1995; TACHIBANA *et al.*, 1991; FORDE 2002). O nitrito, nos plastídeos (no caso das raízes) ou nos cloroplastos (no caso das folhas), é reduzido a amônio pela nitrito redutase (NiR) (KLEINHOFs e WARNER, 1990). O NH_4^+ , por sua vez, é assimilado pelo ciclo enzimático conhecido por glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT). A glutamina sintetase (GS) combina o amônio com o glutamato para formar a glutamina. Os níveis elevados de glutamina nos plastídeos estimulam a atividade da glutamato sintase (conhecida como glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase, ou GOGAT). Essa enzima transfere o grupo amina da glutamina para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato (TISCHNER, 2000; LAM *et al.*, 1995). O amônio pode também ser assimilado por uma rota alternativa, por meio da enzima glutamato desidrogenase (GDH), a qual catalisa uma reação reversível que sintetiza o glutamato, utilizando NADH ou NADPH como agente redutor (CAMMAERTS & JACOBS, 1985).

O ciclo diurno da atividade da NR tem sido descrito em: *Arabidopsis* (SU *et al.*, 1996), *Cucurbita pepo* (LILLO *et al.*, 1997), *Hordeum vulgare* (LILLO, 1984), *Nicotiana tabacum* (DENG *et al.*, 1998), *Lycopersicon esculentum* (GALANGAU *et al.*, 1988; JONES *et al.*, 1998), *Zea mays* (MERLO *et al.*, 1995), *Ananas comosus* (NIEVOLA e MERCIER, 2001), entre outras espécies. A maior parte das plantas reduz o NO_3^- durante o dia (SOLOMONSON e BARBER, 1990), sendo raros os estudos que relatam a atividade da NR no período noturno (STÖRN e MÄCK, 2001; NIEVOLA e MERCIER, 2001; NIEVOLA, 2002; FRESCHI *et al.*, 2009; FRESCHI *et al.*, 2010).

Estrutura e Regulação da NR citossólica (NRC)

A NR é um dímero com três domínios de ligação. O complexo molibdênio (MoCo) está ligado ao grupo heme (região *hinge* 1) que por sua vez está unido ao FAD (região *hinge* 2). O NAD(P)H liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade, iniciando a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), por meio de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O NO_3^- é reduzido no complexo MoCo próximo à região amino terminal (CAMPBELL, 1999; TISCHNER, 2000).

A expressão da NR é regulada em nível traducional por vários sinalizadores, incluindo nitrato, luz, ritmo circadiano, citocininas, concentração de CO_2 , sacarose, glutamina, estresse hídrico e anaerobiose. No entanto, essa enzima também é controlada em nível pós-traducional por uma fosforilação rápida e reversível da proteína em resposta à baixa luminosidade, redução dos níveis de CO_2 , estresse osmótico e mudanças no pH celular (CRAWFORD, 1995; BOTREL and KAISER, 1997; CHUNG *et al.*, 1999).

Em plantas superiores, a NR é regulada pela síntese e degradação da enzima, pela inativação reversível e pela concentração de nitrato no substrato (SOLOMONSONS e BARBER, 1990; HOFF *et al.*, 1994; KAISER *et al.*, 2002). A atividade da enzima pode aumentar em até 80% nas folhas em resposta à fotossíntese ou nas raízes esse aumento pode ocorrer em condições de hipoxia ou anoxia. Por outro lado, a inativação acontece nas folhas em ausência de luz ou com o fechamento dos estômatos. Em altas concentrações de oxigênio, a atividade nas raízes também pode ser inibida (KAISER *et al.* 1999).

A NR possui meia-vida de poucas horas (LI e OAKS, 1993), por isso o controle da expressão gênica é um modo eficiente de regulação da atividade (CAMPBELL, 1990). Quando as plantas estão expostas ao NO₃⁻, ocorre um aumento na transcrição do RNAm da NR. Em poucas horas a concentração da NR alcança seu teor máximo (TAIZ, 2002; CRAWFORD, 1999; KAISER, 1997).

A inibição da atividade da NR pode ocorrer em minutos, em resposta à fosforilação de um resíduo de serina na região *hinge* 1 por proteínas cinases dependentes de cálcio (CHUNG *et al.*, 1999; KAISER *et al.*, 2002; COMPAROT *et al.*, 2003; PROVAN *et al.*, 2006). No entanto, a fosforilação da enzima, por si só, não causa sua completa inativação. O processo só se finaliza após a conjugação reversível da NR ao complexo protéico conhecido por 14-3-3, marcando a enzima para a degradação (KAISER e HUBER, 1994; BACHMANN *et al.*, 1995; CHUNG *et al.*, 1999; WEINER e KAISER, 1999; 2000; 2001; COMPAROT *et al.*, 2003; PROVAN *et al.*, 2006). As proteínas 14-3-3 funcionam como um dímero e suas subunidades precisam estar ligadas a um metal divalente (BUCHANAN, 2000; CRAWFORD, 1999; DARLING *et al.*, 2005).

O estado de fosforilação da NR varia durante o ciclo diurno (LILLO, 1994; KAISER, 1997). No escuro, a NR é fosforilada no resíduo de serina localizado na região "*hinge* 1". Depois que as proteínas 14-3-3 ligam-se, a NR é inativada. A luz induz a desfosforilação e, conseqüentemente, a NR é ativada. A NR, no entanto, é degradada a uma taxa constante na luz ou no escuro, independentemente da fosforilação pós-traducional. A luz também induz o acúmulo do RNAm da NR (KAISER, 1997). Os altos teores da proteína NR, em presença de luz, parecem ser conseqüência dos efeitos positivos da luminosidade na síntese dessa enzima (transcrição e tradução). A glicose e a sacarose podem substituir a luz na indução do acúmulo do RNAm da NR, sugerindo que os esqueletos carbônicos seriam os fatores determinantes na regulação da NR em nível transcricional (ASLAN and HUFFAKER, 1984; CHENG *et al.*, 1992; CRAWFORD *et al.*, 1992; VAUCHERET *et al.*, 1992; VICENTZ *et al.*, 1993; LILLO, 1994; LEA *et al.* 2006).

As citocininas, dentre os fitormônios, são as que mais interferem na indução da atividade da NR (YU *et al.*, 1998). Em 1969, LIPS & ROTH-BEJERANO realizaram os primeiros estudos, relatando o papel indutor de uma citocinina sintética. Esses autores trabalharam com plantas de *Nicotiana rústica* que, após serem pulverizadas com

cinetina, apresentaram um aumento na atividade da NR foliar. Folhas de cevada tratadas com benzilaminopurina (BA), na presença de NO_3^- e luz, além de apresentarem aumento na atividade dessa enzima, também tiveram os teores de RNAm da NR aumentados, sugerindo o controle hormonal da transcrição da NR (LU *et al.*, 1990; 1992). O nível das citocininas endógenas zeatina, zeatina ribosídica e isopentenil adenina ribosídica também influenciaram a formação de transcritos da NR em abacaxizeiro. O acúmulo desses transcritos ocorreu seguidamente ao aumento desses hormônios e é seguido pelas maiores atividades da NR registradas (FRESCHI *et al.*, 2009).

A baixa temperatura pode ser considerada um importante fator ambiental, causando uma rápida ativação da NR nas folhas de *Triticum aestivum* L., resultado da desfosforilação da proteína. Plantas de trigo, após serem aclimatadas por 7 dias a 2°C, apresentaram um aumento na atividade da NR dependente de NADH. A atividade dobrou nesse período. A quantidade de proteína NR também aumentou, mostrando que a regulação da atividade dessa enzima pode ser dependente da ativação da NR já presente, assim como da síntese *de novo* da enzima (YANEVA *et al.*, 1996). O conteúdo de nitrato nas folhas de trigo foi reduzido a 1/3 após o período de aclimação (YANEVA *et al.*, 2002).

Nitrato Redutase Associada à Membrana Plasmática (NRMP)

Em procariontes foi observada a presença da NR tanto no citoplasma quanto na membrana plasmática. As duas isoformas apresentaram diferenças com respeito ao seu tamanho, às suas subunidades e aos seus genes codificantes (BERKS *et al.*, 1995; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, OLIVARES & BEDMAR, 1996; DELGADO, FERNANDO-LOPEZ & BEDMAR-EULOGIO, 1998; MEGALON *et al.*, 1998; BLASCO *et al.*, 1998; TISCHNER, 2000). Nos eucariontes, a NR é conhecida como uma enzima citossólica presente em todos os organismos autótrofos (RITENOUR *et al.*, 1966; DALLING *et al.*, 1972; SUZUKI *et al.*, 1981; OAKS & HIREL, 1985). No entanto, outros estudos têm demonstrado a existência de uma enzima redutora de nitrato associada à membrana plasmática (NRMP). A NRMP foi detectada em algas (JONES and MOREL, 1988; TISHNER *et al.*, 1989; STÖRN *et al.*, 1993) e em várias espécies de plantas terrestre (WARD *et al.*, 1988;1989; DE MARCO *et al.*, 1994; KLOBUS *et al.*,

1994; MEYERHOFF *et al.*, 1994; KUNZE *et al.*, 1997; STÖRN & ULRICH, 1997), tanto nas raízes como na parte aérea.

A NRMP ligada por uma âncora GPI foi detectada em folhas de tabaco por STÖRN em 1998 e tratava-se de um monômero com massa molecular de 96 kDa enquanto que em raízes tinha 63 kDa. Além disso, uma das formas solúveis da NR, com massa molecular de 93 kDa, apesar de estar voltada para a face citossólica, também está ligada à membrana e, nesse caso há relatos de pequenas variações em sua massa (CAMPBELL & KINGHORN, 1990; KUNZE *et al.*, 1997; STÖRN, 1998).

CONCLUSÃO

Atividade *in vivo* da NR

Durante esse trabalho concluiu-se que o menor tempo de exposição das plantas de abacaxizeiro ao termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite) necessário para que um incremento na atividade da NR nas raízes dessas plantas seja verificado é de 30 dias. Quando a atividade foi medida nas raízes das plantas que estiveram sob termoperíodo foi possível detectar que a baixa temperatura noturna influenciou positivamente na atividade da NR. O mesmo não foi verificado quando a atividade foi medida nas raízes das plantas controle (28°C dia/ noite) ou nas folhas das plantas controle ou daquelas que foram submetidas ao termoperíodo. Esses resultados indicaram que, em plantas de abacaxizeiro, existe uma isoforma da NR ligada à membrana plasmática que é induzida por baixa temperatura, ao contrário da NR encontrada no citoplasma, que é induzida pela luz.

Adequação do método de ensaio *in vitro* da NR

A padronização do método de ensaio da NR *in vitro* foi o primeiro passo necessário para que fosse possível medir a atividade da enzima nas frações celulares.

Seleção do método de fracionamento celular para abacaxizeiro

O método de fracionamento por partição com sistema de duas fases – Dextran T-500 e PEG 3350, o qual foi baseado em LARSON *et al.* (1994), mostrou-se mais apropriado para isolar as frações de membranas plasmáticas das células de abacaxizeiro.

Detecção da atividade da nitrato redutase em frações de membranas plasmáticas isoladas das raízes de abacaxizeiro.

As maiores atividades da nitrato redutase nas frações de membranas (NRMP) extraídas das raízes das plantas que estiveram sob termoperíodo quando o NADH, o NADPH ou o succinato foram utilizados como doadores de elétrons demonstraram que existem isoformas diferentes da NRMP nas raízes de abacaxizeiro. As maiores atividades detectadas com o succinato significa que, possivelmente, a isoforma da

NRMP que está associada com as membranas por uma âncora glicosídica esteja presente no abacaxizeiro. Essa forma da NR utiliza succinato como doador de elétrons e pode ser induzida por fatores diferentes daqueles que agem sobre a atividade da NR citoplasmática, como a baixa temperatura, por exemplo. Como nas frações citoplasmáticas nenhuma diferença foi encontrada entre as atividades medidas nas plantas controle e nas plantas tratadas com termoperíodo, concluiu-se que o incremento na atividade da NR *in vivo*, verificado nas raízes de abacaxizeiro após as plantas terem sido expostas ao termoperíodo por 30 dias (resultados prévios), ocorreu pela indução da NRMP e não pela atividade da NR citoplasmática.

A realização desta pesquisa contribuiu sobremaneira para os esclarecimentos sobre a existência de uma NRMP em abacaxizeiro, enriquecendo os conhecimentos sobre o metabolismo nitrogenado nessas plantas. Sabe-se que existem poucos trabalhos fisiológico-bioquímicos a esse respeito e essa isoforma nunca havia sido descrita anteriormente em uma planta da família Bromeliaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD ALI A, SUBRAMANIAN SIVAKAMI A, NANDULA RAGHURAM (2007) Regulation of activity and transcript levels of NR in rice (*Oryza sativa*): Roles of protein kinase and G-proteins. **Plant Science** **172**: 406–413
- ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C. (1984) Dependency of nitrate reductase on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. **Plant Physiology** **75**: 623-628.
- BACHMANN, M.; MCMICHAEL, R.W.; HUBER, J.L.; KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (1995) Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. **Plant Physiology** **108**:1083-1092.
- BARTHOLOMEW, D.P.; MALÉZIEUX, E.P. (1994) Pineapple. In: Schaffer, B.; Andersen, P.C. **Handbook of Environmental Physiology of Fruits Crops**. V. I e II. CRC Press, USA. p. 243-291.
- BÉRCZI, A. & MØLLER, I. M. (2000) Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. **Plant, Cell and Environment** **23**: 1287–1302.
- BERKS, B.C.; FERGUSON, S.J., MOIR, J.W., RICHARDSON, D.J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochim. Biophys. Acta** **1232**: 97-173.
- BERR, R.; BOETTGER, M.; CRANE, F.L. & MORRE, D.J. (1995) Nitrate reductase activity of plasma membranes from cultured carrot cells. **Protoplasma** **184**: 151-157.
- BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO (2001) **Biotecnologia aplicada à produção de mudas**. **19**: 42-47.
- BLASCO F., DOS-SANTOS J.-P., MAGALON A., FRIXON C., GUIGLIARELLI B., SANTINI C.-L., GIORDANO G. (1998) NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology** **28**: 435- 447.
- BORDIER, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **J. Biol. Chem.** **256**: 1604-1607.
- BOTREL A.; KAISER, W.M. (1997) Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. **Planta** **201**: 496-501.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry** **72**: 248-254.
- BROOKS, D. E.; NORRIS-JONES, R. (1994) Preparation and analysis of two-phase systems. **Methods in Enzymology** **228**: 14-27.

- BRUSCA, J. S.; RADOLF, J. D. (1994) Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. **Methods Enzymol** **228**: 182-193.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants **American Society of Plant Physiologists** 1367p
- BUTZ, R.G.; JACKSON, W.A. (1977) A mechanism for nitrate transport and reduction. **Phytochemistry** **16**: 409-417.
- CAMMAERTS, D. & JACOBS, M. (1985) A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** **163**: 517-526.
- CAMPBELL, W.H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **50**: 277-303.
- CHENG, C.L.; ACEDO, G.N.; CRISTINSIN, M.; CONKLING, M.A. (1992) Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. **PNAS** **92**: 1861-1864.
- CHUNG, H-J.; SEHNKE, P.C. and FERI, R.J. (1999) The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. **Trends in Plant Science Reviews vol.4 (9)**: 367-371.
- CORDEIRO, L. (2004) Fixação do Nitrogênio. Em: Kerbauy, G.B. – Fisiologia Vegetal, p. 76-93.
- CRAWFORD, N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell** **7**: 859-868.
- CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**. **3(10)**: 389-395.
- CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. (2000) Nitrogen and Sulfur. In: Buchanan, B.; Gruissem, w.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. **American Society of Plant Physiologists**.
- CRAWFORD, N.M.; WILKINSON, J.Q.; LABRIE, S.T. (1992) Metabolic control of nitrate reduction in *Arabidopsis thaliana*. **Australian Journal of Plant Physiology** **19**: 377-385.
- CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C. (1994) **Abacaxizeiro para exportação: aspectos técnicos da produção**. Frupex, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF. 41p.
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E.; HAGEMAN, R.H. (1972) Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. I. Spinach and tobacco leaves. **Biochimic Biophysic Acta** **283**: 505-512.
- DARLING, D.L.; YINGLING, J.; WYNSHAW-BORIS, A. (2005) Role of 14-3-3 proteins eukaryotic signaling and development. **Current Topics in developmental Biology, vol. 68**: 281.
- DE MARCO, A.; JIA, C.; FISCHER-SCHLIEBS, E.; VARANINI, Z.; LÜTTGE, U. (1994) Evidences for two different nitrate reducing activities at the plasma-membrane in roots of *Zea mays* L. **Planta** **194**: 557-564.

DELGADO M.J., FERNANDEZ-LOPEZ M., BEDMAR-EULOGIO J. (1998) Soluble and membrane-bound nitrate reductase from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology and Biochemistry (Paris)** **36**: 279- 283.

DENG, M.D.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; CABOCHE, M. (1990) Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. **Planta** **180**: 257-261.

ENDRES, L.; MERCIER, H. (2001a) Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal of Plant Physiology** **158**: 205-212.

ENDRES, L.; MERCIER, H. (2001b) Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. **Journal of Plant Nutrition** **24**: 29-42.

ENDRES, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. (2002) *In vitro* nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. **In Vitro Cell Development Biology Plant** **38(5)**: 481-486.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&ser vlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EM>>. Acessado em setembro de 2006.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ M., OLIVARES J., BEDMAR E.J. (1996) Purification and characterization of the membrane-bound nitrate reductase isoenzymes of *Bradyrhizobium japonicum*. **FEBS Letters** **392**: 1-5. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00670-9

FERRARIO S., VALADIER M.H., FOYER C.H. (1996) Short-term modulation of *nitrate reductase* activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays* leaves. **Planta (Heidelberg)** **199**: 366- 371.

FERRARIO, S.; VALADIER, M.H.; FOYER, C.H. (1996) Short term modulation of nitrate reductase activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays*. **Planta** **199**: 366-371.

FRESCHI L, NIEVOLA CC, RODRIGUES MA, DOMINGUES DS, VAN SLUYS M-A, MERCIER H. (2009) Ther- moperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiol Plantarum** **137**:201–12.

FRESCHI L.; RODRIGUES M.A.; TINÉ, M.A.S; MERCIER H. (2010) Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. **J. of Plant Physiology** doi:10.1016/j.jplph.2010.06.002

GALANGAU, F.; DANIEL-VEDELE, F.; MOUREAUX, T.; DORBE, M.F.; LEYDECKER, M.T.; CABOCHE, M. (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology** **88**: 383-388.

GALLAGHER, S. R. AND LEONARD, R.T. (1982) Effect of Vanadate, Molybdate, and Azide on Membrane-Associated ATPase and Soluble Phosphatase Activities of Corn Roots **Plant Physiol.** **70**: 1335-1340

- GOWRI, G.; CAMPBELL, W.H. (1989) cDNA clones for corn leaf NADH:nitrate reductase and chloroplast NAD(P)⁺: gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Plant Physiology** **90**: 792-798.
- HAGEMANN, R.H.; REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. **Methods Enzymol.** **69**: 270-280.
- HAMASAKI, R.M.; PURGATTO, E. AND MERCIER, H. (2005) Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Brasilian Journal of Plant Physiology** **17 (4)**: 383-389.
- HELENIUS, A. and SIMONS, K. (1975) **Biochimica et Biophysica Acta** **415**: 29
- HERNÁNDEZ-MUNAÍN, C.; FERNÁNDEZ, M A; ALCINA, A AND FRESNO, M (1991) Characterization of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** **59(4)**: 1409-1416.
- HODGES TK, RT LEONARD (1974) Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. **Methods Enzymol** **32**: 392-406.
- HODGES, T. K. and MILLS, D. (1986) Isolation of the plasma membrane. **Methods Enzymol** **118**: 41-54.
- HOFF, T.; TRUONG, H.N.; CABOCHE, M. (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. **Plant, Cell and Environment** **17**: 489-506.
- JONES G.J.; MOREL, F.M.M. (1988) Plasmalemma redox activity in the diatom *Thalassiosira*. **Plant Physiology** **87**: 143-147.
- JONES, T.L.; TUCKER, D.E.; ORT, D.R. (1998) Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. **Plant Physiology** **118**: 149-158.
- KAISER W.M.; WEINER, H. and HUBER, S.C. (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiologia Plantarum** **105**: 385-390.
- KAISER WM, KANDBINDER A, STOIMENOVA M, GLAAB J. (2000) Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: what limits nitrate reduction in situ? **Planta** **210**:801-7.
- KAISER, W.M. (1997) Regulatory interaction of carbon and nitrogen metabolism. **Progress in Botany** **58**: 151-163.
- KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. (1995) Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues. **Planta** **196**: 1-6.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (1994) Pos-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant. Physiology** **106**: 817-821.

KAISER, W.M.; WEINER, H.; ANDLBINDER, A.; TSAI, C.B.; ROCKEL, P.; SONODA, M.; PLANCHET, E. (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. **Journal of Experimental Botany** 53(370): 875-882.

KANDBINDER, A.; WEINER, H.; KAISER, W.M. (2000) Nitrate reductases from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L.) have different regulatory properties. **Journal of Experimental Botany** 51(347): 1099-1105.

KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. (1990) Advances in nitrate assimilation. In: MIFLIN, B.J.; STEWARD, P.J. **The Biochemistry of Plants**. Academic Press Inc., London, v.16, p. 89-120.

KLOBUS, G.; LOBOCKA, J.; BUCZEC, J. (1991) Effect of sodium tungstate on NO₃⁻ uptake by cucumber seedlings. **Acta Physiologia Plantarum** 13: 227-233.

KUNZE, M.; RIEDEL, J.; LANGE, U.; HURWITZ, R.; TISCHNER, R. (1997) Evidence for the presence of GPI-anchored PM-NR in leaves of *Beta vulgaris* and for PM-NR in barley leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** 35: 507-512.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MEIO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAL, N.; NSIEH, M.H.; CORRUIZI, G. (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **Plant Cell** 7: 887-898.

LARSSON, C.; SOMMARIN, M.; WIDELL, S. (1994) Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. **Methods Enzymol.** 148: 491-501.

LEA, U.S.; LEYDECKER, M.T.; QUILERE I.; MEYER, C.; LILLO, C. (2006) Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology** 140(3) : 1085-1094.

LI, X.Z.; OAKS, A. (1993) Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. Influence of NO₃⁻. **Plant Physiology** 102:1251-1257.

LILLO C. (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. **Physiologia Plantarum** 62: 89-94.

LILLO, C. (1984) Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. **Physiologia Plantarum** 61: 214-218.

LILLO, C. (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. **Physiologia Plantarum** 90: 616-620.

LILLO, C.; KAZAZAIC, S.; RUOFF, P.; MEYER, C. (1997) Characterization of nitrate reductase from light and dark-exposed leaves. Comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins. **Physiologia Plantarum** 114: 1377-1383.

LO PIERO, A.R.; CULTRONE, A.; MONACHELLO, D.; PETRONE, G. (2003) Different kinetic and regulatory properties of soluble and membrane-bound nitrate reductases in tomato leaves. **Plant Science** 165: 139-145.

LONG, D. M.; OAKS, A. (1990) Stabilization of nitrate reductase in maize roots by chymostatin. **Plant Physiology** **93**: 846-850.

LU, J.L.; ERTL, J.R.; CHEN, C.M. (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. **Plant Molecular Biology** **14**: 585-594.

LU, J.L.; ERTL, J.R.; CHEN, C.M. (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abcisic acid interactions in etiolated barley leaves. **Plant Physiology** **98**: 1255-1260.

MAGALON A., ROTHERY R.A., LEMESLE-MEUNIER D., FRIXON C., WEINER J.H., BLASCO F. (1998) Inhibitor binding within the NarI subunit (cytochrome bnr) of *Escherichia coli* nitrate reductase A. **Journal of Biological Chemistry** **273**: 10851-10856. DOI: 10.1074/jbc.273.18.10851

MAN, H.; BAKI, G. K. A.; STEGMANN, P.; WEINER, H.; KAISER, W. M. (1999) The activation state of nitrate reductase is not always correlated with total nitrate reductase activity in leaves. **Planta** **209**: 462-468.

MATT, P.; GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGLES, C.; KRAPP, A.; STITT, M. (2001) Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. **Plant, Cell and Environment** **24**: 1119-1137.

MEDINA, E.; POPP, M.; OLIVARES, E.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U. (1993) Daily fluctuations of titratable acidity, content of organic acids (malate and citrate) and soluble sugars of varieties and relatives of *Ananas comosus* L. growing under natural tropical conditions. **Plant, Cell and Environment** **16**: 55-63.

MELZER, J.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. (1989) Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. **Molecular and General Genetics** **217**: 341-346.

MERCIER, H.; ENDRES, L. (1999) Alteration of hormonal levels in a rootless epiphytic bromeliad in different phenological phases. **Journal of Plant Growth Regulation** **18**: 121-125.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. (1997) Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Ed. Bajaj Y.E.S., Springer, Berlin, 40: 43-55.

MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. (2003) Endogenous auxin and cytokinins contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology** **15** (2): 107-112.

MERLO, L.; FERRETI, M.; PASSERA, C.; CHISI, R. (1995) Light-modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. **Physiologia Plantarum** **94**: 305-311.

MEYERHOFF, P.A.; FOX, T.C.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. (1994) Characterization of the association of nitrate reductase with barley (*Hordeum vulgare* L.) root membrane. **Plant Physiology** **104**: 925-936.

NIEVOLA C.C. (2002) Variações hormonais e das atividades das enzimas redutase do nitrato e fosfoenolpiruvato carboxilase em plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) C₃ e induzidas a CAM por termoperíodo. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 120p.

NIEVOLA C.C.; MERCIER, H. (2001) Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. – Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **24 (3)**: 295-301.

OAKS, A.; HIREL, B. (1985) Nitrogen metabolism in roots. **Annual Rev. Plant Physiology** **36**: 345-365.

PM-NR in leaves of *Beta vulgaris* and for PM-NR in barley leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** **35**: 507-512.

PROVAN, F.; HAAVIK, J.; LILLO, C. (2006) The regulatory phosphorylated serine in full-length nitrate reductase is necessary for optimal binding to a 14-3-3 protein. **Plant Science** **170(2)**: 394-398.

PRYDE, J.G. (1986) Triton X-114: a detergent that has come from the cold. **Trends Biochem. Sci.** **11**: 160-163.

RANGAN, T.S.. Pineapple. In: Ammirato, P.V.; Evans, S.W.R.; Yamada, Y. (ed.), **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Moemillan Publ. Co., 1984, p. 373-382.

RITENOUR, G.L.; JOY, K.W.; BUNNING, J.; HAGEMAN, R.H. (1966) Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. **Plant Physiology** **70**: 872-874.

RUFTY, T.W.; JR.; THOMAS, J.F.; REMMLER, J.L.; CAMPBELL, W.H.; VOLK, R.J. (1986) Intracellular localization of nitrate reductase in roots. **Plant Physiology** **82**: 675-680.

S. SIVASANKAR and A. OAKS (2006) Regulation of Nitrate Reductase during Early Seedling Growth (A Role for Asparagine and Glutamine) **PLANT PHYSIOLOGY** **107 (4)**: 1225-1231

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. (1988) Biotecnologia do solo – Fundamentos e Perspectivas. Brasília, MEC – ESAL – FAEPE – ABEAS.

SITT, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology** **2**: 178-186.

SODEK, L. (2004) Metabolismo do Nitrogênio. Em: Kerbauy, G.B. – Fisiologia Vegetal, p. 94-113.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **41**: 225-253.

SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; ENDRES, L.; MERCIER, H. (2003) Relationships between endogenous hormonal and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. **Plant Physiology and Biochemistry** **41**: 733-739.

STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany** **53** (370): 959-970.

STÖHR C., TISCHNER R., WARD M.R. (1993) Characterization of the plasma-membrane-bound nitrate reductase in *Chlorella saccharophila* (Krüger) Nadson. **Planta** **191**: 79- 85.

STÖHR, C. (1999) Relationship of nitrate supply with growth rate, plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase and tissue nitrate content in tobacco plants. **Plant, Cell and Environment** **22**: 169-177.

STÖHR, C.; GLOGAU, U.; MÄTSCHKE, M.; TISCHNER, R. (1995) Evidence for the involvement of plasma-membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue-light stimulation of nitrate uptake in *Chlorella saccharophila*. **Planta** **197**: 613-618.

STÖHR, C.; ULLRICH, W.R. (1997) A succinate-oxidising nitrate reductase is located at the plasma membrane of plants roots. **Planta** **203**: 129-132.

STÖRN, C.; MÄCK, G. (2001) Diurnal changes in nitrogen assimilation of tobacco roots. **Journal of Experimental Botany** **52** (359): 1283-1289.

SU, W.; HUBER, S.C.; CRAWFORD, N.M. (1996) Identification *in vitro* of a post-translational regulatory site in the hinge I region of *Arabidopsis* nitrate reductase. **The Plant Cell** **8**: 519-527.

SUZUKI, A.; GADAL, P.; OAKS, A. (1981) Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. **Planta** **151**: 457-461.

TAIZ, L. and ZEIGER, E. (2004) Fisiologia Vegetal **Artmed Editora** 719 p.

TISCHNER, R. (2000) Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment** **23**: 1005-1024.

TISCHNER, R.; WARD, M.R.; HUFFAKER, R.C. (1989) Evidence for a plasma-membrane-bound nitrate reductase involved in nitrate uptake of *Chlorella sorokiniana*. **Planta** **178**: 19-24.

VAUCHERET, H.; MARION, P.A.; MEYER, C.; FAURE, J.D. MARIN, E.; CABOCHE, M. (1992) Interest in and limits to the utilization of reporter genes for the analysis of transcriptional regulation of nitrate reductase. **Molecular and General Genetics** **223**: 259-268.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. (1993) Regulation of nitrate reductase expression in *Nicotiana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant Journal** **3**: 315-324.

WARD, M.R.; GRIMES, H.D.; and HUFFAKER, R.C. (1989) Latent nitrate reductase activity is associated with plasma membrane of corn roots. **Planta** **177**: 470-475.

WARD, M.R.; TISCHNER, R.; HUFFAKER, R.C. (1988) Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. **Plant Physiology** **88**: 1141-1145.

WEINER, H.; KAISER, W.M. (1999) 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase spinach leaves. **FEBS Letters** **455**: 75-78.

WEINER, H.; KAISER, W.M. (2000) Binding to 14-3-3 proteins is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. **FEBS Letters** **480**: 217-220.

WEINER, H.; KAISER, W.M. (2001) Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins. **Journal of Experimental Botany** **52(359)**: 1165-1172.

WIENKOOOP, S.; SCHLICHTING, R.; ULLRICH, W.R.; STÖHR, C. (2001) Different diurnal cycles of expression of two nitrate reductase transcripts in tobacco roots. **Protoplasma** **217**: 15-19.

WIENKOOOP, S.; ULLRICH, W.R.; STÖHR, C. (1999) Kinetic characterization of succinate-dependent plasma membrane-bound nitrate reductase in tobacco roots. **Physiologia Plantarum** **105**: 609-614.

YANEVA, I. A.; HOFFMANN, G. W.; TISCHNER, R. (2002) Nitrate reductase from winter wheat leaves is activated at low temperature via protein dephosphorylation. **Physiologia Plantarum** **114**: 65-72.

YANEVA, I.A.; MÄCK, G.; VUNKOVA-RADEVA, R.; TICHNER, R. (1996) Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. **Journal of Plant Physiology** **149**: 211-216.

YU, X.; SUKUMARAN, S.; MÁRTON, L. (1998) Differential expression of the *Arabidopsis* Nia1 and Nia2 genes. **Plant Physiology** **116**: 1091-1096.